Citokinski profil limfocita T iz krvi i bronhoalveolarnog ispirka u bolesnika s plućnom tuberkulozom

Boras, Zagorka

Doctoral thesis / Disertacija

2004

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:105:736301

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

Boras, Zagorka (2004) ***Citokinski profil limfocita T iz krvi i bronhoalveolarnog ispirka u bolesnika s plućnom tuberkulozom [Cytokine profile of T-lymphocytes from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in patients with active pulmonary tuberculosis].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/347

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
Medicinski Fakultet

Zagorka Boras

CITOKINSKI PROFIL LIMFOCITA T IZ KRVI I BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA U BOLESNIKA S PLUĆNOM TUBERKULOZOM

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2004.

Rad je izrađen u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“, ulica Jordanovac 104, Zagreb, i u Imunološkom zavodu, Odjelu za istraživanje i razvoj, Odsjeku za celularnu imunologiju, Rockefellerova 10, Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Antonio Juretić

ZAHVALA

Zahvaljujem svome mentoru **prof. dr. Antoniu Juretić** za pomoć, ohrabrenje i brojne savjete pri izradi ovog rada. Također zahvaljujem **dr. sc. Alenki Gagro** i članovima njezina laboratorija, posebno **Jasenki Jelačić**, za praktičnu izradu rada i savjete pri planiranju i objektivnom sagledavanju cijele problematike.

Veliku zahvalnost dugujem svojim **prijateljima** za nabavku materijala nužnih za izradu ovog rada.

Na kraju, ovaj rad posvećujem mojoj obitelji, **Jozi, Dragi i Zrinki**. Hvala im za beskrajno dugo strpljenje, podršku i odricanje.

SADRŽAJ Stranica

Popis oznaka i kratica 1

1. UVOD 3

1.1. **Mycobacterium tuberculosis** 3

1.2. **Komponente imunog sustava i imuni sustav pluća** 5

1.2.1. Makrofagi 6

1.2.2. T-limfociti 7

1.2.3. B-limfociti 11

1.2.4. Citokini 13

1.3. Određivanje razine citokina u tjelesnim tekućinama 17

1.3.1.Metode za određivanje solubilnih citokina 18

1.3.2. Određivanje unutarstaničnih citokina 20

1.4. Tuberkuloza 23

1.4.1. Epidemiologija tuberkuloze 23

1.4.2. Etiologija tuberkuloze 25

1.4.3. Patogeneza plućne tuberkuloze 25

1.4.4. Imunologija tuberkuloze pluća 27

1.4.5. Klinička slika tuberkuloze pluća 31

1.4.6. Dijagnostički postupci u tuberkulozi 34

1.4.7. Terapija tuberkuloze 38

2.CILJ RADA 42

2.1. Plan istraživanja 43

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE 45

3.1. Ispitanici i materijal 45

3.1.2. Monoklonska protutijela 46

3.1.3. Ostale kemikalije kojima se koristilo 46

3.2. Metode 47

3.2.1. Stimulacija limfocita u kulturi periferne krvi i stanica BAL-a 47

3.2.2. Obilježavanje površinskih biljega i unutarstaničnih citokina 48

3.2.3. Analiza stanica protočnim citometrom 49

3.2.4. Statistička analiza podataka 50

4. REZULTATI 51

4.1. Bolesnici s tuberkulozom pluća uključeni u istraživanje 51

4.1.1. Zastupljenost ispitanika prema spolu i osnovnim obilježjima tuberkuloze 52
4.1.2. Odnos osnovnih antropometrijskih parametara ispitanika 53
4.2. Udio CD4+ i CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika 54
4.2.1. Omjer CD4+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- ispitanika 57
4.2.2. Udio CD4+ i CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi i BAL-u u PPD+ skupini ispitanika 58
4.2.3. Udio CD4+ i CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi i BAL-u u PPD- skupini ispitanika 59
4.3. Udio CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika 60
4.3.1. Udio CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika 61
4.3.2. Udio CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfociti periferne krvi i BAL-a u PPD+ skupini ispitanika 62
4.3.3. Analiza rezultata postotka CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita između periferne krvi i BAL-a u PPD+ skupini Ispitanika 63
4.3.4. Udio CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD- skupini ispitanika 64
4.3.5. Analiza rezultata postotka CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD- skupini ispitanika 65
4.4. Rezultati postotka CD4+IL-4+ i CD8+IL-4+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupinama ispitanika 66
5. RASPRAVA 68
6. ZAKLJUČAK 79
7. SAŽETAK 81
8. SUMMARY 82
9. LITERATURA 84
10. ŽIVOTOPIS 98

Popis oznaka i kratica:

M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
BCG	cjepivo, Bacillus Calmette-Guerin
LAM	glikolipid, lipoarabinomanan
PPD	pročišćeni proteinski derivat (engl. purified protein derivate)
AM	alveolarni makrofag
MHC	glavni kompleks tkivne snošljivosti (engl. major histocompatibility complex)
APS	antigen predočne stanice
DS	dendritičke stanice
TGF	transformirajući faktor rasta (engl. transforming growth factor)
IFN-γ	interferon-γ
TCR	T-stanični receptor (engl. T cell receptor)
Th	pomoćnički T-limfociti (engl. helper T cells)
CTL	citotoksični T-limfociti (engl. cytotoxic T lymphocytes)
BAL	bronhoalveolarni lavat (ispirak)
IL	interleukin
CSF	faktori stimulacije kolonija (engl. colony-stimulating factors)
TNF	faktor nekrotiziranja tumora (engl. tumor necrosis factor)
PMA	poliklonski stimulator, forbol-12-miristat-13-acetat (engl. phorbol myristat acetate)
BFA	inhibitor proteinske sekrecije, brefeldin A
HIV	virus humane imunodeficijencije
TLR	transmembranski receptori makrofaga

	(engl. Toll-like receptors)
LT	limfotoksin
HLA	ljudski limfocitni antigen
	(engl. human lymphocyte antigen)
PCR	polimerazna lančana reakcija
	(engl. polymerase chain reaction)
DTH	reakcija kasne osjetljivosti
	(engl. delayed type hypersensitivity)

1.UVOD

1.1.Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) je spororastući, aerobni, fakultativno unutarstanični bacil koji je prirodno patogen za ljude. Tuberkuloza je primjer infekcije s unutarstaničnom bakterijom kad u istome bolesniku istodobno postoji zaštitni imunitet i patološka preosjetljivost. Imunološka reakcija na bacil tuberkuloze odraz je biološke sposobnosti organizma da odgovori na antigeni podražaj. Pojava bolesti znači da je obrambeni imunološki sustav savladan.

Ranije se smatralo da je podrijetlo M. tuberculosis i srodnih bakterija od bacila Mycobacterium bovis i da je do njihovog „razdvajanja“ došlo u doba pripitomljavanja divljih goveda, prije 10 000 godina. Novija istraživanja genoma mikobakterija pokazuju da je M. tuberculosis evolucijski najstariji mikobakterij. Danas se smatra da je on, a ne M. bovis, preteča ostalih mikobakterija. (1). U porodicu M. tuberculosis spadaju još M. bovis, M. bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG), M. africanum i M. microti. Te su mikobakterije međusobno vrlo slične što predstavlja dijagnostički problem.

Bacil tuberkuloze očituje antigene koji izazivaju celularnu i humoralnu reakciju domaćina (2). Antigene komponente nalaze se u strukturnim molekulama staničnog zida, citoplazme a mogu biti i proizvod metabolizma samog bacila. Stanični zid samog M. tuberculosis sastoji se od kompleksnih lipida, peptidoglikana i lipoarabinomanana (LAM) (3). LAM je glikolipid koji prevladava u mikobakterijskom staničnom zidu te je on ključna molekula u pokretanju citokinske proizvodnje (4). Ovakav sastav staničnog zida odgovoran je za svojstvo acidorezistentnosti što se koristi u dijagnostici tuberkuloze i za otpornost bacila *in vivo*, što mu omogućuje preživljavanje unutar makrofaga. Također, adjuvantnost cjelovitog Freundovog adjuvanta (emulzija vode u ulju s dodatkom mrtvih M. tuberculosis) temelji se na svojstvu stimulacije staničnog imunog sustava antigenima staničnog zida M. tuberculosis. Unutar bacila M. tuberculosis ima oko 1000 proteina koji su moguće antigene komponente. Danas se smatra kako samo određeni manji broj tih proteinskih antigenih komponenti ima ulogu u imunom odgovoru na M.

tuberculosis, a nazivaju se imunodominantni antigeni (5). Također, postoje i proteini koje izlučuje M. tuberculosis koji često izazivaju snažniji imuni odgovor od onih što se nalaze unutar stanice ili u staničnom zidu samog bacila (6).

Uzročnik tuberkuloze otkriven je 1882. god. i od tada se nastojalo ekstrahirati čisti antigen iz kulture bacila. Robert Koch prvi je izolirao „smeđu transparentnu tekućinu“ i nazvao ju „stari tuberkulin“. Takav tuberkulin sadrži kemijske supstancije M. tuberculosis, proizvode metabolizma samog mikobakterija i bjelančevine goveđeg bujona (7). Florence Seibert precipitirala je proteine iz „starog tuberkulina“ pomoću trikloroctene kiseline, amonijevog sulfata i alkohola. Takav tuberkulin poznat je kao pročišćeni proteinski derivat (PPD). PPD sadrži veliki broj proteinskih sastojaka koji su zajednički većini mikobakterija. Prema tome, kontakt s drugim mikobakterijama može biti razlog nespecifične pozitivne reakcije na PPD. Uporabom modernih imunoloških testova nastojalo se identificirati i izolirati čiste mikobakterijske antigene (8,9). Različiti proteinski antigeni izolirani su na temelju različite molekulske mase od 3 do 88 kD. Iako je nekoliko izoliranih proteina pokazalo obećavajuće rezultate *in vitro* ili pri pokusima na životinjama, njihova specifičnost u kliničkim istraživanjima nije potvrđena (9,10). Ranija istraživanja antigena molekulske mase 30/31 kD, poznati kao kompleks Ag85, pokazala su da se ti antigeni vežu na ljudski protein međustaničnog matriksa, fibronektin i tako moguće utječu na invazivnost M. tuberculosis (5). Nadalje, najnovijim istraživanjima, identificiran je antigen ESAT-6 iz kulture filtrata (8). Prema dosadašnjim rezultatima čini se da je navedeni antigen dovoljno osjetljiv i specifičan za razlikovanje infekcije M. tuberculosis od infekcije drugim mikobakterijama i s BCG-om. Unatoč svim tim istraživanjima izolacije antigena, danas je najviše u kliničkoj uporabi PPD kojeg je dobila Seibertova. Dobrodošao je u postavljanju dijagnoze tuberkuloze te u procjeni sveukupnog i specifičnog imunološkog stanja organizma (7).

U zadnje je vrijeme također došlo do napretka u razumijevanju molekularne biologije M. tuberculosis. Ne tako davno objavljena je kompletna sekvenca genoma samog bacila koji se sastoji od 4411529 parova baza (11). Analizom genoma M. tuberculosis došlo se do saznanja o postojanju dvije velike skupine proteina koje zauzimaju 10% samog genoma koje su, čini se,

odgovorne za imunogenost samog bacila. Te se skupine proteina zovu PE i PPE, a odgovorne su za antigeni polimorfizam M. tuberculosis. Taj antigeni polimorfizam vjerojatno ima utjecaja na izbjegavanje imunog odgovora domaćina na infekciju samim bacilom tuberkuloze (2). Iako molekularna osnova patogeneze infekcije M. tuberculosis još uvijek nije do kraja jasna, analiza sekvence genoma samog bacila ukazala je na postojanje određenih molekula koje bi mogle utjecati na razvoj imunog odgovora domaćina na sami bacil. Postoji više razloga za virulenciju M. tuberculosis primjerice enzim katalaza-peroksidaza koji štiti bacil od reaktivnog kisika u makrofagu ili gen *mce* koji kodira faktor za kolonizaciju makrofaga i faktor *sigma* (sigA) čija mutacija umrtvljuje bacil (12). Analizom genoma M. tuberculosis nađeni su geni u blizini faktora *mce* koji kodiraju transmembranski protein koji možda ima ulogu u razvoju infekcije. Otkriven je homolog gena *smpB*, važan za unutarstanično preživljavanje uzročnika tifusa i grupa gena koji kodiraju enzime M. tuberculosis, koji pak mogu razgraditi membrane stanica domaćina i tako pridonijeti razvoju infekcije (13).

1.2. Komponente imunog sustava i imuni sustav pluća

Zarazne plućne bolesti predstavljaju glavni zdravstveni problem kako razvijenih tako i zemalja u razvoju. Sama tuberkuloza širom svijeta prouzroči 1,7 milijuna smrti godišnje. Funkcija je imunološkog sustava zaštita organizma od infekcije s mikroorganizmima. Obrambeni sustav respiratornog trakta sastoji se od nespecifične i specifične imunosti (14). Nespecifični mehanizmi obrane sastoje se od anatomskih struktura koje sprječavaju prodor čestica i mikroorganizama u dalje distalne dijelove respiratornog sustava. S druge strane, mukocilijarni aparat i refleks kašlja izbacuju čestice i mikroorganizme koji uspiju proći mehaničke prepreke. Ako ipak prodru do alveolarnih prostora, tamo nailaze na molekule poput kolektina, beta-defenzina, laktoferina i komplementa. Respiratorni sustav ih, uz te molekule, alveolarne makrofage i druge fagocite, nastoji ukloniti prije nego se razvije aktivna upala.

1.2.1. Makrofagi

Alveolarni makrofagi (AM) čine >90% imunih stanica u području alveola u zdravog odraslog nepušača (15). Većina njih potječe od cirkulirajućih monocita koji se u plućnom tkivu diferenciraju u zrele makrofage. Smješteni su na dodirnoj plohi između zračnog prostora i alveola, a izražavaju slične biljege kao i monociti: molekule glavnog kompleksa tkivne snošljivosti (engl. major histocompatibility complex, MHC) II. razreda, receptore za imunoglobuline IgG, IgE, i komplement C3b-R/CD11b, ali ne i CD14 (receptor za lipopolisaharid). Manji postotak AM (oko 5%) izražava biljeg CD4. Oni su glavni fagociti respiratornog sustava za razliku od profesionalnih antigen predočnih stanica (APS), poput dendritičkih stanica (DS), nisu posebno učinkoviti u predočavanju antigena limfocitima T. Razlog tome je u činjenici što AM ne izražavaju u većoj mjeri kostimulacijske molekule, a ne mogu ni migrirati u regionalne limfne čvorove. Njihova je primarna zadaća razgradnja i uklanjanje antigena, ali bez jasno razumljivog signalnog puta za pokretanje upalnog odgovora. U prilog tome govore podaci da AM inhibiraju aktivaciju DS, kao i aktivaciju i proliferaciju naivnih limfocita T (Tn) što se postiže lučenjem citokina transformirajućeg faktora rasta β (engl. transforming growth factor, TGF-β) i dušičnog oksida (NO). AM u normalni uvjetima uklanjaju antigenske čestice i/ili mikroorganizme iz pluća, ali bez oštećenja alveolarne kapilarne membrane i bez aktivacije lokalnih obrambenih mehanizama. Jedno od ključnih pitanja u plućnoj imunobiologiji jest način na koji AM sudjeluju u pokretanju imunog odgovora (15). Čini se da AM imaju sposobnost prepoznavanja uljeza prema stupnju „štetnosti“ što omogućuju specifični receptori za tzv. zajedničke molekularne strukture mikroorganizama. Potaknuti kemotaksijskim tvarima, poput endotoksina, imunokompleksa, komponenti komplementa, AM migriraju na mjesto upale. Tamo fagocitiraju bakterije, viruse i gljivice, uvlače strane antigene i luče citokine s imunomodulacijskim djelovanjem (IL-8, kemoatraktant za neutrofile; IL-1, aktivacija limfocita i vaskularnog endotela; TNF-α, aktivacija vaskularnog endotela i permeabilnost; IL-6, aktivacija limfocita; IL-12, aktivacija NK-stanica i limfocita) (16). Aktivirani pomoćnički limfociti T (Th1) potom luče interferon-γ

(IFN-γ) koji je glavni aktivacijski citokin makrofaga, a što se očituje pojačanim lučenjem citokina, npr. faktora tumorske nekroze-α (engl. tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) s izraženim antivirusnim učinkom, pojačanom fagocitozom i razvojem oksidativnog metabolizma za inaktivaciju i unutarstanično ubijanje mikroorganizama. Alveolarni makrofagi zaraženi s M. tuberculosis proizvode citokine koji usmjeravaju daljnju imunološku reakciju i funkciju pojedinih subpopulacija T limfocita (17).

Kad navedeni mehanizmi ne uspiju ukloniti mikroorganizme, razvija se specifični imuni odgovor koji uključuje APS, limocite T i B i protutijela. Specifični plućni imunološki odgovor naročito je važan za obranu pluća od patogena koji preživljavaju u normalnim makrofagima (mikobakterije, gljivice i virusi) (18).

Mnoga su eksperimentalna i klinička istraživanja potvrdila važnu ulogu celularne, a dijelom i humoralne imunosti u obrani organizma od tuberkuloze (19). Izgleda da temeljnu ulogu u obrani organizma od tuberkuloze ima stanični imuni odgovor (19,20). T-limfociti fenotipa CD4 ili CD8 u suradnji s makrofagima ubijaju i razgrađuju bacile, u tom je procesu bitna uloga citokina, prvenstveno IFN-γ koji aktivira mikrobicidnu sposobnost makrofaga (19,21). Novija istraživanja govore da su citokini presudni čimbenici u kontroli mikobakterijske infekcije (22).

1.2.2. T-limfociti

T-limfociti jesu stanice koje nastaju diferencijacijom u timusu, zadužene za stanični imuni odgovor. Gledano s molekularnog nivoa, u timusu dolazi do odabira onih T-limfocita koji preko antigen specifičnog receptora prepoznaju antigene u sklopu MHC što je poznato kao proces pozitivne selekcije. S druge strane, dolazi do negativne selekcije onih limfocita koji ne prepoznaju molekule vlastitog organizma ili ih prepoznaju „prejako“ (autoagresivnost). Receptor nužan za prepoznavanje stranih molekula jest T-stanični receptor (engl. T cell receptor, TCR) koji se sastoji od šest proteinskih molekula. Svi T-limfociti u čovjeka iskazuju biljege CD2 i CD3. Uz TCR, T-limfociti iskazuju na svojoj površini koreceptorske molekule CD4 i

CD8. Prema tipu TCR-a, T-limfociti mogu se podijeliti na αβ T-limfocite i γδ T-limfocite. Brojniji su T-limfociti s αβ TCR-om, kada se govori o T-limfocitima misli se upravo na njih. U plućima se nalaze „klasični“ CD4+ i CD8+ T-limfociti, ali i relativno velik broj (oko 20%) αβ T-limfocita bez molekula CD4 i CD8 (CD4-CD8-), a koji su rijetki u drugim tkivima. Klasični CD4+, odnosno CD8+ T-limfociti, smješteni su u plućima unutar stijenke dišnih putova, između stanica alveolarnog epitela te u intersticiju. Drži se da CD4+ i CD8+ αβ T-limfociti relativno slabo odgovaraju na antigeni podražaj, odnosno slabo proliferiraju na podražaj mitogenicima, ali postaju potpuno imunokompetentnim limfocitima nakon „procesa“ učenja. Na temelju biljega molekule CD na površini stanice, T-limfociti dijele se u dvije subpopulacije: pomoćničke T-limfocite i supresorsko/citotoksične T limfocite (16, 23).

Pomoćnički T-limfociti (engl. helper T cells, Th) nose karakterističan biljeg CD4. Prepoznaju antigen na APS-i (aktivirane dendritičke stanice, makrofagi, B-limfociti) u sklopu molekule II. razreda MHC-a. Oni proizvodnjom različitih citokina pomažu B-limfocitima i CD8 T-limfocitima u obavljanju njihove efektorske funkcije (24). Specifičnost prepoznavanja molekula MHC tipa I. ili II. na ciljnim i APS-a, uz djelovanje koreceptorske molekule CD8 ili CD4, može rezultirati stimulacijskim signalom u T-limfocitima (25). Potreban je još i kostimulacijski signal. Najvažnija je kostimulacijska molekula na T-limfocitima molekula CD28. Proliferaciju T-limfocita uzrokuje vezanje molekule CD28 na djevičanskom T-limfocitu s ligandnim parom CD80/CD86 (B7.1/B7.2) izraženim na površini APS. Potom se CD4+ ili CD8+ T-limfociti diferenciraju u efektorske stanice koje, ovisno o tipu citokina koje proizvode (IL-4 ili IFN-γ), induciraju razvoj odgovarajuće imunoreakcije (26). Pomoćnički T-limfociti u perifernoj krvi čine 45-65% svih limfocita. U alveolarnim prostorima limfociti čine do 15% stanica imunog sustava pluća, a od toga 35-45% pripada fenotipu CD4+ (27).

Opće je prihvaćeno da CD4+ T-limfociti pokazuju raznolikost u svojoj citokinskoj sintezi pomoću kojih reguliraju limfocitnu efektorsku funkciju kako u miševa tako i u ljudi. Tako, s tog aspekta, postoji podjela pomoćničkih CD4+ T-limfocita u dvije skupine: Th1 i Th2.

Th1-limfociti proizvode interleukin-2 (IL-2), IFN-γ i TNF-α i promiču imunost posredovanu stanicama. Imaju nisku ekspresiju transkripcijskih faktora GATA-3 i c-maf, ekspresiju β2-lanca IL-12 receptora i visoku ekspresiju transkripcijskog faktora T-bet.

Th2-limfociti s proizvodnjom IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 promiču humoralnu imunost. Također, opisuju se T-limfociti (nazvani Th0), i u ljudi i u miševa, koji proizvode citokine i Th1 i Th2 skupine. Nije jasno jesu li Th0 limfociti zaista preteče Th1 i Th2 limfocita ili predstavljaju posebnu staničnu populaciju. Naime, Th0-limfociti mogu biti uključeni u uklanjanju patogena, naročito kada je ravnoteža između stanicama posredovane imunosti i humoralne imunosti pogodna za uklanjanje tog patogena (18). Izgleda da pojedini citokini mogu imati ključnu ulogu u razvoju Th1 i Th2 subpopulacija Th stanica. Tako prisutnost IL-4 za vrijeme diferencijacije T-stanica promiče razvoj Th2-limfocita, a sprječava razvoj limfocita Th1. Danas je predmet intenzivnog istraživanja stvaranje tipa citokinskog okružja na mjestu događanja, a čini se da tu igra ulogu aktivacija T-limfocita preko njihovog TCR. Naime, promjene u jakosti signala TCR-a može odrediti tip citokina, a prema tome i Th1 i Th2 diferencijaciju (28).

Osnovna je uloga CD4+ T-limfocita u ljudskoj tuberkulozi reguliranje staničnog imunog odgovora na M. tuberculosis (29). Citokinski profil M. tuberculosis antigen specifičnog T staničnog klona dosljedan je i uglavnom se proizvodi IFN-γ i IL-2. Taj citokinski profil u skladu je s Th1 fenotipom. Podaci o ulozi Th2-limfocita u ljudskoj tuberkulozi još uvijek su proturiječni, a njihova prava uloga za sada je nejasna (30,31). Nedavno je pokazan porast IL-4+ stanica tipa Th2 koji ukazuje da ta komponenta odgovora na M. tuberculosis doprinosi imunopatologiji tuberkuloze (17). Izgleda da je prisutnost Th2 citokina u perifernoj krvi tuberkuloznih bolesnika vezana za klinički različite stupnjeve bolesti (24). Malo se što zna o količini i vrsti citokinske proizvodnje od strane CD4+ limfocita na mjestu mikobakterijske upale, a dosadašnja su izvješća o tome oprečna. Najnovija istraživanja bolesnika s tuberkulozom pokazuju snažnu proizvodnju IFN-γ i TNF-α u CD4+ limfocitima bronhoalveolarnog ispirka (BAL), u odnosu na perifernu krv, što govori u prilog tezi o nakupljanju CD4+ T-limfocita (Th1) na mjestu upale (32,33).

Supresorsko/citotoksični T limfociti iskazuju svoje djelovanje na dva načina. Oni suprimiraju celularnu imunoreakciju i stvaranje protutijela u B-limfocitima, a imaju i efektorsku citotoksičnu funkciju (26). Na svojoj površini iskazuju tipičan biljeg CD8. Nije poznat biljeg kojim bismo razlikovali stanice sa supresorskim od onih s citotoksičnim učinkom (23). Specifičnost CD8+ T limfocita ogleda se u funkcionalnoj sprezi prepoznavanja antigena u sklopu molekula MHC-a razreda I. Oni specifično prepoznaju strane antigene na autolognim stanicama i u slučaju infekcije izazivaju smrt napadnute stanice. Važni su u obrani organizma od unutarstaničnih patogena. Citotoksični T limfociti (engl. cytotoxic T lymphocytes, CTL) ubijaju ciljne stanice na tri različita načina. Prvo se spajanjem sa ciljnim stanicama aktivira proces egzocitoze unutarstaničnih granula koje sadrže perforin, a molekule perforina uzrokuje razaranje ciljnih stanica. Drugo, ulaskom serumskih proteaza (granzimi) kroz perforinske kanale u ciljne stanice uzrokuje apoptotičku smrt ciljnih stanica. Treće, ekspresijom Fas liganda (Fas-L) na aktiviranim CTL i preko njih vezanjem za ciljne stanice također dolazi do apoptotičke smrti ciljnih stanica (33). CD8+ T-limfociti se slično kao i CD4+T-limfociti dijele na subpopulacije prema vrsti citokinske proizvodnje. Tako razlikujemo T1 CD8+ T-limfocite koje proizvode IFN-γ i T2 CD8+ CTL koje proizvode IL-4, IL-5 i IL-10 (17).

Uloga CD8+ T T-limfocita u tuberkulozi do sada je relativno slabo proučavana. Najnovije studije naglašavaju ulogu CD8+ T-limfocita u imunom odgovoru na M. tuberculosis (34,35,36). Kontaktom s M. tuberculosis i bacilom Calmette-Guerin (BCG) CD8+ T-limfociti se aktiviraju, a mikobakterijske peptide prepoznaju u kontekstu MHC razreda I. molekula. CD8+ T stanice aktivirane s tim antigenima proizvode IFN-γ, ali slabije nego CD4+ T stanice. CD8+ T stanice izražavaju molekule Fas-L, granulizina i perforina koje su sposobne lizirati inficirane makrofage. CD8+ T-limfociti mogu pomoći makrofagima u kontroli unutarstaničnog mikobakterija (37).

Dosadašnja istraživanja na životinjama pokazala su važnu ulogu CD8+ stanica u imunom odgovoru pri kroničnoj formi tuberkuloze pluća, a njihova uloga u ljudi nije do kraja jasna (36,37) . Čini se, slično kao i CD4+ T stanice, da citokinski profil CD8+ stanica periferne krvi ovisi o kliničkoj formi tuberkuloze. Tako u uznapredovaloj formi tuberkuloze pluća dominira T2

citokinski profil, za razliku od blaže forme tuberkuloze pluća u kojoj dominira T1 citokinski profil u perifernoj krvi (38). Jasnih podataka o vrsti citokinske proizvodnje CD8+ stanica na mjestu tuberkulozne upale u plućima za sada nema. Novija istraživanja govore samo o smanjenom postotku CD8+ stanica u BAL-u bolesnika s uznapredovalom formom plućne tuberkuloze, za razliku od periferne krvi tih bolesnika gdje je postotak spomenutih stanica povećan (39).

Prema tipu TCR, druga su podskupina T-limfocita tzv. γδ T-limfociti. U plućima su razmjerno više zastupljeni nego li u drugim tkivima. Čine oko 5% svih T limfocita u limfnim organima i 1-5% T-limfocita na periferiji. Oni su fenotipa CD3+ i uglavnom CD4- i CD8-. Njihova je funkcija slabije istražena u odnosu na „klasične“ αβ T-limfocite (40). Ne prepoznaju antigene u sklopu klasičnih molekula HLA na antigen-predočnim stanicama. Do nakupljanja γδ T-limfocita dolazi na mjestima upalnog procesa uzrokovanog mikroorganizmima i na mjestima kronične upale, a aktiviraju se proupalnim citokinima (IL-1 i TNF-α). Proizvode Th1 (IFN-γ) ili Th2 (IL-4) citokine, ovisno o vrsti podražaja pa tako imaju imunomodulacijsko djelovanje. Izražavaju biljeg memorijskih limfocita (CD45RO), a stupaju u interakcije sa stanicama urođene i stečene imunosti i tako imaju imunoregulacijski učinak. U ljudskoj populaciji γδ T- limfociti su nađeni u perifernoj krvi zdravih tuberkulinskih reaktora. Uloga tih T stanica u ljudskoj tuberkulozi nejasna je. Oni koriste makrofag kao antigen predočnu stanicu i izražavaju citotoksičnost na makrofage inficirane s M. tuberculosis Dosadašnje studije sugeriraju da one mogu biti dijelom odgovorne za prvi odgovor na infekciju sa živim M. tuberculosis (17).

1.2.3. B-limfociti

B-limfociti su, uz T-limfocite, druga osnovna podskupina limfocita (41). Nositelji su humoralne imunosti. Nastaju iz zajedničkog prekursora svih limfocita, a u fetusa se diferenciraju u jetri, a po rođenju u koštanoj srži. B-limfociti prepoznaju antigene pomoću membranskih imunoglobulina. Prepoznavanje antigena nije spregnuto s molekulama MHC. Membranski

imunoglobulini mogu biti razreda IgM, IgA, IgG, IgD ili IgE. B-limfociti imaju i kostimulacijske molekule CD19, CD81 i CD21, a te molekule čine B-stanični koreceptorski kompleks. Molekula CD19 izražena je na površini stanice od njene rane faze razvoja i najčešće se rabi u određivanju B-limfocitne populacije kao B-limfocitni biljeg. Osim CD19, zreli B-limfociti izražavaju i molekulu CD20.

Aktivacijom različitim antigenima, uz pomoć CD4+ T-limfocita, B-limfociti prolaze proces diferencijacije u kojem je najvažnije prespajanje razreda imunoglobulina procesom somatske rekombinacije. Za to su nužna najmanje dva signala: prvi nastaje vezanjem molekula CD40 i CD40L fizičkim kontaktom B-i T-limfocita, a drugi je potaknut solubilnim citokinima (18). Aktivirani B-limfociti izražavaju druge biljege koje zovemo aktivacijski (npr. molekula CD23). Izražavanje molekule CD23 na aktiviranim B-limfocitima kontrolirano je citokinima Th-2 tipa i to su IL-4 i IL-13. Citokini, IFN-α i IFN-γ, iskazuju antagonistički učinak na izražavanje molekule CD23 na površini B-limfocita. Aktivacijom, odnosno diferencijacijom B-limfocita, nastaju plazma stanice koje luče imunoglobuline ili protutijela.

Limfociti B čine 5-15% limfocita periferne krvi. BAL sadrži relativno mali broj limfocita B u odnosu na limfocite T (42). Raspodjela limfocitnih subpopulacija u plućima slična je onoj u perifernoj krvi pa je tako udio limfocita B u plućima prosječno 5% sveukupnog broja limfocita. Većina limfocita B i plazma stanica u plućima izražavaju, odnosno luče IgG i IgA, što se očituje relativno velikom koncentracijom tih imunoglobulina u BAL-u. IgM+ limfociti B, odnosno IgM+ plazma stanice u plućima su malobrojne što rezultira malenim koncentracijama tih imunoglobulina u BAL-u. Povećan udjel IgE+ limfocita B i IgE+ plazma stanica u plućima nalazimo u bolesnika s alergijskim bolestima.

Humoralni odgovor u plućima ovisi, osim o naravi antigena i sudjelovanju antigen predočnih stanica i o pobuđivanju i diferencijaciji limfocita Th2 u regionalnim limfnim čvorovima. Limfociti tipa Th2 luče citokine nužne za proliferaciju i diferencijaciju antigen-specifičnih limfocita B razreda IgM (naivne B-stanice). Dio podraženih limfocita B sazrijeva već u regionalnim limfnim čvorovima i pretvara se u plazma stanice iste antigenske specifičnosti. Drugi dio podraženih limfocita B, te limfocita T ne sazrijeva u

regionalnim limfnim čvorovima, već ih napušta ulazeći potom u cirkulaciju i migrirajući u sluznicu respiratornog sustava na mjesto infekcije. Tu se, uz pomoć podraženih Th2-limfocita, odvija krajnja diferencijacija limfocita B u plazma stanice. Istovremeno s procesom diferencijacije, događa se i proces genskog prespajanja, tj. zamjene imunoglobulinskog razreda uz očuvanje antigenske specifičnosti (18).

Humoralna imunost u tuberkuloznoj infekciji uglavnom je ispitivana zbog imunodijagnostike i otkrivanja antigenih komponenti samog uzročnika. U bolesnika se tijekom tuberkulozne infekcije stvaraju M. tuberculosis specifična protutijela (43). Njihova uloga u obrani domaćina još uvijek nije do kraja razjašnjena. Opisuje se dobra povezanost koncentracije specifičnih imunoglobulina G s težinom kliničke slike same tuberkuloze, tj. što je teža klinička slika tuberkuloze, koncentracija specifičnih imunoglobulina raste.

1.2.4. Citokini

Citokini su hormonima slične glikoproteinske molekule, male molekulske mase (8-25 kDa). Njihova je uloga bitna u započinjanju, trajanju i regulaciji imunološke reakcije. Oni su topljivi u vodi. Luče ih mnogobrojne stanice u organizmu kao odgovor na različite podražaje. Oni omogućavaju komunikaciju među limfocitima, te između limfocita i drugih stanica. U vrlo niskim koncentracijama, citokini imaju brojne biološke učinke. Jedni djeluju na aktivaciju, diferencijaciju i proliferaciju stanica, potiču u stanicama nove funkcije, posreduju ili reguliraju imunološke reakcije ili djeluju kemotaksijski. Drugi inhibiraju rast stanice i djeluju citotoksično (44). Mnogi ih istraživači smatraju lokalnim hormonima jer se luče i djeluju lokalno, a poluživot im je nekoliko minuta. Po svojoj funkciji „komunikacije“ među stanicama predstavljaju molekule s parakrinom ulogom, npr. pomoćnički T-limfociti izlučujujući citokine IL-4, IL-6, IL-13 pomažući diferencijaciju B-limfocita. Također mogu djelovati autokrino, odnosno direktno, kao endogeni faktori na stanicama koje ih luče. Njihova endokrina uloga očituje se utjecajem na hematopoezu u koštanoj srži utjecajem na proizvodnju granulocita i makrofaga (npr. IL-3, IL-5, GM-CSF).

Djelovanje citokina ostvaruje se specifičnim citokinskim receptorima na ciljnim stanicama. Metodama molekularne biologije klonirana je DNA i izolirani stanični receptori brojnih citokina. Receptor na stanici može postojati *a priori* ili se može inducirati nakon podražaja nekim hormonom, antigenom, mitogenom ili drugim citokinom, a može se pojaviti spontano tijekom staničnog ciklusa (45). To je razlog za selektivno djelovanje citokina na određenu staničnu populaciju, tj. djeluju samo na stanice potaknute nekim agensom ili samo na stanice koje se nalaze u određenoj fazi staničnog ciklusa. Nakon vezivanja citokina za određeni receptor, na površini stanice dolazi do pokretanja unutarstaničnog signala (transdukcijski signal) u kojem važnu ulogu imaju enzimi Janus-kinaze. One prenose fosfatne grupe na druge enzime ostvarujući tako amplifikaciju signala potrebnog za aktivaciju drugih enzima koji stvaraju sekundarne glasnike poput inozitoltrifosfata i tako pomažu aktivaciju određenih stanica. Mnogi citokini imaju svojstvo *pleotropizma*, tj. jedan te isti citokin djeluje na više vrsta stanica i ima više različitih učinaka. Pretpostavlja se da je ta oznaka citokina posljedica stalnih promjena u biologiji mikroorganizma kojim oni nastoje izbjeći obranu samog organizma. Također, citokini imaju svojstvo *redundacije*, tj. isto djelovanje na istu stanicu može imati više citokina. Ipak, unatoč svostvu *redundacije*, spektar je djelovanja citokina jedinstven.

Citokini se djele na četiri skupine: interleukine, interferone, citoksine i faktore simulacije kolonija (46). U zadnje vrijeme došlo je do otkrića molekula manje molekulske mase od citokina. Nazivaju se kemokini, a djeluju kemotaksijski.

Interleukini (IL) su citokini koji su dobili takvo ime jer ih luče leukociti i djeluju na leukocite. No, danas se zna da ih mogu lučiti i druge stanice i da djeluju i na neleukocitne stanice (npr. fibroblaste, endotelne stanice, osteoblaste itd.). Poznato je više od 18 interleukina. Dva interleukina luče pretežno monociti-makrofagi (tzv. monokini) i druge akcesorne imunološke stanice (IL-1 i IL-8). T-limfociti i monociti-makrofagi luče IL-6, a ostale luče uglavnom T-limfociti (tzv. limfokini). Centralni je interleukin IL-2 ili hormon rasta T-limfocita. Diobu i rast stimuliranih T-limfocita pomaže IL-12 te aktivira NK-stanice i makrofage. Citokin IL-3 pomaže sazrijevanje ranih prekursora hematopoetskih stanica, a uz IL-7 i nezrelih limfopoetskih stanica. Citokini IL-

4, IL-5 i IL-6 pomažu sazrijevanje B-limfocita nakon njihove stimulacije. Citokin IL-4 prvi je put opisan 1982. godine kao faktor koji potiče antigenom-inducirani rast i diferencijaciju B-limfocita, a izlučuju ga uglavnom T-limfociti, ali i mastociti i bazofili. On djeluje na T- i B-limfocite te na nelimfoidne stanice poput monocita, endotelnih stanica i fibroblasta. Citokin IL-4 potiče ekspresiju važnih kostimulacijskih molekula kao što su CD40, CD80, CD86 i CD23 i pojačava antigen-prezentirajuću sposobnost B-limfocita. Također IL-4 usmjerava izotipsko prespajanje iz IgM u IgE tako da povećava transkripciju teškog lanca ε. Citokini IL-4, IL-5 i IL-6 su uz IL-10 i IL-13 citokini koje luči Th2 subpopulacija CD4+ T- limfocita pomažući tako reakciju humoralne imunosti. Uz to, IL-4 i IL-10 suprimiraju djelovanje subpopulacije Th1 limfocita, potiskujući time reakciju stanične imunosti. Po djelovanju sličan IL-4 jest IL-13, a IL-11 je po djelovanju sličan IL-6. Monociti-makrofagi i dendritičke stanice luče IL-12, a potiče sintezu IFN-γ u T-limfocitima. Citokini IL-12 i IFN-γ inhibiraju Th2 stanice i humoralnu imunost. Faktor rasta limfocita T jest IL-15 i potiče diferencijaciju NK stanica te rast i diferencijaciju limfocita B. Citokini IL-18 i IL-23 izravno potiču sintezu IFN-γ , a isto djeluju i na staničnu imunost.

Interferoni su virusima inducirani proteini, a dijele se na tip I, interferona (IFN-α, β i δ) i tip II. interefrona (IFN-γ). Neimuni interferoni su oni tipa I., a imaju antivirusno djelovanje i inhibiraju rast normalnih i zloćudnih stanica. IFN-γ modulira specifične i nespecifične imunološke reakcije. IFN-γ je pleiotropni citokin koji igra važnu ulogu u imunom i upalnom odgovoru. Prvi ga je identificirao Wheelock 1965. godine kada je označen kao interferon s nespecifičnom zaštitom od viralnih infekcija. On je 10-100 puta manje aktivan u antivirusnom djelovanju od interferona tipa I, ali je 100-10 000 puta moćniji kao imunomodulator. Izlučuju ga T-limfociti i NK stanice. Sintezu i izlučivanje IFN-γ potiče aktivacija tih stanica mitogenima i antigenima u prisutnosti IL-2 i fibroblastnog te epitelnog faktora rasta. Receptore za IFN-γ imaju sve stanice osim zrelih eritrocita, a sam receptor za IFN-γ, u topljivom obliku, fiziološki regulira aktivnost IFN-γ. IFN-γ ima sljedeće učinke: povećava mikrobicidnu aktivnost monocita-makrofaga, potiče sintezu proupalnih citokina (IL-1, TNF-α, IL-6 i IL-8) te proizvodnju kisikovih i dušikovih međuprodukata (slobodni

radikali), povećava izloženost MHC II. antigena i receptora za imunoglobuline (tzv. Fc-receptora) na površini stanice, smanjuje lizozomalni pH, povećava unutarstaničnu koncentraciju određenih antibiotika i inhibira rast B-limfocita potaknutih IL-4 (47). IFN-γ je tipičan citokin za Th1-tip limfocita.

Citoksini su citokini koji djeluju citotoksično poglavito na stanice s unutarstaničnim parazitom. U tu grupu citokina ubrajamo faktor tumorske nekroze-alfa i -beta (TNF-α, TNF-β) s jakim imunomodulatornim, a TNF-α i s jakim proupalnim učinkom. U novije se vrijeme u ovu skupinu citokina ubrajaju i onkostatin M (OM), faktor inhibicije leukemija (LIF) i cilijarni neurotropni faktor (CNTF) čije djelovanje nije još dovoljno istraženo.

Faktori stimulacije kolonija (engl. colony-stimulating factors, CSF) jesu: multi-CSF (IL-3) koji stimulira sazrijevanje hematopoetskih prekursora, faktori koji stimuliraju sazrijevanje prekursora granulocita i makrofaga (GM-CSF) i faktori koji pomažu sazrijevanje granulocitnih (G-CSF) ili monocitnih (M-CSF) prekursora.

Citokini i kemokini vrlo su važni u zaštitnoj imunosti u mikobakterijskoj infekciji koja je ovisna od precizne suradnje T-limfocita i monocita-makrofaga (34). Specifični citokini koji posreduju u imunom odgovoru na M. tuberculosis nisu do kraja definirani, a podaci koje nalazimo jesu kontroverzni. U zadnje vrijeme imamo nekoliko *ex-vivo* studija koje su usmjerene na istraživanje IFN-γ i njegovu ulogu u odgovoru na mikobakterijsku infekciju. CD4+ i CD8+ T-limfociti periferne krvi bolesnika s plućnom tuberkulozom mogu oslobađati IFN-γ. Najnovija istraživanja upućuju da je proizvodnja Th1 citokina (prvenstveno IFN-γ) u mononuklearnim stanicama periferne krvi tuberkuloznih bolesnika snižena, a u samom mjestu bolesti povišena. Istovremeno je djelovanje Th2 imunosupresivnih citokina, IL4 i IL10, manje jasno. Osim IFN-γ, koji je čini se ključni citokin u tuberkuloznoj infekciji, IL-12, IL-18 i TNF-α su važni u obrani organizma od unutarstaničnih patogena pa tako i od M. tuberculosis. Udruženost IFN-γ i IL-12 opažena je u mononuklearnim stanicama periferne krvi tuberkuloznih bolesnika (48) i lokalno na mjestu granulomatozne upale u tuberkulozi (49). Profil IL-12 nije toliko istraživan kao sam IFN-γ, no čini se da njegov nedostatak može pridonijeti razjašnjenju imunopatogeneze rekurentnih tuberkuloza.

Proizvodnja IL-18 zajedno s IL-12 izrazito je povezana s proizvodnjom IFN-γ u odgovoru na mikobakterijalne antigene, a povišena je u perifernoj krvi kroničnih refraktornih tuberkuloznih bolesnika i u tuberkuloznim pleuralnim izljevima. Uloga TNF-α u ljudskoj tuberkulozi važna je u podržavanju bacila u latentnom stadiju, u prilog čemu govore dosadašnja izvješća o reaktivaciji tuberkuloze u reumatoidnom artritisu bolesnika liječenih s anti-TNF-α protutijelima (50). S druge strane, povišena razina TNF-α može biti odgovorna za toksični sindrom, nekrozu tkiva i kaheksiju u sklopu tuberkuloze (34).

T stanična anergija otkrivena u neliječenih tuberkuloznih bolesnika može predodrediti osobe za klinički razvoj bolesti ili biti posljedica same tuberkulozne infekcije. Čini se da je razvoj anergije multifaktorijalan. Jedno poticajno moguće objašnjenje jest proizvodnja supresivnih citokina poput IL-4 kojeg mogu proizvoditi i CD4+ i CD8+ T-limfociti (38,51). S druge strane, neke studije ukazuju na povišenu razinu IL-10 u serumu anergičnih tuberkuloznih bolesnika koji može inhibitorno djelovati na proizvodnju IFN-γ (52).

1.3. Određivanje razine citokina u tjelesnim tekućinama

Metode mjerenja razine pojedinih citokina u tjelesnim tekućinama, od vremena njihovog otkrića, prolazile su put razvoja usporedan s razvojem biotehnologije i tehnike uz nova imunološka saznanja. Danas postoji nekoliko temeljnih metoda koje se rabe za određivanje citokina: nebiološke, biološke, imunocitokemijske metode, metode molekularne biologije te određivanje unutarstaničnih citokina metodom na protočnom citometru. Nebiološkim metodama određujemo prisutnost i količinu pojedinih citokina bez pokazatelja biološke djelotvornosti kao što su ELISA (engl. enzyme-linked immunoabsorbent assay), RIA (engl. radioactive-immuno assay) i ELISpot (engl. enzyme-linked immunospot assay). Biološkim metodama (biotestovi) određujemo pojedine citokine mjereći njihov učinak na ciljnim stanicama. Imunocitokemijske metode i metode molekularne biologije (određivanje glasničke RNA ili odgovarajućih gena) prikladne su za određivanje citokina *in*

situ. Citokini se mogu odrediti i protočnim citometrom. Ta metoda omogućava istovremeno određivanje više citokina unutar jedne stanice, određivanje fenotipa stanica koje proizvode određene citokine i praćenje kinetike sinteze citokina u ispitivanim stanicama. Svaka od ovih metoda odlikuje se određenim prednostima i nedostacima.

Praktično, ove metode možemo podijeliti u dvije grupe: metode kojima određujemo slobodne molekule citokina u tjelesnim tekućinama ili mediju u kojem su stanice kultivirane (ELISA, RIA, ELISpot, biotest) i metode kojima određujemo citokine u citoplazmi pojedinih stanica (imunocitokemijsko određivanje, metode molekularne biologije i na protočnom citometru).

Najpouzdanija je metoda mjerenja citokina obilježavanje na unutarstaničnom nivou. Krajem 80-tih godina prošlog stoljeća uglavnom se rabila mikroskopska metoda za unutarstanično određivanje citokina (imunocitokemijska metoda). Koncem 90-tih, razvoj tehnike molekularne biologije i proizvodnje monoklonskih protutijela, te tehnički napredak protočnog citometra (engl. fluorescence activated cell sorter, FACS) za istovremeno praćenje višestruke fluorescencije dovode do toga da metoda protočne citometrije u određivanju unutarstaničnih antigena, pa tako i citokina, postaje metoda izbora.

1.3.1. Metode za određivanje solubilnih citokina

ELISA je metoda vrlo specifična za kvantitativno određivanje koncentracije otopljenih citokina u tjelesnim tekućinama. Tom metodom ne možemo razlikovati biološki aktivne od neaktivnih citokina kao što se može biološkim metodama. Nadalje, postoji i mogućnost vezanja izlučenih citokina na površinske receptore stanica što može dati nepouzdane vrijednosti o stvarnoj količini određenog citokina. U svojoj osnovi ova metoda koristi protutijela konjugirana s enzimima. Prisutnost i količina mjerene molekule određuje se indirektno preko enzimske reakcije i nastanka produkta. Najjednostavnija izvedba ELISA metode temelji se na tzv. „sendwich-metodi“ gdje se na plastičnoj površini ELISA-pločice nalaze nekovalentno vezana protutijela (engl. capture antibody). Ona, u inkubaciji sa specifičnim antigenom-citokinom, vežu molekule citokina. Na tako vezane molekule

citokina vežu se druga protutijela (engl. detection antibodies) koja mogu biti konjugirana direktno s enzimom ili biotinom. Na molekule biotina, a preko molekula avidina koje imaju visoki afinitet prema biotinu, veže se konjugirani enzim. Kasnije se dodaju molekule supstrata. U toj enzimskoj reakciji dolazi do cijepanja molekula supstrata, a ovisno o količini enzima odnosno količini antigena koji je prisutan u otopini nastaje razgradni produkt kojeg je moguće mjeriti spektrofotometrom.

ELISpot je metoda određivanja sinteze i lučenja različitih produkata *in vitro*. Predstavlja prijelaz u određivanju solubilnih citokina i određivanja proizvodnje citokina na nivou pojedinačne stanice. Analizirane stanice kultiviraju se u pločicama za kultivaciju koje na svojoj površini imaju nekovalentno vezana specifična protutijela za mjereni citokin. Ispitivane stanice stimuliraju se primjerice specifičnim antigenom, inkubiraju i isperu, a potom ponovno slijedi inkubacija s anticitokinskim protutijelima koja na sebi imaju vezani enzim ili biotin. Ona prepoznaju drugu antigensku determinantu traženog citokina. Daljnja obrada pločica za kultivaciju obuhvaća postupke karakteristične za ELISA metodu. Dobiveni rezultati vide se kao točkice (engl. spots) na mjestima na kojima je došlo do enzimske reakcije, odnosno do sekrecije citokina od testiranih stanica. Ovisno o veličini pojedinog mjesta, može se polukvantitativno odrediti količina sintetiziranog citokina.

Biološke metode kvalitativno određuju prisutnost otopljenog citokina sa specifičnim biološkim učinkom na ciljne stanice (npr. proliferacija ili inhibicija proliferacije, kemotaksija, citotoksični stanični odgovor). Problem tih testova može biti u prisutnosti inhibitornih faktora ili mogućeg sinergijskpg djelovanja pojedinih citokina. Metode molekularne biologije vrlo su osjetljive, one mogu kvalitativno odrediti prisutnost glasničke RNA za citokine u pojedinim stanicama. Glavni je nedostatak u interpretaciji rezultata da prisustvo glasničke RNA-citokinske molekule ne znači, ujedno, i sintezu proteina (53).

1.3.2. Određivanje unutarstaničnih citokina

Poznato je da različite stanice luče različite citokine pa se tako javila i potreba za određivanjem ne samo vrste i količine nekog citokina nego i fenotipa stanica koje ga proizvode. Količinu različitih citokina moguće je određivati u gotovo svim stanicama viših eukariota, a najčešće se određuju u mononuklearnim stanicama (limfocitima). Od metoda za određivanje unutarstaničnih citokina najčešće rabimo imunocitokemijsko određivanje i metodu na protočnom citometru.

Imunocitokemijsko određivanje citokina jedna je od najranijih metoda kojom se određuje sinteza citokina u pojedinim stanicama. Ona se svojim osnovnim načelima i postupcima podudara s imunohistokemijskom metodom obilježavanja tkivnih preparata. Stanice za imunocitokemijsko određivanje citokina pripremaju se po protokolu, uz neke male izmjene, kao i za određivanje unutarstaničnih citokina na protočnom citometru. U sklopu ove metode rabimo dvije detekcijske tehnike: enzimska reakcija i imunofluorescencija. Enzimska tehnika (npr. peroksidaza) visoko je osjetljiva, omogućava kontrolu enzimske reakcije i stabilnost enzimskog produkta na mjestu nastajanja tako da se dobiju jasno locirani i uočljivi signali na mjestu taloženja. Tehnika imunofluorescencije sastoji se od vezivanja specifičnih protutijela konjugiranih s fluorescentnim bojama, a nakon pobude svjetlošću određene valne duljine emitiraju fluorescentno svijetlo više valne duljine. Analiza dobivenih podataka izvodi se na fluorescentnom mikroskopu prebrojavanjem stanica i određivanjem postotka stanica koje proizvode citokine.

Metoda na protočnom citometru rabi istu detekcijsku tehniku fluorescencije nakon vezivanja specifičnih protutijela konjugiranih s fluorokromom, ali je razlika u analitičkoj metodi. Protočni citometar, pomoću ugrađenog optičkog sustava, omogućava istovremeno praćenje više staničnih parametara (stanične morfologije) i specifičnih signala fluorescencije nakon vezanja fluorokromom obilježenih protutijela. Osim toga, većoj preciznosti dobivenih podataka o sintezi unutarstaničnih citokina doprinosi jednostavna automatska obrada podataka i postavljanje vrijednosti granice nespecifične autofluorescencije. Određivanjem jakosti fluorescencije, koja odgovara količini

sintetiziranog citokina po stanici, moguće je polukvantitativno odrediti doprinos pojedinih stanica ukupnoj sintezi citokina i kinetiku proizvodnje citokina nakon stimulacije (54).

Da bi se mogla odrediti prisutnost nekog citokina u stanici nužno je zadovoljiti određene preduvjete. Prvi, ali ne i najvažniji preduvjet kojim ćemo pouzdanije utvrditi koje su stanice sposobne lučiti citokine jest stimulacija stanica. T-limfociti važni su u stečenoj imunosti, direktno i indirektno u staničnoj imunosti, a potpomažu i razvoj humoralne imunosti. U tim staničnim suradnjama vrlo su važni citokini koje proizvode stimulirani T-limfociti. Općenito je prihvaćeno da nestimulirani T-limfociti iz periferne krvi ne sintetiziraju citokine, a broj tih stanica u smislu bazične sinteze citokina relativno je nizak (55). U tijeku patološkog procesa broj se stanica koje proizvode citokine povećava, no taj broj i dalje ostaje relativno nizak nakon specifične stimulacije antigenom. Danas se uglavnom rabi kratkotrajna poliklonska stimulacija koja potiče sintezu onih citokina za koje već postoji prepisana mRNK, iako za duže vrijeme ta ista stimulacija može dovesti do transkripcije gena i za druge citokine što se podudara s usporedbom sinteze citokina na nivou mRNK molekula (56). Također, uočeno je da *in vitro* aktivirani CD4+ i CD8+ T-limfociti nakon ponovne stimulacije brže sintetiziraju IFN-γ i IL-4 postižući maksimalnu proizvodnju već nakon 6-8 sati kultivacije, za razliku od primarne stimulacije u kojoj je maksimalna proizvodnja citokina zabilježena nakon 30 sati kultivacije, što najvjerojatnije uključuje i vrijeme potrebno za transkripciju citokinske mRNK molekula (54). Tako se potvrđuje da kratkotrajna poliklonska stimulacija T-limfocita potiče ekspresiju isključivo onih citokina za koje već postoji prepisana genska uputa u obliku mRNK u tim stanicama.

Kratkotrajna poliklonska stimulacija limfocita bazira se na nespecifičnoj aktivaciji limfocita određenim kemijskim spojevima koji oponašaju zbivanja do kojih dolazi pri specifičnoj aktivaciji T-limfocita putem TCR-kompleksa. Najčešće je korištena poliklonska stimulacija s forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA, engl. phorbol myristate acetate) i ionomicinom. Molekula PMA po svojoj je strukturi slična diacilglicerolu, sekundarnom glasniku transdukcijskog signala koji nastaje cijepanjem fosfolipida fosfolipazom C, sposoban je

aktivirati protein kinazu C. Ionomicin se rabi u kultivaciji s PMA jer dodatno stimulira limfocite djelujući na propusnost kalcijevih kanala.

Da bi se unutarstanični citokini mogli odrediti, nužno je stimulacijom povećati broj citokinskih molekula. Tako signal postaje jasniji i jači (npr. intenzivnija obojanost nakon cijepanja supstrata enzimom ili primjerice fluorescencije pri uporabi fluorescentnih spojeva kao obilježivača). Time se izbjegava mogući neželjeni nespecifični efekt, odnosno izdvaja se specifični signal. Za postupak određivanja unutarstaničnih citokina koriste se i inhibitori proteinske sekrecije. Za inhibitor proteinske sekrecije najčešće rabimo brefeldin A (BFA) koja sprečava prijenos proteina iz endoplazmatske mrežice u Golgijev aparat (57). BFA sprečava ekspresiju ranog aktivacijskog biljega CD69 nakon poliklonske stimulacije blokirajući transport sintetiziranog proteina na površinu, ne utječući pritom na sintezu samog proteina. Prednost BFA pred drugim inhibitorima proteinske sekrecije u njegovoj je manjoj toksičnosti za stanice.

Za detekciju unutarstaničnih antigena nužna je njihova dostupnost. Za to je potrebno „otvoriti“ stanične membrane i izložiti unutrašnjost stanice monoklonskim protutijelima za pojedine antigene. Taj se proces zove permeabilizacija stanične membrane, a za nj rabimo različita organska otapala i detergente. Organska otapala inače se tradicionalno rabe u imunohistokemijskom određivanju unutarstaničnih antigena, a detergenti su iskazali bolja svojstva pri određivanju unutarstaničnih antigena protočnim citometrom. Naime, svojstvo detergenata jest da ne narušavaju veličinu i zrnatost stanica koji su osnovni parametri za određivanje heterogenih staničnih populacija. Najčešće je rabljeni detergent saponin koji reverzibilno otvara pore stanične membrane vežući molekule kolesterola, a pretpostavlja se da tako omogućuju prodiranje monoklonskih protutijela u unutrašnjost stanice. Izostanak prethodnog izlaganja permeabilizacijskoj otopini sprječava obilježavanje unutarstaničnih antigena (58).

Stanice je, također, potrebno fiksirati da bi smo sačuvali staničnu morfologiju. Izbor najboljeg kemijskog fiksativa i radne koncentracije ovise, ne samo o uspješnosti zadržavanja veličine i zrnatosti same stanice, nego i o minimalnom utjecaju na antigeničnost proteina. Fiksativi su jednostruko i dvostruko funkcionalni aldehidi koji reagirajući s amino-grupama proteina

stvaraju kovalentne veze i tako učvršćuju staničnu ultrastrukturu. Najčešće korišteni fiksativi jesu paraformaldehid i glutaraldehid koji pokazuju dobra svojstva u očuvanju stanične morfologije i nepromjenjivosti površinskih i unutarstaničnih antigena.

Razvoj tehnologije proizvodnje specifičnih monoklonskih protutijela za pojedine citokine osnovni je preduvjet za razvoj detekcijskih imunofluorescentnih i/ili imunoenzimskih tehnika i uspješno određivanje sinteze citokina unutar stanice. Bez obzira na odabranu tehniku, protokol za određivanje unutarstaničnih citokina sastoji se od nekoliko faza:

1. faza: obilježavaju se karakteristični membranski stanični biljezi protutijelima za određivanje staničnog fenotipa.

2. faza: vrši se fiksacija stanica npr. formaldehidom za očuvanje stanične strukture (ovisno o metodi može biti na mikroskopskom predmetnom staklu ili u staničnoj suspenziji).

3. faza: vrši se permeabilizacija stanične membrane detergentom (npr. saponin).

4. faza: nastaje blokada unutarstaničnog nespecifičnog vezanja protu-citokinskog protutijela za komponente staničnog citosola (poliklonski serum).

5. faza: obilježavaju se unutarstanični citokini visokospecifičnim monoklonskim protutijelima konjugiranim fluorescentnim spojevima (ili peroksidazom za imunocitokemijsko određivanje unutarstaničnih citokina).

6. faza: analiziraju se stanice protočnim citometrom ili na fluorescentnom mikroskopu.

1.4. Tuberkuloza

1.4.1. Epidemiologija tuberkuloze

M. tuberculosis je, slikovito rečeno, jedan od najuspješnijih bakterijskih patogena u povijesti čovječanstva. Usprkos antituberkuloznim lijekovima koji su dostupni više od 50 godina, M. tuberculosis je i dalje golema opasnost za ljudsko zdravlje. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) procjenjuje da je između 19 i 43% svjetske populacije zaraženo s M. tuberculosis, da godišnje ima više od osam milijuna novooboljelih od tuberkuloze, a tri milijuna oboljelih

umre od te bolesti. Prema procjeni SZO-e, u svijetu će biti 2005. godine10,2 milijuna novooboljelih od tuberkuloze (59). Približno 95% tuberkuloznih bolesnika i 98% smrtnih ishoda tuberkuloze događa se u zemljama u razvoju, gdje su terapijske mogućnosti ograničene, gdje je bolest često udružena s infekcijom virusom humane imunodeficijencije (HIV). Ekonomski utjecaj tog patogena naročito je velik jer HIV najčešće napada osobe u najproduktivnijim godinama njihovog života (20,59,60). S druge strane, veliki problem danas je i rezistentna tuberkuloza, tj. tuberkuloza rezistentna na liječenje antituberkuloznim lijekovima.

Najveća je incidencija tuberkuloze u zemljama Azije i Afrike, kreće se od 100-250/100 000 stanovnika. U europskoj je regiji najveća incidencija tuberkuloze u Rusiji i drugim zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza. Siromašni društveni slojevi, kao i neadekvatno smještene osobe, npr. zatvorenici u Rusiji, naročito su pogođeni tuberkulozom. Tako, u Rusiji ima 1,1 milijun zatvorenika od kojih je 10-20% oboljelih od tuberkuloze. Istovremeno, zamjećuje se i brzi porast broja oboljelih od HIV/AIDS koji su zaraženi s M. tuberculosis. Premda je incidencija tuberkuloze u Zapadnoj Europi u sporom padu i manja je od 20/100 000 stanovnika, relativno visok stupanj zaraženih i danas nalazimo u migranata i izbjeglica iz drugih zemalja. Tako u Njemačkoj imamo 30% novih slučajeva tuberkuloze u toj populaciji stanovništva, a istovremeno je incidencija tuberkuloze, u današnje vrijeme, u Njemačkoj 9/100 000 (60). Velika epidemija tuberkuloze u Hrvatskoj počela je početkom 19. stoljeća, 100 godina kasnije negoli u zapadnoj Europi. U Republici Hrvatskoj incidencija tuberkuloze bila je najviša 1993. godine (vrijeme Domovinskog rata). Iznosila je 48/100 000. Od tada se prati postupni pad incidencije tuberkuloze koja je 2002 g. iznosila 36/100 000, a smrtnost od te bolesti bila je 3,7/100 000 stanovnika. Udio rezistentne tuberkuloze u Hrvatskoj iznosi 3% oboljelih, a multirezistentne 0,6%, po čemu Hrvatsku ubrajamo u zemlje s niskim udjelom rezistentne tuberkuloze (u nekim dijelovima svijeta udio oboljelih od rezistentne tuberkuloze iznosi i do 40%) (61).

1.4.2. Etiologija tuberkuloze

Tuberkuloza je kronična granulomska upala poznatog uzroka. Uzročnici su tuberkuloze u ljudi M. tuberculosis i M. bovis. M. bovis uzrokuje bolest goveda i drugih sisavaca, a ljudi se zaraze pijenjem zaraženog mlijeka. Rijetko se događa prijenos M. bovis s čovjeka na čovjeka. M. tuberculosis je češći uzročnik tuberkuloze u ljudi. On je fakultativno unutarstaničan, aeroban, acidofilni bacil, prirodno patogen samo za ljude (20,61).

Klinički je značajna podjela na patogeni humani i bovini soj (M. tuberculosis i M. bovis), atipične mikobakterije i BCG bovini soj. Izraz *tuberkuloza* rabi se samo za zarazu i bolest uzrokovanu s M. tuberculosis i M. bovis. Zaraze drugim mikobakterijama i posljedičnim oboljenjima označavaju se kao *mikobakterijske bolesti* ili *mikobakterioze*. U organizmu se može naći i BCG bovini avirulentni soj. Intrakutanim davanjem vakcine unosi se u organizam tri milijuna živih atenuiranih bacila koji dospiju do regionalnih limfnih čvorova gdje dugotrajno perzistiraju (62).

M. tuberculosis se najčešće, s osobe na osobu, prenosi kapljičnim putem, odnosno iz dišnog sustava nositelja zaraze u dišni sustav primatelja. Drugi putovi prijenosa rijetki su i nemaju kliničku važnost. Izvor je zaraze bolestan čovjek (naročito su zarazni bolesnici s tuberkulozom larinksa) u čijem iskašljaju nalazimo bacile tuberkuloze. Zaraznost ovisi o broju bacila u iskašljaju, proširenosti bolesti i učestalosti kašlja. Najzarazniji su bolesnici s nalazom M. tuberculosis u izravnom mikroskopskom pregledu iskašljaja. Da bi netko bio «mikroskospki pozitivan» mora imati 100 000 bacila u jednom cm^3 iskašljaja. Takvi bolesnici zaraze 80% stanovništva.

1.4.3. Patogeneza plućne tuberkuloze

Infekcija s M. tuberculosis obično se događa kapljičnim putem, inhalacijom aerosoliziranih čestica veličine 1-5 μm, koje sadrže dva do tri bacila M. tuberculosis. Premda tuberkuloza može zahvatiti bilo koji organ u organizmu, pluća su najčešće ulazna vrata samog bacila i mjesto kasnijeg razvoja bolesti. Ekstrapulmonalna tuberkuloza razvija se u manje od 10% svih oboljelih. Probijanjem nespecifične obrane gornjih dišnih putova bacil

tuberkuloze dospijeva u alveole. Hoće li inhalirani tuberkulozni bacil uspostaviti infekciju u plućima ovisi o virulenciji bacila i mikrobicidnoj sposobnosti alveolarnih makrofaga. Tako, infekcija s M. tuberculosis može teći u četiri različita razvojna pravca (17,19,63). Početni odgovor može biti potpuno djelotvoran i uništiti sve bacile. Bolest tada nema mogućnosti razvoja u skoro vrijeme. Drugo, M. tuberculosis može se množiti i rasti odmah nakon infekcije uzrokujući bolest klinički poznatu kao primarnu tuberkulozu. Treća mogućnost je da bacili postanu «spavači» koji ne uzrokuju bolest, ali razvijaju latentnu infekciju koja se iskazuje samo pozitivnom tuberkulinskom kožnom reakcijom. Četvrta mogućnost je da M. tuberculosis u latentnoj infekciji najednom počne rasti i množiti se što klinički rezultira bolešću poznatom kao reaktivacija tuberkuloze ili postprimarna tuberkuloza. Aktivnu bolest tijekom svog života razvije 5-10% bolesnika s latentnom infekcijom.

Ako bacili tuberkuloze prežive početnu obranu organizma mogu se dalje dijeliti unutar alveolarnog makrofaga. Bacili tuberkuloze unutar makrofaga rastu sporo, dijeleći se prosječno svakih 25 sati, najviše 32 sata. Zbog slabe primarne toksičnosti ne izazivaju odmah reakciju organizma. Stanični imuni odgovor pokreće se kada broj mikroorganizama u plućima dosegne broj od 10^3 do 10^4. To se obično događa drugog do dvanaestog tjedna nakon infekcije, a potvrđuje se pozitivnom kožnom reakcijom na tuberkulin (20). Sa stajališta patologije, uspješan završetak primarne tuberkuloze označen je stvaranjem tuberkla ili hipersenzitivnog granuloma. Granulom je znak tkivnog odgovora na M. tuberculosis, a sastoji se od makrofaga, limfocita, plazma stanica i fibroblasta. Makrofagi u granulomu mogu narasti (hipertrofirati, epiteloidne stanice), tada dolazi do povećanje citoplazme i citoplazmatskih organela. Te morfološke promjene nazivaju se „epiteloidne stanične formacije“. Drugi tip stanica karakterističan za granulomatoznu upalu su multinuklearne gigantske stanice koje nastaju spajanjem epiteloidnih stanica i odraz su krajnjeg stadija makrofagne diferencijacije (Langhansove stanice). Obilježje je bacila tuberkuloze da perzistira i dovodi do kronične T stanične aktivacije što, u konačnici, rezultira granulomatoznom upalom. Taj tip upale u tuberkulozi udružen je s nekrozom i destrukcijom tkiva, za što su odgovorni određeni citokini poglavito TNF-α.

1.4.4. Imunologija tuberkuloze pluća

Stanični imuni odgovor, sastavljen od mononuklearnih stanica i T-limfocita, odgovoran je za kontrolu tuberkulozne infekcije. Ta saznanja temeljena su na životinjskim modelima i kliničkim opažanjima u ljudi. Svaka infekcija bacilom tuberkuloze ne završava razvijanjem same bolesti. Oko 90% osoba inficiranih s M. tuberculosis neće nikada razviti kliničku sliku bolesti (tuberkuloze). To opažanje jasno ukazuje da je prirođeni i stečeni imuni odgovor organizma dostatan za kontrolu takve infekcije.

Ljudski se organizam najčešće zarazi bacilom tuberkuloze putem respiratornog sustava. Dospjevši u alveole, M. tuberculosis se veže preko staničnih površinskih receptora za AM. Receptori na samom makrofagu, preko kojih dolazi do tog vezanja jesu slijedeći: receptori za komplement-CR1, CR3, CR4; manoza receptori-glikoprotein lipoarabinomanan; surfaktantni proteinski receptori; molekula CD14 te receptori za konstantnu regiju imunoglobulina (FcRs). U novije su vrijeme otkriveni transmembranski proteini, članovi IL-1 receptorske familije makrofaga, tzv. „Toll-like receptori“ (TLR). Prema dosadašnjim se saznanjima čini da vezanje bacila M. tuberculosis za određeni tip receptora na AM-u usmjerava daljnji tijek imunološke reakcije (2). Primjerice, vezanje samog bacila za TLR i FcRs makrofaga potiče mehanizme obrane organizma na M. tuberculosis. S druge strane, ulazak bacila tuberkuloze u makrofag putem receptora za komplement i manoza receptora promovira mikobakterijsko preživljavanje. Isto tako, sam tuberkulozni bacil koji inficira makrofage razvija nekoliko načina za izbjegavanje ranoga unutarstaničnog ubijanja. Ti mehanizmi uključuju razvijanje otpornosti na reaktivne kisikove radikale, inhibiciju fagosomo-lizozomskog spajanja i inhibiciju acidifikacije fagosoma. Tako u organizmu inficiranom s M. tuberculosis postoji stalni dinamički proces u kojem, s jedne strane organizam nastoji eliminirati sami bacil, a s druge strane sami bacil koji nastoji „izigrati“ imunološku obranu organizma.

Prema tome, M. tuberculosis koristi makrofag kao svoje prebivalište, a sam makrofag dalje utječe na njegovo preživljavanje. Makrofag kao profesionalni fagocit ubrzava utok antigena preko svojih receptora, prerađuje ih, a potom inducira daljnju obranu organizma. Početna aktivacija i citokinski

odgovor makrofaga na M. tuberculosis uglavnom je posredovan međudjelovanjem s TLR-a (2,4). Ti inflamatorni citokini i kemokini služe kao znakovi infekcije. Samo sazrijevanje makrofaga potpomognuto je aktivacijom s TNF-α i IFN-γ. Spomenuti citokini stimuliraju antimikobakterijske mehanizme u makrofagu, a naročito reaktivne kisikove i dušikove spojeve. Nije jasno koji još mehanizmi u alveolarnom makrofagu dovode do ubijanja M. tuberculosis. Čini se da su u tom slučaju važni indukcija apoptoze i ubijanje zaraženog makrofaga „injekcijama“ perforina i granulizina. Uloga reaktivnih dušikovih spojeva u kontroli i ubijanju M. tuberculosis kontroverzna je, unatoč brojnim životinjskim modelima koji podupiru tu hipotezu. Međutim, uz sve te mehanizmima aktivirani makrofagi nisu u stanju eradicirati M. tuberculosis iz organizma. Perzistentni bacili mogu preći u stanje „spavanja“, kada imaju reduciranu metaboličku aktivnost. Ti bacili mogu perzistirati, a da ne izazovu klinički izraženu bolest. Takvo je stanje je poznato kao latencija, a u oko 10% takvih osoba u kasnijem životu razvija se postprimarna tuberkuloza.

Preživjeli i prerađeni mikobakterijski antigeni u alveolarnom makrofagu zahtijevaju daljnji razvoj imunološke reakcije putem konvencionalnih i nekonvencionalnih T-limfocita (2,63). Inducirani unutarstanični signali rezultiraju u nakupljanju makrofaga deriviranih od monocita i dendritičkih stanica na mjesto upale u plućima. Način na koji se prenosi signal iz alveolarnih makrofaga na dendritičke stanice za sada nije potpuno poznat. Zna se da patogen obitava u makrofagu gdje različiti mikobakterijski antigeni pristupaju različitim molekulama na njegovoj površini potičući tako imunološku reakciju. Tako su 19 kDa lipoprotein i glikolipid lipoarabinomanan antigeni M. tuberculosis najpotentniji induktori T-staničnog odgovora i citokinske sekrecije. Najnovije studije pokazale su da te antigene komponentne M. tuberculosis potiču imunološki odgovor međudjelovanjem s TLR-om (4). Mikobakterijski peptidi pristupaju molekulama MHC II. razreda i stimuliraju CD4+ T-limfocite. Na fagosomu se također nalaze i CD1 molekule kojima pristupaju mikobakterijski glikolipidi. Skupina 1 CD1 molekula uključuje CD1a, CD1b i CD1c molekule. CD1 molekule prikazuju se na različitim intracelularnim mjestima. CD1a se iskazuje na staničnoj površini u ranom stadiju endosoma, CD1b primarno obitava kasnije u endosomu/lisozomu, a CD1c na staničnoj površini endosoma na kraju sazrijevanja. Molekule CD1

prezentiraju mikobakterijske glikolipide različitim CD1-spregnutim T-limfocitima (CD4+,CD8+ ili dvostruko negativnim). Patološki put vezanja za γδ T-limfocite i MHC I. razreda spregnutih T-limfocita je manje jasan. Mikobakterijski fosfoligandi dolaze do stanične površine nepoznatim putem gdje bivaju, bez prisutnosti specijaliziranih molekula, prepoznati od strane γδ T-limfocita. Premda je jasno da CD8+ T-limfociti prepoznaju antigen u sklopu molekula MHC I. razreda, podloga tog mehanizma još nije ustanovljena. Poznato je da neki mikobakterijski proteini mogu ući u citosol i predstaviti se molekulama MHC I. razreda. S druge strane, mikobakterijski peptidi i glikolipidi mogu se premjestiti u vezikule. Čini se da se tako grupirani antigeni mogu prenijeti novim patofiziološkim mehanizmom s inficiranih makrofaga do dendritičkih stanica. Dendritičke stanice, u kojima se sada nalaze mikobakterijski antigeni, migriraju u regionalne limfne čvorove. Tamo se nalaze zreli CD4+ i CD8+ T-limfociti koji su senzibilizirani na mikobakterijske antigene (nakon primoinfekcije). Zreli T-limfociti ekspandiraju i migriraju natrag u pluća. Kroz plućno tkivo dolaze na mjesto infekcije vjerojatno kao odgovor na signale poput citokina koje proizvode inficirani makrofagi ili su posljedica odgovora na njih. Migracija makrofaga i T-limfocita (isto tako i B-limfocita) na mjesto infekcije kulminira razvojem granuloma koji je karakterističan znak tuberkuloze (64).

Granulom koji se formira u odgovoru na M. tuberculosis sastavljen je od makrofaga koji se mogu diferencirati u epiteloidne stanice ili multinuklerne orijaške stanice, CD4+ i CD8+ T-limfocita i B-limfocita. Relativan omjer različitih stanica u granulomu varira s obzirom na njegovu starost. Tako formirani granulom sprečava širenje bacila tuberkuloze i olakšava međudjelovanje i funkcioniranje T-limfocita, makrofaga i citokina. T-limfociti fenotipa Th1 (poglavito CD4+) proizvode IFN-γ koji aktivira makrofage i potiče njihovu mikrobicidnu aktivnost, a smatra se ključnim citokinom u odgovoru na tuberkulozu (63,64). Th2 citokini, kao što su IL-4 i IL-10 oskudni su, iako nisu uvijek potpuno odsutni. Diferencijacija CD4+ T-limfocita u Th1 događa se u okruženju citokina IL-12 i IL-18 i kostimulatornih molekula. To okruženje je djelomično inducirano izravno TLR-a na makrofagu. Drugi citokini, naročito TNF-α i limfotoksin (LT)- α3, sudjeluju u stvaranju i održavanju strukturnog

integriteta granuloma. CD8+ T-limfociti mogu lizirati inficirane makrofage i uništiti unutarstanični bacil tuberkuloze. CD8+ T-limfociti mogu olakšati premještanje mikobakterijskih antigena s funkcionalno manje osposobljenih prema profesionalnijim efektorskim stanicama. Novija istraživanja pokazuju da se na površini ljudskih CD8+ T-limfocita izražavaju molekule perforina i granulizina te tako izravno ubijaju makrofag inficiran s M. tuberculosis. S druge strane, CD8+ T-limfociti potiču ubijanje inficiranog makrofaga apoptotičkim mehanizmima. Čini se da nekonvencionalni T limfociti sa specifičnošću za glikolipide, koji se prezentiraju s CD1 molekulama, imaju jedinstvenu ulogu u ljudskoj tuberkulozi. Općenito, CD1-glikolipid-specifični T-limfociti proizvode IFN-γ i iskazuju citolitičku aktivnost. Također i $\gamma\delta$ T-limfociti sudjeluju u imunom odgovoru na M. tuberculosis. Ti su limfociti stimulirani jedinstvenom grupom neproteinskih antigena koji sadrže fosfate. Fosfoligandi stimuliraju $\gamma\delta$ T-limfocite tako da oni iskazuju Vγ2δ2 kombinaciju lanaca nezavisno od njihove antigene specifičnosti. Spomenuti $\gamma\delta$ T-limfociti proizvode IFN-γ nakon stimulacije s fosfoligandima i izražavaju o granulama-zavisnu mikobaktericidnu aktivnost. Čini se da su ti limfociti odgovorni za prvu liniju obrane od tuberkuloze.

Prema tome, granulom „nastoji“ kontrolirati i zaustaviti daljnje širenje M. tuberculosis. Međutim, neki bacili izbjegavaju eliminaciju unutar granuloma te dolazi do daljnjeg širenja bolesti. Umnažanje bacila tuberkuloze, čini se, rezultira gubitkom granulomske strukture i nastajanjem nekroze i kavitarnih formacija. To se, primjerice, događa u oboljelih od AIDS-a kada je deplecija CD4+ T-limfocita ili u slučajevima neutralizacije TNF-α, primjerice u liječenju nekih bolesti protutijelima protiv TNF-α (65). U slučaju deplecije CD4+ T-limfocita „funkcija“ granuloma u kontroli M. tuberculosis nije više učinkovita. M. tuberculosis se počinje umnažati, proizvodnja IFNγ može se smanjiti, a makrofagi su manje aktivirani. Funkcija zida granuloma kod neutralizacije TNF-α mijenja se možda pod utjecajem citokinske disregulacije, a sami makrofagi nisu više tako aktivirani. Ti defekti dovode do disregulacije granuloma koji je, u tom slučaju, manje sposoban kontrolirati infekciju.

1.4.5. Klinička slika tuberkuloze

Primarna tuberkuloza nastaje neposredno nakon zaraze bacilom tuberkuloze. Karakterizira ju trijas primarnog kompleksa: primarno tuberkulozno žarište, limfangitis i regionalni limfadenitis. Klinički nezapaženo prolazi u 95% inficiranih, uglavnom s manjim poremećajem općeg stanja. Konačan ishod takvog tijeka bolesti uglavnom je dobar, a vidljive promjene završavaju fibrozom i kalcifikacijom koje traju godinama. Manji broj primarnih tuberkuloza poprima maligni tijek bolesti. Klinička slika takve tuberkuloze praćena je burnim općim i respiratornim tegobama, a patohistološki se manifestira kao primarna kaverna ili kao primarna kazeozna pneumonija. Simptomi su bolesti kašalj, hemoptize, zaduha, povišena tjelesna temperatura i opće loše stanje. Znak su oslabljene imunološke otpornosti, a najugroženija su djeca i imunodeficijentne osobe.

Nepovoljan ishod primarne tuberkuloze nastaje kad dolazi do prodora M. tuberculosis u krvne žile i hematogenog rasapa (milijarna tuberkuloza) ili pak kada limfni čvorovi perforiraju u bronhe i tako dolazi do bronhogene diseminacije bolesti. Simptomi bolesti mogu biti opći uz izraženu visoku temperaturu, tresavicu ili vezani uz zahvaćeni organ (meningealni, plućni, opći infektivni sindrom i intoksikacija). U milijarnoj tuberkulozi radiološki je vidljiv mikronodularni rasap, a patohistološki granulomatozna reakcija s nekrozom.

Komplikacije primarne forme tuberkuloze mogu biti rane i kasne. Neposredne komplikacije uključuju bronhopneumoniju, pleuralne izljeve i diseminiranu bolest. Kasne komplikacije primarne tuberkuloze najčešće su bronhiektazije. One nastaju zbog dugotrajnije atelektaze određenog plućnog režnja, a zbog pritiska odreženog bronha s limfnim čvorovima.

Postprimarna tuberkuloza oblik je bolesti koji nastaje nakon primoinfekcije i nakon što se razvila stečena otpornost na M. tuberculosis. Čimbenici koji utječu na razvoj kliničke slike tuberkuloze ovisni su o samom bolesniku (imuni status, malnutricija, koegzistentne bolesti, imunizacija s BCG) i o samom M. tuberculosis poput virulencije mikroorganizma i interakcija između organizma i samog bacila (mjesto zahvaćenosti i uznapredovalost bolesti). Prije epidemije HIV infekcije prosječno 85%

tuberkuloznih slučajeva bilo je ograničeno na pluća, a ostalih 15% bila je neplućna tuberkuloza ili kombinacija plućne i neplućne bolesti. Sa širenjem HIV infekcije nalazimo plućnu tuberkulozu u 38% oboljelih, neplućnu u 30% i kombinaciju ta dva oblika u 32% slučajeva (20).

Simptomi infekcije, u prvom redu, ovise o proširenosti bolesti. U početnom stadiju bolesti simptomi su blagi, teško se mogu razlikovati od drugih bakterijskih infekcija. Širenjem infekcije simptomi postaju sve izraženiji, a opće stanje bolesnika sve lošije. Početni sistemski učinci tuberkuloze jesu povišena tjelesna temperatura, gubitak apetita, umor, noćno znojenje, a ponekad se nađu i uvećani periferni limfni čvorovi. Ako se infekcija u ovom stadiju ne otkrije, bolest se širi, simptomi postaju izraženiji. Najznačajnija hematološka oznaka tuberkuloze je porast leukocita u perifernoj krvi i anemija. Te promjene događaju se u 10% oboljelih. U perifernoj krvi rijeđe nalazimo porast monocita ili eozinofila ili pak pancitopeniju koja se događa kada je koštana srž zahvaćena bolešću. Hiponatremija, koju nalazimo u 11% oboljelih uzrokovana je s proizvodnjom antidiuretskom hormonu slične tvari koju nalazimo u bolešću pogođenom plućnom tkivu (66).

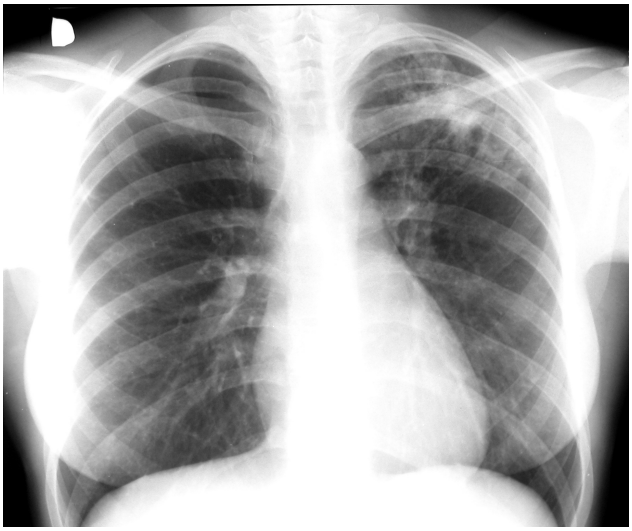
U mnogih je bolesnika tuberkuloza udružena s drugim ozbiljnijim bolestima, primjerice onima poput HIV infekcije, alkoholizma, kroničnog bubrežnog oštećenja, šećerne bolesti, zloćudnih bolesti, te drugih bolesti koje zahtijevaju imunosupresivnu terapiju. Te bolesti svojom simptomatologijom mogu prikriti kliničku sliku tuberkuloze, koja se tada kasnije i dijagnosticira (poglavito u bolesnika s HIV infekcijom).

Najvažniji je simptom plućne tuberkuloze kašalj. U ranoj fazi bolesti obično je neproduktivan, ali postupno s razvojem upale i tkivne nekroze postaje produktivan. Hemoptize mogu biti posljedica aktivne tuberkuloze, ali i rezultat rezidua po preboljeloj tuberkulozi. Inflamacija plućnog parenhima u blizini pleure može rezultirati pleuralnom boli, a u uznapredovaloj formi plućne tuberkuloze imamo izraženu i dispneju.

Plućna tuberkuloza skoro uvijek uzrokuje i promjene na plućima koje se vide radiografski. Promjene u obliku kavitacija obično u gornjim plućnim režnjevima jednog ili oba pluća vrlo su specifične za postprimarnu tuberkulozu (slike 1i 2). Progresijom bolesti, inficirani materijal može se širiti bronhima u druge djelove pluća uzrokujući bronhopneumonična žarišta ili

krvlju uzrokovati milijarnu tuberkulozu (mikronodularni rasap). Preboljela tuberkuloza radiološki se očituje u različitim oblicima. Plućni čvorići i fibroza s kalcifikatima ili bez njih obično se vide u gornjim režnjevima. Kasne posljedice tuberkuloze mogu biti bronhiektazije, te fibrotoraksi kao posljedica preboljele tuberkuloze pleure.

Hematogenim rasapom plućne tuberkuloze bolest se može proširiti u bilo koji organ ljudskog organizma (serozne ovojnice, kosti, suprarenalne žlijezde, gastro-intestinalni sustav, središnji živčani sustav i genito-urinarni sustav). Klinički simptomi jesu sistemski i specifično su vezani za afektirani organ.



Slika 1. Tipični radiološki nalaz u postprimarnoj tuberkulozi (blaga forma)



Slika 2. Tipični radiološki nalaz u postprimarnoj tuberkulozi (uznapredovala forma)

1.4.6. Dijagnostički postupci u tuberkulozi

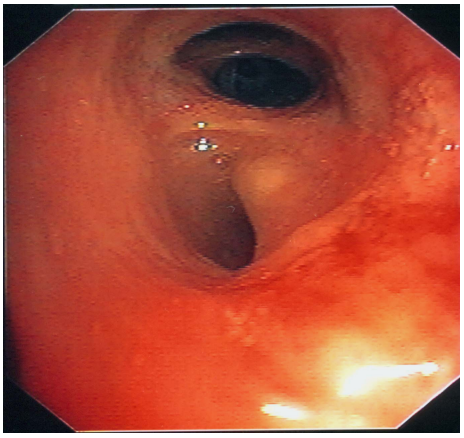
Dijagnoza tuberkuloze postavlja se na temelju anamneze i epidemioloških podataka, kliničke slike bolesti, laboratorijskih pretraga krvi, bakterioloških, imunoloških i radioloških pretraga. U nekim slučajevima bolest se dokazuje histološki, a materijali se obično uzimaju prilikom bronhoskopije (slika 3B).

Uz detaljan klinički pregled, važne podatke od bolesnika sa sumnjom na tuberkulozu dobijemo iz anamneze koja se odnosi na tijek bolesti i epidemiološko stanje. Za te bolesnike važno je znati podatke o njihovom socijalno-ekonomskom stanju, izvoru infekcije (oboljeli u bližoj okolini) i pridruženim bolestima. Od već liječenih bolesnika treba dobiti podatke o dužini dosadašnjeg liječenja, terapiji, bacilarnosti i rezistenciji na pojedine antituberkulotike.

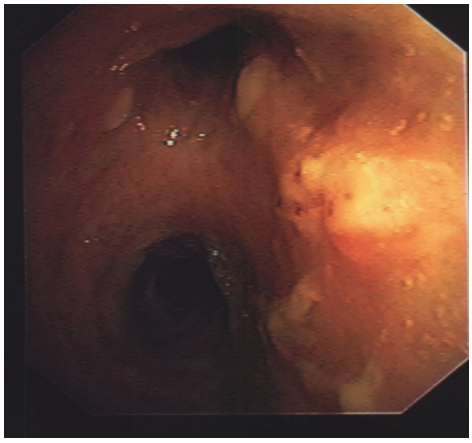
Standardne hematološke i ostale laboratorijske pretrage, pretežno biokemijske, najčešće služe ispitivanju funkcije jetre i bubrega i općem stanju organizma. Važne su za zasnivanje i provođenje terapije antituberkuloticima

Od svih pretraga koje izvodima u bolesnika sa sumnjom na tuberkulozu, mikrobiološke su najvažnije jer daju potvrdu o prisutnosti M.

tuberculosis i sigurnu dijagnozu tuberkuloze. Materijali koji se koriste za bakteriološku analizu su iskašljaji (prirodni ili inducirani), bronhoalveolarni ispirak (slika 3A), ispirak želuca, pleuralna tekućina, mokraća, krv, cerebrospinalna tekućina i bioptički materijali zahvaćenih organa (20). Uspješnost izoliranja mikobakterija iz kliničkih materijala ovisi o načinu uzimanja uzorka te o uvjetima i brzini transporta do mikrobiološkog laboratorija. Za optimalne rezultate uzorak treba biti sakupljen u čiste, sterilne posudice u dostatnoj tekućini i nezagađen bakterijama susjednih tkiva ili vanjske sredine. Uzorak je potrebno uzeti s mjesta infekcije u vrijeme bolesti, svakako prije uzimanja antibiotika.



A



B

Slika 3A i 3B. Mogući bronhoskopaki nalazi u tuberkulozi pluća i bronhoalveolarno ispiranje (3A).

Bakteriološke pretrage glede tuberkuloze sastoje se od mikroskopskog pregleda, kultivacije, identifikacije poraslog soja i testa osjetljivosti na antituberkulotike. Mikroskopskim pregledom utvrđujemo prisutnost acidorezistentnih bacila. Pretraga se zasniva na osobini mikobakterija da veže i zadržava bazičnu boju i nakon ispiranja kiselim alkoholom. Ona je posljedica prisutnosti velike količine lipida i voska u ovojnici koja obavija citoplazmu. Za bojenje se koriste tehnike po Ziel-Neelsenu i fluorescentno bojenje auraminom. Prednost je ovih metoda u jednostavnosti izvedbe, brzini i niskoj cijeni koštanja, a nedostatak su niska osjetljivost i nerazlučivanje bacila tuberkuloze od drugih mikobakterija. Metoda kultivacije u

mikrobiološkoj je dijagnostici tuberkuloze „zlatni standard“. Prednost je ove metode visoka osjetljivost, a nedostatak su dugotrajnost postupka i visoka cijena koštanja. U ovoj metodi uzorak se inokulira na specifične hranjive podloge koje mogu biti krute i tekuće. M. tuberculosis raste vrlo sporo, a najveći je postotak porasta kultura u periodu od 3-6 tjedana. Najčešće upotrebljavamo hranilište po Löwenstein-Jensenu. Postoje i agarne podloge po Middlebrooku i Mitchisonu, a one se više koriste u SAD-u. Od tekućih podloga primjenjuje se: bujon Middlebrook 7H9; tekuće hranilište u BACTEC TB sistemu u koje je ugrađena radiokativno ili fluoresceinom označena komponenta koja se za vrijeme rasta M. tuberculosis raspada, a mjeri se količina raspadnog produkta tzv. indeks rasta za 4-8 dana; SEPTI-CHEK AFB je kombinacija krute i tekuće podloge (bifazični sistem) u kojoj se koriste prednosti svake od njih; MGIT (engl. Mycobacteria growth indicator tube) koristi osobinu M. tuberculosis da je aerob. Kada M. tuberculosis raste, troši kisik koji je otopljen u podlozi. Tako se smanjuje količina kisika, a fluorescentni indikator
ugrađen u silikon na dnu epruvete, oslobađa svijetlost koja se detektira i tako pokazuje prisutnost M. tuberculosis u periodu od 6 dana.

Identifikacija poraslog soja podrazumjeva postupke i testove kojima potvrđujemo da su porasle kolonije zaista M. tuberculosis. To činimo procjenom morfologije kolonija, biokemijskim testovima (niacin i katalaza) i komercijalnim testovima kojima dokazujemo DNA i prisustnost tuberkulostearinske kiseline u staničnoj stijenci.

Test rezistencije radi se od svake pozitivne kulture, a njime se ispituje osjetljivost na antituberkuloznu terapiju. Očitava se nakon četiri tjedna, a temelji se na činjenici da M. tuberculosis ima u svojoj populaciji određeni broj prirodno rezistentnih mutanti nastalih spontanom kromozomski određenom mutacijom neovisno o doticaju s lijekom.

Do bitnog poboljšanja u brzini i točnosti dijagnostike tuberkuloze došlo je primjenom tehnika molekularne biologije. Tu koristimo njene amplifikacijske tehnike kojima se unutar samo nekoliko sati može otkriti i minimalna količina ciljne nukleinske kiseline izravno u kliničkom uzorku (67). Danas koristimo postupak lančane reakcije polimeraze (od engl. polymerase chain reaction-PCR) i dokaz transkripcijskih produkata nastalih amplifikacijom (od engl.

transcription mediated amplification system-TMA). Razrađene su tehnike poput lančane reakcije ligaze (od engl. ligase chain reaction-LCR), Q-beta replikacije (od engl. Q-beta replicase amplification-Q) i termofilne amplifikacije nadomještanjem lanca (od engl. strand displacement amplification-SDA). Najosjetljivija je detekcijska tehnika metoda PCR u kojoj amplifikacija može početi ako uzorak sadrži samo jednu molekulu DNA.

Serološke pretrage u tuberkulozi bile bi od dijagnostičke pomoći za mikrobiološki, negativne slučajeve u kulturama. One nisu rutinski etablirane. Zapreka razvoju serološke dijagnostike tuberkuloze jesu nedovoljno specifični mikobakterijski antigeni. Najnovija istraživanja pokazuju da 60% bolesnika s tuberkulozom prepoznaje 6 kDa antigen M. tuberculosis nazvan ESAT-6 (17,34,68). Nađeno je da je razina IFN-γ u perifernoj krvi, na stimulaciju antigenom ESAT-6, rađenog ELISA metodom, bila niža u kontrolnih osoba negoli u bolesnika s pleuralnom ili kavitarnom tuberkulozom.

Tuberkulozni kožni test široko je korištena metoda za identifikaciju infekcije s M. tuberculosis. Pozitivan je u osoba koje su cijepljene s BCG-om, oboljelih od aktivne tuberkuloze ili pak u onih koji su preboljeli tuberkulozu. Test je baziran na činjenici da u osoba inficiranih s M. tuberculosis dolazi do reakcije preosjetljivosti odgođenog tipa na određene antigene komponente organizma koji su sadržani u ekstraktu filtrata kulture nazvanom tuberkulin. Test se očitava 48-72 sata nakon injekcije, a osjetljivost testa je visoka. Negativan kožni test može biti posljedica imunosupresije bilo zbog same bolesti ili nespecifično kao posljedica drugih oboljenja ili stanja. Pozitivan tuberkulinski test nalazimo i u osoba inficiranih s drugim mikobakterijama uključujući i vakcinu s BCG-om. Tuberkulinski kožni test je specifičan u približno 99% populacije koja nije izložena drugim mikobakterijskim antigenima ili BCG vakcini, a specifičnost testa pada na 95% u populaciji gdje je moguća križna reaktivnost s antigenima drugih mikobakterija. Kožna reakcija veća od pet mm u promjeru dogovorno se smatra pozitivnom. Smatra se da je došlo do nedavne infekcije s M. tuberculosis u onih osoba s negativnim kožnim testom, koje na ponovno testiranje, u periodu od dvije godine imaju porast kožne reakcije za 10 mm ili više.

Radiološke pretrage u tuberkulozi imaju veliku vrijednost. One su indikativne i zahtijevaju dodatne mikrobiološke i druge pretrage. U bolesnika s

tuberkulozom pluća često nalazimo unilateralne ili bilateralne infiltrata s destrukcijom ili bez nje, poglavito u stražnjim i apikalnim segmentima gornjih plućnih režnjeva. Uz takav nalaz često vidimo i okrugle lezije-tuberkulome ili pleuralne izljeve. Osobe s preboljelom tuberkulozom imaju kalcifikate s raznim stupnjem fibroznih promjena. Čvorići, manji od jednog mm u promjeru, difuzno po plućima indikativni su za milijarnu formu tuberkuloze. Kompjuterizirana tomografija ili nuklearna magnetna rezonancija obično su rezervirane za detaljniju analizu promjena poput tuberkuloznog meningitisa i milijarne tuberkuloze. Ultrazvučna analiza može pomoći u dijagnostici ekstrapulmonale tuberkuloze.

Dijagnoza tuberkuloze postavlja se i histološki. Granulomi građeni od epiteloidnih i orijaških, multinuklearnih Langhansovih stanica uz kazeoznu nekrozu u bioptičkom materijalu su od velike dijagnostičke vrijednosti za tuberkulozu.

1.4.7. Terapija tuberkuloze

Terapija tuberkuloze mijenjala se tijekom povijesti, od kombinacije higijensko-dijetetskih mjera i kirurških postupaka pa do otkrića učinkovitih lijekova 1944 god. (streptomicin i para-aminosalicilna kiselina). Nakon otkrića učinkovitih kemoterapeutika (lijekova) slijedi 1952. god. „kombinirana trojna terapija“ (streptomicin, para-aminosalicilna kiselina i izonijazid) tijekom 24 mjeseca, a 1960. god. slijedi zamjena para-aminosalicilne kiseline s etambutolom, a terapija je skraćena na 18 mjeseci. Nadalje, 1970 god. pokazuje se da kombinacija izonijazida i rifampicina još više skraćuje trajanje terapije, na svega devet mjeseci. Uvođenje pirazinamida u terapiju tuberkuloze dovodi do skraćivanja liječenja na samo šest mjeseci. Danas se u liječenju tuberkuloze najčešće koriste izonijazid, rifampicin, pirazinamid i etambutol (69).

Ako se tuberkulozni bolesnici ne liječe, 60% ih umire od tuberkuloze tijekom pet godina, dok ispravno liječenje smanjuje smrtnost na 3%. Posljedica je neispravnog liječenja razvoj kronične bolesti uz izlučivanje M. tuberculosis u iskašljaju, te često izraženu rezistenciju na antituberkulotike.

U tuberkuloznoj leziji postoji više populacija uzročnika tuberkuloze; prva je ona koja aktivno brzo raste pri neutralnom pH u kolikviranom kazeoznom materijalu koji pokriva zid šupljine. Procjenjuje se da je veličina te populacije oko 10^8 organizama (61,70). Među ovim brojnim organizmima postoje rezistentne mutante, brojčano jedna rezistentna na milijun uzročnika. Ako liječenje nije provedeno pravilno, upravo ti mikroorganizmi dovode do neuspjeha u liječenju. Druga populacija sastoji se od organizama smještenih u kiselom pH mediju, osobito unutar makrofaga. Ti organizmi rastu vrlo sporo, a brojnost te populacije je 10^5. Treća populacija sastoji se od mikroorganizama smještenih u kazeoznom materijalu. Oni također rastu vrlo sporo, a brojnost te populacije iznosi 10^5 mikroorganizama. Četvrta populacija M. tuberculosis je tzv. „perzister“ koji je sposoban preživjeti unatoč baktericidnim koncentracijama antituberkulozne terapije. Priroda perzistera za sada je nepoznata, a na njih djeluje samo rifampicin, i to u fazi kada pokazuju minimalne znake metabolizma. Oni su bitni za epidemiologiju tuberkuloze i bez njih bi bila moguća eradikacija bolesti.

Cilj terapije tuberkuloze potpuno je uništenje uzročnika bolesti. Pri tome treba izbjeći selekciju rezistentnih mutanti. To postižemo primjenom kombinirane terapije. Rezistentne mutante mobiliziraju se iz M. tuberculosis koji brzo rastu, a to su oni iz zida kaverne. Sljedeći cilj je postići što bržu konverziju iskašljaja, to se postiže primjenom baktericidnih lijekova. Antituberkulozna terapija mora ostati baktericidna i kombinirana tijekom dva mjeseca, a za bacile koji rastu polako, nužna je produžena sterilizirajuća terapija tijekom dodatna četiri mjeseca.

Najveće promjene u liječenju tuberkuloze dogodile su se otkrićem lijekova za tu bolest. Danas primjenjivani izonijazid vrlo je aktivan u uništavanju intracelularnih mikroorganizama, a vrlo je slab u uništavanju perzistera. Rifampicin je efikasan u uništenju brzorastućih, ali i spororastućih mikroorganizama. Pirazinamid je moćan lijek protiv mikrorganizama smještenih u kiselom mediju, posebno unutar makrofaga. Kombinacija izonijazida, rifampicina, pirazinamida i etambutola povećala je učinkovitost terapije i skratila vrijeme liječenja na šest mjeseci. Primjenjuje se tako da se u prva dva mjeseca (intenzivna faza) kombiniraju četiri lijeka, a potom se do šest mjeseci nastavlja terapija izonijazoidom i rifampicinom (stabilizacijska

faza). U obje faze terapija može biti svakodnevna ili intermitentna. Liječenje tuberkuloze uglavnom se provodi standardnim antituberkuloticima po modelu SZO-e nazvanom „DOTS“ (engl. directly observed therapy short-course) (70). Danas su u fazi istraživanja i drugi lijekovi protiv tuberkuloze koji bi mogli skratiti dužinu liječenja i koji bi djelovali na bacile „spavače“. Za tu subpopulaciju M. tuberculosis nije jasno jesu li u biološki potpuno mirnoj fazi ili je njihovo množenje izuzetno sporo, a nije jasno ni gdje su smješteni. Rifalizil je novi rifamicin, a ima duži poluživot, veću koncentraciju i duže djelovanje unutar makrofaga (70). Uz rifalizil, u zadnje se vrijeme istražuje i djelovanje kinolona na M. tuberculosis. Najmoćniji lijekovi iz te skupine lijekova jesu moxifloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, ofloxacin i ciprofloxacin, a imaju svoje mjesto u terapiji rezistentne tuberkuloze (71).

Prve pokušaje imunoterapije izveo je sam R. Koch. On je primjetio da dolazi do razvoja nekroze nakon injekcije tuberkulina u inficirani organizam, što je poznato kao Kochov fenomen. Potom su Koch i drugi istraživači pokušali primijeniti manje doze tuberkulina u terapiji tuberkuloze, no otkrićem standardne antitubekulozne terapije ta istraživanja su zaboravljena. Porast broja rezistentne tuberkuloze i broja oboljelih od AIDS-a i tuberkuloze i/ili drugih mikobakterijskih bolesti, te teškoće u liječenju tih bolesnika, naveli su ponovna istraživanje u smjeru imunoterapije. Razumijevanje imunološkog odgovora postala je osnova za imunoterapiju mikobakterijskih bolesti što je danas jedan od najvažnijih ciljeva istraživanja u tom području. Mogući pristup u imunoterapiji tuberkuloze direktna je upotreba citokina u oboljelih, bilo sistemski ili putem aerosola. Dosadašnja istraživanja, na malom broju bolesnika, provodila su se s IL-2, IFNγ i njegovim induktorom IL-12, TNFα i GM-CSF. Rezultati su neujednačeni (22).

Prevencija tuberkuloze provodi se od 1930. godine primjenom BCG vakcine koja se sastoji se od atenuiranog soja M. bovis. Njena zaštitna učinkovitost je od 80% do toga da nema zaštite, a sve u različitim populacijama. Danas se zna da je BCG djelotvoran u zaštiti protiv tuberkuloznog meningitisa i progresivne bolesti, a manje djelotvoran protiv reaktivacije bolesti i reinfekcije. Nije sigurno da uspješnost zaštite BCG-om ovisi o genetskim razlikama između populacija. Cijepljene s BCG-om provodi se u dvije trećine zemalja svijeta, uglavnom u zemljama s visokom

incidencijom tuberkuloze. U novije je vrijeme u fazi ispitivanja i DNA vakcina i vakcina s M. vaccae (brzo rastući saprofit). DNA vakcina inducira antigen specifične T-limfocite koji proizvode IFNγ i iskazuju citotoksične sposobnosti, što je poželjno u imunološkom odgovoru na tuberkuloznu infekciju (2,22). S druge strane, cijepljenjem s M. vaccae izbjegnuto je stvaranje nekroze (Kochov fenomen), a postignuta je zaštitna djelotvornost, budući da taj saprofit ne sadrži species-specifične epitope. Dosadašnja su istraživanja o djelotvornosti tih vakcina konfliktna.

2. CILJ RADA

Cilj je ovog rada odrediti razinu unutarstaničnih citokina (IFN-γ i IL-4) u CD4+ i CD8+ T-limfocitima periferne krvi i BAL-u u PPD kožno pozitivnih (PPD+) i PPD kožno negativnih (PPD-) bolesnika s plućnom tuberkulozom. Određivanje tih citokina, a nakon izolacije, kultivacije limfocita *in vitr*o i njihove obrade, izvelo bi se na protočnom citometru.

Mnoga su eksperimentalna i klinička istraživanja potvrdila važnu ulogu celularne, a dijelom i humoralne imunosti u obrani organizma od tuberkuloze (17). Izgleda da temeljnu ulogu u obrani od tuberkuloze ima stanični imuni odgovor (19). T-limfociti fenotipa CD4 ili CD8 u suradnji s makrofagima ubijaju i razgrađuju bacile, a u tom procesu bitna je uloga citokina prvenstveno IFNγ koji aktivira mikrobicidnu aktivnost makrofaga (19,21). U zadnjih nekoliko godina govori se o citokinima kao presudnom čimbeniku u kontroli mikobakterijske infekcije (22). Naime, poznato je da se T-limfociti mogu dijeliti u dvije različite subpopulacije, Th1 i Th2. Th1-limfociti označeni su dominantnom proizvodnjom IL-2, IFN-γ i TNF-α i posreduju preosjetljivost odgođenog tipa. Th2-limfociti označeni su proizvodnjom IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 i potpomažu proizvodnju protutijela u B-limfocitima (18). Dosadašnja su izvješća o Th1 i Th2 tipu citokinske proizvodnje u ljudskoj tuberkulozi konfliktna i malo je poznato o njihovoj ulozi u tkivnom oštećenju (29-31). Većina dosadašnjih istraživanja uglavnom govore o prevladavajućem Th1 odgovoru u tuberkuloznih bolesnika s mogućim utjecajem Th2 odgovora. Većina tih zaključaka temelji se na određivanju razine citokina ELISA metodom, u supernatantu kultura stanica, u perifernoj krvi, a u manjem broju i iz uzoraka bronhoalveolarnog ispirka.

Aktivna tuberkuloza najčešće izaziva jaku reakciju preosjetljivosti na antigene M. tuberculosis. Oko 15% bolesnika s aktivnom plućnom tuberkulozom, koji ne boluju od druge imunokompromitirajuće bolesti i nisu pod imunosupresivnom terapijom, nema znakova preosjetljivosti na tuberkulin (52,72).

U ovom radu kani se istraživati koji citokinski profil prevladava u T-limfocitima na sistemskom (periferna krv) i na lokalnom nivou (BAL), i to u

kožno pozitivnih i kožno negativnih bolesnika s aktivnom plućnom tuberkulozom testiranih na PPD pomoću Mantoux testa. Iz istraživanja su izuzeti bolesnici koji boluju od drugih imunokompromitirajućih bolesti i oni pod imunosupresivnom terapijom. Odredit će se unutarstanična razina citokina IFN-γ i IL-4. Razina tih citokina će se odrediti u T-limfocitima, fenotipa CD4+ i CD8+, iz BAL-a i periferne krvi. Određivanje će se učiniti nakon njihove izolacije, odgovarajuće priprave i obilježavanja specifičnim monoklonskim protutijelima i mjerenjem stupnja obilježenosti stanica protočnim citometrom.

2.1. Plan istraživanja

Istraživanje će se provoditi u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“, u ulici Jordanovac 104 u Zagrebu i u Imunološkom zavodu, na Odjel za istraživanje i razvoj, Odsjeku za celularnu imunologiju, u Rockefellerovoj 10, Zagreb. Tuberkulozni bolesnici označeni su kao osobe s patološkim promjenama na plućima, kojima se u iskašljaju i/ili bronhoskopskim materijalima nađe M. tuberculosis.

Ako i pored upornog traženja ne nađemo M. tuberculosis, a klinički, radiološki i drugi znaci pokazuju aktivnu tuberkulozu uz istodobno isključenje druge etiologije bolesti, tu ćemo bolest smatrati aktivnom tuberkulozom (20).

U ovo istraživanje uključit će se bolesnici koji su primljeni u Kliniku Jordanovac zbog kliničke i radiološke sumnje na aktivnu tuberkulozu pluća, oba spola, u dobi od 18 do 60 godina. Dijagnoza aktivne tuberkuloze pluća temeljena je na tipičnim kliničkim, laboratorijskim, radiološkim i mikrobiološkim nalazima (20). U dijagnostičke pretrage plućne tuberkuloze, uz rutinske laboratorijske nalaze i radiološki nalaz pluća, spada i *in vivo* kožni test na tuberkulin (Mantoux test), te analiza iskašljaja i bronhoskopskih materijala (kateter aspirat i BAL) na M. tuberculosis.

Dakle, u svih bolesnika uključenih u ovo istraživanje učinjen je detaljan klinički pregled, osnovne laboratorijske i radiološke pretrage, PPD kožni test po Mantoux, bronhoskopija s bronhoalveolarnim ispiranjem te je uzeta periferna krv za određivanje citokinskog profila T-limfocita. Detaljnim kliničkim pregledom i dobrom anamnezom iz ispitivanja će biti isključeni bolesnici s

plućnom tuberkulozom koji boluju i od koje druge bolesti s mogućim supresivnim djelovanjem na imunološki sustav. Također iz ispitivanja će se isključiti osobe pod imunosupresivnom terapijom (citostatici, kortikosteroidi, iradijacija) te trudnice i bolesnici s poznatim alergijama u anamnezi. Svi bolesnici biti će testitirani na HIV, a samo osobe s potvrđenim negativnim testom biti će uključene u istraživanje.

Bolesnici s aktivnom plućnom tuberkulozom podijelit će se u dvije skupine prema kožnoj reakciji na PPD. Jednu skupinu će sačinjavati PPD nereaktivni (PPD-), a drugu PPD reaktivni (PPD+) tuberkulozni bolesnici. Skupina PPD+ tuberkuloznih bolesnika ujedno je i kontrolna skupina. Naime, u Republici Hrvatskoj postoji zakonska obveza cijepljenja protiv tuberkuloze (Zakon o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti NN 60/92 i 26/93), pa se samim time može očekivati da je populacija u Republici Hrvatskoj PPD+.

Po završetku dijagnostičke procedure i uzimanja svih materijala za analizu bolesnici će dobiti antituberkuloznu terapiju.

Etičko povjerenstvo Klinike za plućne bolesti „Jordanovac“ u Zagrebu dalo je suglasnost za izvođenje ovog istraživanja 14. travnja 2002. godine.

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici i materijal

1. U ovo je istraživanje uključeno 29 bolesnika s aktivnom plućnom tuberkulozom koji ispunjavaju uvjete navedene u opisu istraživanja.

2. *In vivo* kožni test preosjetljivosti na tuberkulin rađen je po Mantoux metodi s PPD RT 23 SSI koji u 0,1 ml otopine sadrži dvije tuberkulinske jedinice PPD-a (Statens, Seruminstitut, Copenhagen, Danska). Pozitivnim kožnim testom smatra se induracija promjera najmanje pet milimetara, 72 sata po injiciranju (73).

3. Periferna krv uzeta je iz antekubitalne vene u epruvete od 10 mL s heparinom (BD Vacutainer systems, Beliver Industrial Estate, Plymouth, Velika Britanija, s 143 I.U. heparina).

4. Tako uzeta periferna krv je koristila se za određivanje IFN-γ i IL-4 u CD4+ i CD8+ T-limfocitima kako je opisano u ranije objavljenim radovima (74,75).

5. BAL je rađen putem fiberoptičkog bronhoskopa BF type 1T 160 (Olympus Co, Tokyo, Japan) uz primjenu lokalnog anestetika (2% lidokain) prema već poznatom protokolu (76). Bronhoskop se uglavi u srednji bronh ili bronh za lingulu, ovisno o strani zahvaćenoj tuberkuloznim promjenama. Kroz radni kanal ubrizga se po 50 ml 0,9% otopine natrijeva klorida zagrijane na 37 °C, u četiri navrata, koja se aspirira nakon svakog ubrizgavanja. Preporuka European Society of Pneumology Task Group on BAL je da količina ubrizgane fiziološke otopine iznosi 100 do 300 mL, a nikako manje od 100 mL (77). Povratna tekućina (BAL) filtrira se kroz sistem i sakuplja u silikoniziranu posudu.

6. Izolacija stanica iz BAL-a izvodi se u pothlađenim uvjetima i sterilnom prostoru. BAL se nakon izmjerenog volumena filtrira kroz sterilnu gazu, potom centrifugira na 600 g tijekom pet minuta. Po centrifugiranju odijeli se supernatant. Postupak ispiranja stanica u hranjivom mediju RPMI-1640 s gentamicinom ponovi se, a potom stanice centrifugiraju na 600 g pet minuta. Ponovno se odlije supernatant i na talog stanica doda se 1 ml medija za kulturu stanica „RPMI-1640“ s gentamicinom. Nakon toga se u Neubauerovoj

komorici izbroje mononuklearne stanice, tj. odredi koncentracija u 1 ml stanične suspenzije. Za određivanje unutarstaničnih citokina (IL-4 i IFN-γ) BAL-a podesi se koncentracija stanične suspenzije na $2x10^6$ u 1 ml BAL-a, te se dalje određuju unutarstanični citokini prema protokolu Imunološkog zavoda u Zagrebu, Odjela za istraživanje i razvoj.

7. Analizu stanica (i periferna krv i BAL) učinjena je na protočnom citometru (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain Valley, SAD) opremljenim argonskim laserom snage 15 MW, s emisijom ekscitirajuće valne dužine 488 nm i standardnim setom optičkih filtera: BP 530/30 (FL1), BP585/44 (FL2) I lp>650 (FL3).

3.1.2. Monoklonska protutijela

U ovom ispitivanju rabili smo i sljedeća monoklonska protutijela (mišja anti-ljudska monoklonska protutijela):

1) za površinske stanične antigene na limfocitima čovjeka:

anti-CD4, konjugirana s fikoeritrin-cijanin 5 (PE-Cy5) i anti-CD8 konjugirana s PE-Cy5 (DakoCytomation Ltd, Ely, Velika Britanija),

2) za unutarstanične citokine čovjeka:
anti-IFNγ konjugiran s FITC i anti IL-4 konjugiran s PE (PharMingen, San Diego, SAD),

3) za određivanje nespecifičnog vezanja (negativna kontrola):
anti-IgG1 konjugiran s FITC i anti IgG2a konjugiran s PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka)
anti-IgG1 konjugiran s PE-Cy5 (DakoCytomation Ltd).

3.1.3. Ostale kemikalije kojima se koristilo

PMA, ionomicin i brefeldin A (Sigma, St. Luis, SAD).

Otopine kojima se koristilo pri obilježavanju staničnih površinskih i unutarstaničnih antigena:

1) Puferirana fiziološka otopina bez Ca^{2+} i Mg^{2+} („Dulbecco's PBS", Imunološki zavod, Zagreb) sljedećeg sastava: NaCl 0,145 M; K_2HPO_4 0,018 M; K_2HPO_4 0,010 M; pH 7,4-7,6.

2) Otopina za ispiranje stanica: s dodatkom fetalnog telećeg seruma (Dipro, Wiener Neudorf, Austrija) 10,0%; NaN_3 (Sigma) 0,1%; puferirana fiziološka otopina.

3) Otopina za fiksiranje stanica: puferirana fiziološka otopina; formaldehid (Kemika, Zagreb) 4%.

4) Otopina za permeabilizaciju stanica: puferirana fiziološka otopina; fetalni teleći serum 1%; NaN_3 0,1%; saponin (Sigma) 0,1%.

3.2. Metode

Koristila se sljedeća metoda određivanja unutarstaničnih citokina (IFN-γ i IL-4) protočnim citometrom u CD4+ i CD8+ T-limfocitima periferne krvi i BAL-a (74,75,78).

3.2.1. Stimulacija limfocita u kulturi periferne krvi i stanica BAL-a

Prije *in vitro* stimulacije, svježi uzorci heparinizirane periferne krvi razrijeđeni su s jednakim volumenom medija RPMI 1640 (Imunološki zavod). Po 500 μL razrijeđene krvi inkubirano je u sterilnim 12x75 mm polistirenskim epruvetama (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, SAD). Za stimulaciju smo rabili 50 ng/mL PMA i 0,75 ng/mL ionomicina uz prisutnost blokatora proteinske sekrecije brefeldina A u koncentraciji od 10 μg/mL. Kultivacija je trajala 6 sati na 37 °C u termostatu s 5% CO2 (Heraeus, Osterode,

Njemačka). Razrijeđena krv kultivirana samo u prisustvu brefeldina A koristila se kao negativna kontrola.

Nakon brojenja stanica u BAL-u, podesili smo njihovu koncentraciju na $2x10^6$/100 μL, te u jednu epruvetu na talog dodali PMA, ionomicin i BFA (stimulirane stanice), a u drugu samo BFA (nestimulirane stanice tj. kontrola). Potom smo u svaku od epruveta dodali odgovarajuću količinu medija RPMI 1640 uz dodatak gentamicina i AB-seruma kako bi ukupan volumen bio 1 ml (78).

3.2.2. Obilježavanje površinskih biljega i unutarstaničnih citokina

Za istovremenu analizu fenotipa stanica nakon stimulacije s PMA i ionomicinom, uzorci su obilježeni s površinskim protutijelima za površinske biljege CD4 i CD8 konjugiranim s fluorokromom PE-Cy5. Unutarstanični citokini IFN-γ i IL-4 detektirani su protutijelima za unutarstanične citokine; anti-IFN-γ protutijelo konjugirano fluorokromom FITC i anti-IL-4 protutijelo konjugirano fluorokromom PE. Protočnim citometrom analizirali smo trostruko obilježene uzorke u sljedećim kombinacijama: anti-IFN-γ FITC/ anti –IL-4 PE/ anti-CD4 PE-Cy5 i anti-IFN-γ FITC/ anti-IL-4 PE/ anti-CD8 PE-Cy5. Određivanje nespecifičnog vezanja analizirano je korištenjem izotipski identičnih nespecifičnih protutijela konjugiranih fluorokromom.

Za unutarstanično obilježavanje citokina u perifernoj krvi koristila se modificirana metoda po Jason-u (79). Nakon kultivacije, krv kultivirana u prisutnosti PMA, ionomicina i BFA razdijeljena je u dvije zasebne polistirenske epruvete u volumenu od 100 μL. Nakon ispiranja u hladnoj puferiranoj fiziološkoj otopini, dodana su monoklonska protutijela za površinske biljege (CD4 i CD8) u jednu epruvetu, u drugu pak odgovarajuća izotipska kontrola, a zatim su stanice inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u tamnom prostoru. Na isti smo način obilježili krv koja je kultivirana samo u prisutnosti BFA. Nakon ispiranja stanica u otopini za ispiranje (centrifugiranjem na 400g), svi su uzorci fiksirani korištenjem hladne otopine za fiksaciju na temperaturi 4 °C tijekom 30 minuta da bi se očuvao integritet stanice. Nakon toga, stanice su ponovno isprane u otopini za

ispiranje i permeabilizirane u 50 μL otopine za permeabilizaciju u trajanju od 15 minuta na temperaturi 4 °C. Na stanični talog dodana su protutijela za unutarstanični IFN-γ i IL-4 ili odgovarajuće izotipske kontrole. Stanice su inkubirane 30 minuta na 4 °C. Radna koncentracija protutijela za unutarstanični IL-4 bila je 0,4 μg/mL te 1,25 μg/mL za unutarstanični IFN-γ . Na kraju, trostruko obilježene stanice isprane su u otopini za permeabilizaciju (ispiranje stanica u permeabilizacijskoj otopini bilo je dovoljno za potpuno razaranje eritrocita) i resuspendirane u 0,5 mL otopine za ispiranje te odmah analizirane na protočnom citometru.

Istovremeno, s obilježavanjem kultivirane periferne krvi, određivali smo unutarstanične citokine u stanicama BAL-a. Po završenoj kultivaciji, stanične suspenzije (posebno stimulirane i nestimulirane stanice) raspodijelili smo u tri epruvete i identično obilježavanju periferne krvi obilježili ih u slijedećim kombinacijama: anti-IFN-γ FITC/ anti –IL-4 PE/ anti-CD4 PE-Cy5, anti-IFN-γ FITC/ anti-IL-4 PE/ anti-CD8 PE-Cy5 i izotipske kontrole FITC/PE/PE-Cy5.

3.2.3. Analiza stanica protočnim citometrom

Sve smo uzorke analizirali protočnim citometrom (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain Valley, SAD) opremljenim argonskim laserom, emisijom pobudne valne dužine 488 nm i standardnim setom optičkih filtera: BP 530/30 (FL1), BP 585/44 (FL2) i lp>650 (FL3).

Podaci za analizu po uzorku dobiveni su od 10^4 stanica. Uzorci sa stanicama propuštani su uz optimalnu brzinu propuštanja od 400-600 stanica u sekundi. Zastupljenost pojedinih specifičnih biljega na/u stanicama analizirali smo postavljanjem aktivne ograde na dvoparametarskom histogramu raspodjele stanica prema veličini (engl. forward scatter, FSC) i zrnatosti (engl. side scatter, SSC). Rezultate smo analizirali programom CellQuest Software (Becton Dickinson) koji izračunava postotak stanica jednostruko i/ili dvostruko i/ili trostruko pozitivnih ili negativnih za određeni biljeg.

3.2.4. Statistička analiza podataka

Za analizu rezultata koristili su se parametri deskriptivne statistike. Za podatke koji su slijedili Gaussovu raspodjelu služilo se aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom i 95% granicom pouzdanosti, a za podatke koji nisu normalno raspodijeljeni medijanom i granicom pouzdanosti za neparametrijske podatke.

Razlike između skupina testirane su Mann Vhitney U testom, a povezanost pojedinih parametara Pearsonovim ili Spearmanovim koeficijentima korelacije. Vjerojatnosti manje ili jednako 5% smatrane su statistički značajnima.

4. REZULTATI

4.1. Bolesnici s tuberkulozom pluća uključeni u istraživanje

U istraživanje je uključeno 29 bolesnika s aktivnom tuberkulozom pluća. Od tih bolesnika 20 njih je imalo pozitivan kožni test na PPD (PPD+), a drugih devet je imalo negativan kožni test na PPD (PPD-). U svih tih bolesnika rađena je bronhoskopija s BAL-om i uzeti su uzorci periferne krvi. Nažalost, u dijelu uzoraka nije uspjelo određivanje traženih citokina u T-limfocitima (problemi s aktiviranom krvi ili BAL-om). Nadalje, nije bilo moguće da u istih bolesnika ponovimo uzimanje periferne krvi ili učinimo fiberbronhoskopiju. Podaci o ispitivanim uzorku i broju uspjelih analiza pojedinih uzoraka prikazani su u tablicama 1. i 2.

Tablica 1. Ispitivani uzorci bolesnika s tuberkulozom pluća

	Ukupno		PPD+		PPD-	
	N^1	N^2	N^1	N^2	N^1	N^2
CD4+ (krv)	29	28	20	19	9	9
CD4+ (BAL)	29	25	20	17	9	8
CD8+ (krv)	29	28	20	19	9	9
CD8+ (BAL)	29	25	20	17	9	8
CD4+ IFN-γ+ krv	29	23	20	16	9	7
CD4+ IFN-γ+ BAL	29	25	20	16	9	9
CD8 +IFNγ+ krv	29	20	20	14	9	6
CD8 +IFN-γ+ BAL	29	24	20	16	9	8
CD4+IL-4+ krv	29	22	20	16	9	6
CD4+IL-4+ BAL	29	25	20	16	9	9
CD8+IL-4+ krv	29	23	20	16	9	7
CD8+IL-4+ BAL	29	25	20	16	9	9

[1] broj ispitivanih uzoraka sveukupni i po skupinama

[2] broj uspjelih ispitivanja pojedinih uzoraka sveukupno i po skupinama

Tablica 2. Udio uspjelih analiza u perifernoj krvi i BAL-u prema ispitivanim skupinama

	Ukupno (n=29)	PPD+ (n=20)	PPD- (n=9)
CD4+(krv)	28/29	19/20	9/9
CD4+(BAL)	25/29	17/20	8/9
CD8+(krv)	28/29	19/20	9/9
CD8+(BAL)	25/29	17/20	8/9
CD4+IFN-γ+ krv	23/29	16/20	7/9
CD4+IFN-γ+BAL	25/29	16/20	9/9
CD8+IFN-γ+ krv	20/29	14/20	6/9
CD8+IFN-γ+ BAL	24/29	16/20	8/9
CD4+IL-4+ krv	22/29	16/20	6/9
CD4+IL-4+ BAL	25/29	16/20	9/9
CD8+IL-4+ krv	23/29	16/20	7/9
CD8+IL-4+ BAL	25/29	16/20	9/9

4.1.1. Zastupljenost ispitanika prema spolu i osnovnim obilježjima tuberkuloze

U obje skupine ispitanika postotak zastupljenosti muškaraca bio je veći, a u PPD- skupini muškarci su bili zastupljeni 100%. Rezultati su prikazani u tablici 3. Skoro svi ispitanici bili su BK pozitivni (imali su prisutnost M. tuberculosis ili u iskašljaju ili u bronhoskopskim materijalima). Opsežne, obostrane radiološke promjene na plućima, koje su ukazivale na aktivnu tuberkulozu pluća bile su prisutne u većeg broja PPD- skupine ispitanika (88,9%). Takav nalaz je vidljiv u četvrtine ispitanika iz PPD+ skupine (tablica 3). Isto tako, postotak bolesnika s recidivom tuberkuloze pluća bio je u PPD- skupini 33,3%, a u PPD+ svega 5%.

Tablica 3. Raspodjela i karakteristike ispitanika obzirom na PPD nalaz

	PPD+		PPD-	
	N	(%) ispitanika	N	(%) ispitanika
Muškarci/žene	15/5	(75/25)	9/0	(100/0)
BK pozitivan/negativan	19/1	(95/5)	9/0	(100/0)
Rdg jednostrano[1]/obostrano[2]	15/5	(75/25)	1/8	(11.1/88.9)
Novooboljeli[3]/recidiv[4]	19/1	(95/5)	6/3	(66. 7/33.3)

[1] radiološki nalaz pluća u smislu aktivne tuberkuloze prisutan na jednoj strani pluća

[2] radiološki nalaz pluća u smislu aktivne tuberkuloze bio je obostran

[3] novooboljeli – bolesnici koji prvi put boluju od tuberkuloze pluća

[4] recidiv – bolesnici koji su već prije liječeni i zaliječeni od tuberkuloze pluća, sada ponovno oboljeli

4.1.2. Odnos osnovnih antropometrijskih parametara ispitanika

Prosječna dob bolesnika i indeks tjelesne mase bili su ujednačeni u obje skupine ispitanika. Rezultati su prikazani u tablici 4. Tu se, također, vidi da je indeks tjelesne mase u obje skupine ispitanika bio u granicama referentnih vrijednosti za zdravu populaciju. Prema tome, skupine PPD+ i PPD- ujednačene su u pogledu osnovnih antropometrijskih parametara, tj. ne razlikuju se statistički značajno.

Tablica 4. Osnovna antropometrijska obilježja ispitivanih skupina

	PPD+ (n=20)			PPD- (n=9)				
	X	± SD	95%CI	X	± SD	95%CI	U	p
DOB[1]	37	± 9.7	(32.5 -41.6)	4.38	± 7.8	(37.7 - 49.8)	51.5	0.069
BMI[2]	22.3	± 2.9	(20.9 - 23.7)	21.9	± 1.6	(20.6 - 23.2)	83	0.741

[1] rezultati prikazuju srednju vrijednost izraženu u godinama ± SD i 95%-tni interval pouzdanosti

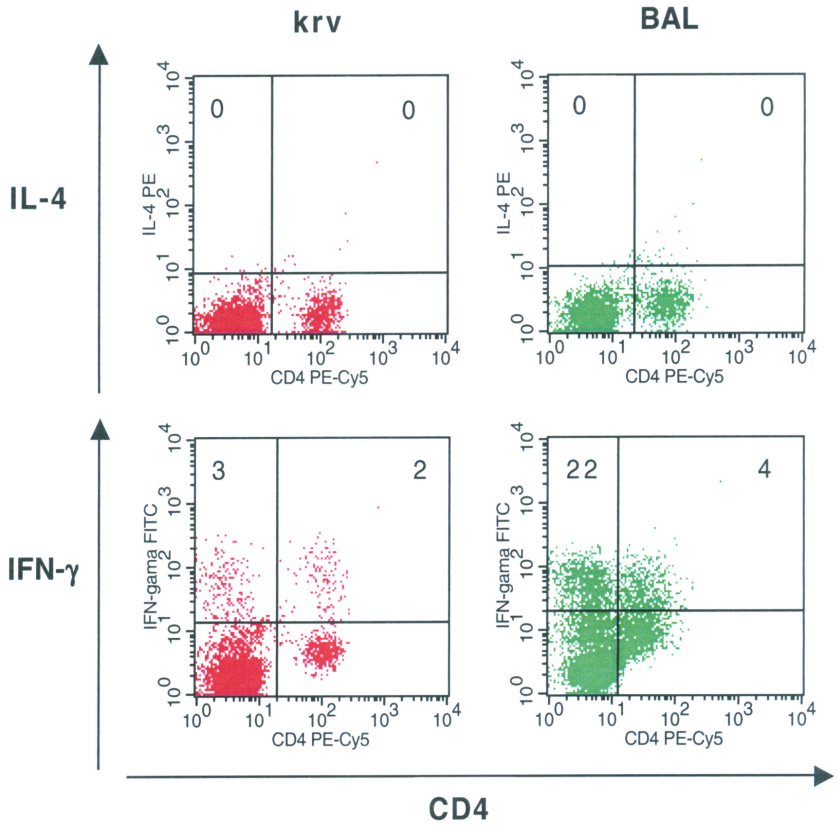
[2] indeks tjelesne mase (eng. body mass index, BMI) je tjelesna težina/ visina u m2 ± SD i 95%-tni interval pouzdanosti

U – Mann Whitneyev test

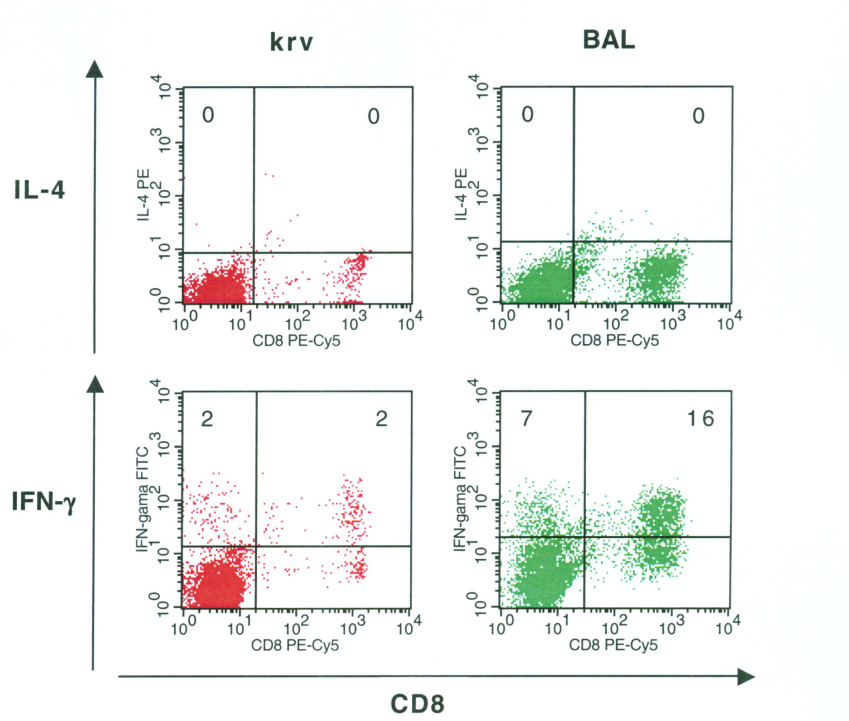
p – statistička značajnost razlike

4.2. Udio CD4+ i CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika

Analiza unutarstaničnih citokina IFN-γ i IL-4 u limfocitima učinjena je zajedno s određivanjem fenotipa limfocita površinskim obilježavanjem s protutijelima za CD4 i CD8 T-limfocite. Reprezentativni prikaz određivanja IFN-γ i IL-4 u CD4+ i CD8+ T-limfocitima je prikazan na slikama 4 i 5, a odnosi se na PPD+ bolesnika s plućnom tuberkulozom. Na slici 4 se vidi da postotak CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ (CD4+IFN-γ+) u perifernoj krvi iznosi 2%, a u BAL-u 4%. Ostali prikazani IFN-γ proizvode druge mononuklearne stanice (3% u perifernoj krvi i 22% u BAL-u). Istovremeno se vidi da nema CD4+ T-limfocita ni drugih mononuklearnih stanica u krvi i BAL-u koje proizvode IL-4. Na slici 5 se vidi da u perifernoj krvi postoji 2% CD8+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ+, a u BAL-u 16%. Drugih mononuklearnih stanica koje proizvode IFN-γ u krvi ima 2%, a u BAL-u 7%. Ovdje, također, nema CD8+ T-limfocita ni drugih mononuklearnih stanica koje proizvode IL-4.



Slika 4 Reprezentativni prikaz određivanja unutarstaničnih citokina IFN-γ i IL-4, nakon poliklonske stimulacije u CD4+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u bolesnika s plućnom tuberkulozom (PPD+).



Slika 5 Reprezentativni prikaz određivanja unutarstaničnih citokina IFN-γ i IL-4, nakon poliklonske stimulacije u CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u bolesnika s plućnom tuberkulozom (PPD+).

Rezultati određivanja postotka CD4+ i CD8+ T- limfocita periferne krvi i BAL-a u obje skupine ispitanika prikazani su u tablici 5. Prema tim rezultatima vidimo da postoje statistički značajne razlike između promatranih skupina u udjelu CD4+ T-limfocita u BAL-u (p=0,027). Naime, skupina PPD- ima značajno veće vrijednosti CD4+ T-limfocita u BAL-u. Nema statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u postotku CD4+ T-limfocita periferne krvi, te CD8+ T-limfocita i periferne krvi i BAL-a.

Tablica 5. Postotak T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika

	PPD+					PPD-						
	N	X (%)	±	SD	95%CI	N	X (%)	±	SD	95%CI	U	p
CD4+[1]	19	45.3	±	7.2	(41.4 - 49.2)	9	46.4	±	9.7	(38.3 - 54.5)	82.5	0.882
CD4+[2]	17	35.2	±	17.5	(25.9 - 44.6)	8	48.9	±	15.9	(35.6 - 62.1)	30.0	**0.027**
CD8+[1]	19	32.1	±	7	(28.4 - 35.9)	9	35.2	±	15.7	(22.1 - 48.4)	80.5	0.805
CD8+[2]	17	30.4	±	15.8	(22.0 - 38.8)	8	30	±	12.6	(19.5 - 40.5)	64.5	0.838

[1] postotak CD4+ i CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi izražen kao srednja vrijednost ± SD i 95%-tni interval pouzdanosti

[2] postotak CD4+ i CD8+ T-limfocit u BAL-u izražen kao srednja vrijednost ± SD i 95%-tni interval pouzdanosti

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.2.1. Omjer CD4+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- ispitanika

Rezultati omjera CD4+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- ispitanika prikazani su u tablici 6. Vidljivo je da među ispitivanim skupinama nema statistički značajne razlike u omjeru CD4+ i CD8+ T-limfocita. Dobivene vrijednosti omjera bile su u granicama referentnih vrijednosti za zdravu populaciju.

Tablica 6. Omjer CD4+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitivanika

	PPD+		PPD-			
	medijan	raspon	medijan	raspon	U	p
CD4+/CD8+ [1]	1,48	0,69-2,83	1,60	0,67-3,71	72	0,507
CD4+/CD8+	1,54	0,23-4,87	2,03	0,56-3,77	46	0,200

[1] omjer CD4+/CD8+ T-limfocita u ispitivanim skupinama izražen kao medijan i raspon

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.2.2. Udio CD4+ i CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi i BAL-u u PPD+ skupini ispitanika

Rezultati ispitivanja mogućih razlika i povezanosti unutar PPD+ skupine ispitanika, a između krvi i BAL-a u postotku CD4+ i CD8+ T-limfocita prikazani su u tablici 7. Tu zapažamo da u skupini PPD+ ispitanika postoji statistički značajna razlika u udjelu CD4+ T-limfocita između periferne krvi i BAL-a (p=0,036). U perifernoj krvi PPD+ ispitanika postoji značajno veći postotak CD4+ T-limfocita u odnosu na BAL. U toj skupini ispitanika za CD8+ T-limfocite nema statistički značajne razlike između krvi i BAL-a. Istovremeno za te limfocite postoji pozitivna korelacija krvi i BAL-a. Naime, porast udjela CD8+ T-limfocita u krvi prati istovremeno i porast udjela CD8+ T-limfocita u BAL-u (p=0,038).

Tablica 7. Odnos CD4+ i CD8+ T-limfocita u krvi i BAL-u u skupini PPD+ ispitanika

	krv			BAL				
	N	X ± (%)	SD	N	X ± (%)	SD	U	p
CD4+*	19	45.3 ±	7.2	17	35.2 ±	17.5	95.5	**0.036**
CD8+**	19	32.1 ±	7	17	30.4 ±	15.8	122.5	0.216

* Pearsonov koeficijent korelacije r = 0.11 p=0.967

** Pearsonov koeficijent korelacije r= 0.52 **p=0.038**

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.2.3. Udio CD4+ i CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi i BAL-u u PPD- skupini ispitanika

Unutar skupine PPD- ispitanika analizirali smo također odnos periferne krvi i BAL-a obzirom na udio CD4+ i CD8+ T-limfocita izražen u postocima. Rezultati su prikazani u tablici 8. U toj skupini ispitanika nema statistički značajnih ni razlika ni povezanosti između krvi i BAL-a u odnosu na postotak kako CD4+, tako i CD8+ T-limfocita.

Tablica 8. Razlika i povezanost između periferne krvi i BAL-a u udijelu CD4+ i CD8+ T-limfocita u skupini PPD- ispitanika

	krv				BAL					
	N	X (%)	±	SD	N	X (%)	±	SD	U	P
CD4+*	9	46.4	±	9.7	8	48.9	±	15.9	29.0	0.501
CD8+**	9	35.2	±	15.7	8	30.4	±	15.8	32.5	0.736

* Pearsonov koeficijent korelacije r = -0.14 p=0.741

** Pearsonov koeficijent korelacije r= -0.02 p=0.972

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.3. Udio CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika

Kada analiziramo postotak i CD4+ i CD8+ T limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije, a u odnosu na ukupni postotak tih T-limfocita, pratimo određene razlike između PPD+ i PPD- skupina ispitanika. Rezultati su prikazani u tablici 9. Naime, proizvodnja IFN-γ u CD4+ T-limfocita nakon kratkotrajne stimulacije s PMA i ionomicinom, a u odnosu na ukupni postotak tih CD4+ T-limfocita periferne krvi, je značajno veća u perifernoj krvi PPD- ispitanika u odnosu na PPD+ (p=0,029). Nema statistički značajne razlike između promatranih skupina u pogledu proizvodnje IFN-γ u CD4+ T-limfocitima nakon poliklonske stimulacije u BAL-u, u odnosu na sveukupni broj tih CD4+ T-limfocita u BAL-u. Isto tako, nema statistički značajne razlike između skupina u pogledu proizvodnje IFN-γ u CD8+ T-limfocita nakon poliklonske stimulacije i krvi i BAL-a, a također u odnosu na aktivirane CD8+ T-limfocite ili krvi ili BAL-a.

Tablica 9. Udio CD4+ i CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a koji proizvode IFN-γ u odnosu na sveukupni postotak tih T-limfocita u PPD+ i PPD- skupini ispitanika

	PPD+			PPD-				
	N	medijan	95%CI	N	medijan	95%CI	U	p
CD4+IFNγ+/ CD4+ [1]	16	8.5	(2 - 13)	7	17	(2 - 21)	40.0	**0.029**
CD4+IFN-γ+/ CD4+ [2]	16	42.5	(12 - 47)	9	46	(2 - 67)	72.0	1.000
CD8+ IFN-γ+/ CD8+ [1]	14	17	(7 - 42)	6	25	(0 - 70)	56.0	1.000
CD8+ IFN-γ+/ CD8+ [2]	16	39.5	(18 - 57)	8	41	(10 - 64)	72.0	1.000

[1] postotak navedenih limfocita u perifernoj krvi izražen kao medijan i 95%-tni interval pouzdanosti

[2] postotak navedenih limfocita u BAL-u izražen kao medijan i 95%-tni interval pouzdanosti

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.3.1. Udio CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika

Promatrajući postotak dvostruko pozitivnih stanica (CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+), izražen kao postotak pojedinih subpopulacija T-limfocita koji proizvode IFN-γ, vidimo da između skupina nema statistički značajne razlike, kako za perifernu krv tako i za BAL. Rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Udio CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika

	PPD+			PPD-				
	N	medijan	raspon	N	medijan	raspon	U	p
CD4+IFN-γ+[1]	16	1	(0.5 - 8)	7	2.5	(0 - 10)	49.0	0.624
CD4+IFN-γ+[2]	16	8	(1 - 53)	9	19.5	(2 - 37)	65.0	0.691
CD8+IFN-γ+[1]	14	2	(1 - 8)	6	3.5	(0 - 23)	47.0	0.877
CD8+IFN-γ+[2]	16	9	(2 -27)	8	6	(1 - 18)	40.0	0.139

[1] postotak dvostruko pozitivnih T-limfocita u perifernoj krvi izražen kao medijan i raspon

[2] postotak dvostruko pozitivnih T-limfocita u BAL-u izražen kao medijan i raspon

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.3.2. Udio CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ skupini ispitanika

Analizirajući razlike između krvi i BAL-a unutar PPD+ ispitanika, vidimo da u BAL-u spomenutih ispitanika, u odnosu na perifernu krv, postoji značajno veći postotak CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije s PMA i ionomicinom, u odnosu na sveukupni postotak te subpopulacije T-limfocita ($p<0,001$). Također, postotak je CD8+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ, u odnosu na sveukupni broj tih CD8+ T-limfocita, značajno veći u BAL-u nego u krvi PPD+ ispitanika ($p=0,042$). Gledajući povezanost u toj skupini ispitanika, nalazimo statistički značajnu negativnu povezanost za CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocite. To znači da pad CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocita periferne krvi istovremeno prati porast tih limfocita u BAL-u ($p=0,045$). Rezultati su prikazani u tablici 11.

Tablica 11. Razlika i povezanost između periferne krvi i BAL-a u CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ u skupini PPD+ ispitanika

	Krv			BAL				
	N	medijan	95%CI	N	medijan	95%CI	U	p
CD4+IFN-γ+ /CD4+ *	16	8.5	(2 - 13)	16	42.5	(12 - 47)	32.5	**<0.001**
CD8+IFNγ+ /CD8+ **	14	17	(7 - 42)	16	39.5	(18 - 57)	74.0	**0.042**

*Spearmanov koeficijent korelacije r=-0.21 p=0.511

** Spearmanov koeficijent korelacije **r=-0.59** **p=0.045**

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.3.3. Analiza rezultata postotka CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD+ skupini ispitanika

Analiza udjela dvostruko pozitivnih subpopulacija T-limfocita, izražen u postocima ili CD4+ ili CD8+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ, ukazuje na značajne razlike između krvi i BAL-a unutar PPD+ skupine ispitanika. U ovoj skupini ispitanika nalazimo značajno veći postotak i CD4+IFN-γ+ ($p<0,001$) i CD8+IFN-γ+ ($p<0,001$) u BAL-u u odnosu na perifernu krv. Istovremeno, nema statistički značajne povezanosti u proizvodnji IFN-γ između krvi i BAL-a. Rezultati su prikazani u tablici 12.

Tablica 12. Razlika i povezanost između periferne krvi i BAL-a PPD+ ispitanika u udjelu CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita

	Krv			BAL				
	N	medijan	95%CI	N	medijan	95%CI	U	p
CD4+IFN-γ+ *	16	1	(0.5 - 8)	16	8	(1 – 53)	22,0	**P<0,001**
CD8+IFN-γ+ **	14	2	(1 – 8)	16	9	(2 –27)	28,5	**P<0,001**

* Spearmanov koeficijent korelacije r=-0,15 p=0,634

** Spearmanov koeficijent korelacije r=0,09 p=0,779

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.3.4. Udio CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD- skupini ispitanika

U BAL-u PPD- ispitanika nalazimo značajno veći postotak CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije, a u odnosu na ukupni broj tih CD4+ T-limfocita, a u odnosu na nalaz takvih limfocita u perifernoj krvi (p=0,030). Istovremeno, u toj subpopulaciji limfocita, nalazimo pozitivnu povezanost između periferne krvi i BAL-a (p=0,022). To znači da porast udjela CD4+IFN-γ+/CD4+ T-limfocita u krvi prati i porast udjela tih limfocita u BAL-u (p<0,05). Rezultati su prikazani u tablici 13. Također, u toj tablici vidimo da nema statistički značajne razlike ni povezanosti između krvi i BAL-a u pogledu CD8+IFN-γ+/CD8+ T-limfocita u toj skupini ispitanika.

Tablica 13. Razlika i povezanost između periferne krvi i BAL-a u CD4+IFN-γ+/CD4+ i CD8+IFN-γ+/CD8+ u skupini PPD- ispitanika

	krv			BAL				
	N	medijan	95%CI	N	medijan	95%CI	U	p
CD4+IFN-γ+ /CD4+ *	7	17	(2 - 21)	9	46	(2 - 67)	11.0	**0.030**
CD8+IFN-γ+ /CD8+ **	6	25	(0 - 70)	8	41	(10 - 64)	26.5	0.596

* Spearmanov koeficijent korelacije r=0.83 **p=0.022**

** Spearmanov koeficijent korelacije r=0.63 p=0.129

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.3.5. Analiza rezultata postotka CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u PPD- skupini ispitanika

U tablici 14. vidimo da postoji statistički značajna razlika između krvi i BAL-a u PPD- skupini ispitanika, i to glede postotka CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne stimulacije s PMA i ionomicinom. Naime, u toj skupini ispitanika nalazimo značajno veći postotak CD4+IFN-γ+ T-limfocita u BAL-u u odnosu na perifernu krv (p=0,032). Nema statistički značajne razlike ni povezanosti u pogledu proizvodnje IFN-γ u CD8+ T-limfocitima, a nema ni povezanosti krvi i BAL-a u pogledu udjela CD4+IFN-γ+ T-limfocita.

Tablica 14. Razlika i povezanost između periferne krvi i BAL-a PPD-ispitanika u udjelu CD4+IFN-γ+ i CD8+IFN-γ+ T-limfocita

	krv			BAL				
	N	medijan	95%CI	N	medijan	95%CI	U	p
CD4+IFNγ+ *	7	2.5	(0 – 10)	9	19.5	(2 – 37)	11.5	**0.032**
CD8+IFNγ+ **	6	3.5	(0 – 23)	8	6	(1 - 18)	22.0	0.479

* Spearmanov koeficijent korelacije r=0.34 p=0.460

** Spearmanov koeficijent korelacije r=0.77 p=0.072

U – Mann Whitneyev test

p – statistička značajnost razlike

4.4. Rezultati postotka CD4+IL4+, CD8+IL4+ T-limfocita periferne krvi i BAL u PPD+ i PPD- ispitanika

Uz određivanje proizvodnje IFN-γ u CD4+ i CD8+ T-limfocitima periferne krvi i BAL-a PPD+ i PPD- ispitanika nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije s PMA i ionomicinom u tim T-limfocitima određivali smo i unutarstaničnu proizvodnju IL-4. IL-4 je bio prisutan samo u CD4+ T-limfocitima periferne krvi dva bolesnika. Ti bolesnici do sada nisu bolovali od mogućih alergijskih bolesti, što bi moglo utjecati na takav nalaz. U CD4+ i CD8+ T-limfocitima periferne krvi ostalih bolesnika, te ispitivanim T-limfocitima BAL-a svih bolesnika nismo registrirali postojanje IL-4 što se vidi u tablici 15. Jedan je bolesnik imao 6,4% CD4+ T-limfocita koji su proizvodili IL-4, i to od ukupno 57% navedenih limfocita u perifernoj krvi, nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije. Drugi bolesnik je imao 3% CD4+ T-limfocita koji su proizvodili IL-4 nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije, od ukupno 45% tih T-limfocita u perifernoj krvi. Rezultati nalaza ta dva bolesnika su prikazani u tablici 15.A.

Tablica 15. Prikaz analize CD4+IL4+ i CD8+IL4+ T-limfocita krvi i BAL-a u PPD+ i PPD- skupini ispitanika

	N(PPD+)	N(PPD-)	krv	N(PPD+)	N(PPD-)	BAL
CD4+IL4+	16	4+2*	0	16	9	0
CD8+IL4+	16	7	0	16	9	0

* određivanje postotka CD4+IL4+ T-limocita uspjelo je u šest PPD- bolesnika, a samo je u dva bolesnika dobiven pozitivan nalaz. Ti rezultati prikazani su u tablici 15.A

Tablica 15.A Analiza nalaza CD4+IL4+ T-limfocita periferne krvi u dva bolesnika

Bolesnik	Spol/dob	PPDtest	Rdg pluća	CD4+IL4+	CD4+IL4+/CD4+
1	M/35	neg. (-)	obostrane promjene	3%	6,4%
2	M/47	neg. (-)	obostrane promjene	1%	3%

5. RASPRAVA

Klinička manifestacija plućne tuberkuloze i imunološki odgovor na mikobakterijsku infekciju određeni su imunološkim čimbenicima samog organizma. Imunološki odgovor posredovan stanicama, naročito Th1 subpopulacijom CD4+ T-limfocita, igra ključnu ulogu u eliminaciji mikobakterija. Aktivna tuberkuloza najčešće izaziva jaku reakciju preosjetljivosti na mikobakterijske antigene. Različita klinička stanja (AIDS, zloćudne bolesti, bolesnici pod imunosupresivnom terapijom) rezultiraju u oštećenju stanicama posredovane imunosti. Skoro svi autori slažu se glede uzroka takvoj nespecifičnoj imunosupresiji. Iz takvih se istraživanja isključuju ti bolesnici (43,80,81). Određeni broj bolesnika s aktivnom tuberkulozom nema izraženu staničnu reakciju na tuberkulin. To se stanje naziva anergija.

Mnogi istraživači do sada su nastojali objasniti nereaktivnost na tuberkulin u tuberkuloznih bolesnika. Prvi radovi o tom problemu imali su cilj objektivizaciju anergije i povezanosti *in vivo* kožnog testa na tuberkulin i *in vitro* korelata. Gotovo svi se slažu glede pozitivne povezanosti navedenih testova te kožnog testa PPD kao objektivnog testa za probir anergije (43,80). Razvojem imunologije i tehnologije, istraživanja na tom području postala su sve diferentnija. Tako su u početku neki istraživači pretpostavili mogućnost inhibicije proliferacije protutijelima i/ili imunim kompleksima (80,81,82). Danas se, kako tuberkuloza ponovno postaje svjetski problem (AIDS, rezistencija na standardnu terapiju), ulaže veliki istraživački napor upravo na molekularnom nivou radi razjašnjenja imunologije tuberkuloze, a time i same anergije (64,83).

Anergija se u početku pripisivala slaboj prehrani, ozbiljnosti bolesti i poodmakloj životnoj dobi (84). Prema ovom se istraživanju skupina PPD+ i PPD- tuberkuloznih bolesnika nije razlikovala u pogledu dobi te indeksa tjelesne mase (engl. body mass index, BMI) koji je u okviru svjetskih standarda normalne uhranjenosti (tablica 4.). Slične su rezultate imali i prethodni istraživači (80-82). Sve je to pokazatelj da anergiju ne možemo opravdati osnovnim antropološkim obilježjima. Također, već je ranije primjećeno da su nereaktivni bolesnici s tuberkulozom uglavnom oni s težom kliničkom slikom i radiološki uznapredovalom bolešću. Tako, Lenzini i

sur. prikazuju reaktivnu formu tuberkuloze s lokaliziranim lezijama, dok pri nereaktivnoj formi nalaze izrazito proširenu tuberkulozu na plućima i izvan pluća (80). Mejia –Lopez i sur. izvješćuju da je zajednička oznaka anergičnih bolesnika bila njihovo nereagiranje na kemoterapiju te razvijanje teške forme tuberkuloze od koje su neki umrli (81). U prilog takvim tvrdnjama govore i rezultati našeg istraživanja (tablica 3.). U skupini PPD- ispitanika nalazimo veći postotak onih s recidivom bolesti te izrazito proširenom bolešću prema radiološkom nalazu pluća. U PPD+ skupini ispitanika veći je postotak novooboljelih od tuberkuloze pluća, a radiološke su promjene manje i, uglavnom, sa zahvaćenošću jedne strane pluća. Ta se zapažanja nadopunjuju i pretpostavljaju vremenski duži period trajanja bolesti u PPD- skupini. Slične su rezultate dobili i Baliko i sur. (85). Oni su klasificirali radiološke manifestacije tuberkuloze pluća u odnosu na PPD kožni test. Tako su u skupni s teškom uznapredovalom formom tuberkuloze našli sedam PPD- bolesnika, a samo jedan PPD- bolesnik imao je blagu formu bolesti. U PPD+ skupini bolesnika većina ih je bila s blagom i srednje teškom formom tuberkuloze pluća (85).

U našem smo istraživanju određivali unutarstanične citokine IFN-γ i IL-4 u T-limfocitima zajedno s određivanjem fenotipa T-limfocita površinskim obilježavanjem s monoklonskim protutijelima za CD4 i CD8 molekule, u perifernoj krvi i BAL-u obje skupine ispitanika. Navedene T-limfocita smo kratkotrajno stimulirali s PMA i ionomicinom, što pretpostavlja aktivaciju samo onih T-limfocita koji su bili već u početnoj fazi aktivacije u samoj infekciji s bacilom tuberkuloze. Takva kratkotrajna stimulacija doprinosi staničnoj sekreciji citokina čiji je citokinski profil unaprijed određen. Tako smo dobili statistički značajnu razliku među ispitivanim skupinama i postotku CD4+ T-limfocita BAL-a (tablica 5.). Naime, skupina PPD- bolesnika ima značajno više vrijednosti CD4+ T-limfocita u BAL-u u odnosu na PPD+ skupinu. Nismo našli statistički značajne razlike među skupinama u postotku CD4+ i CD8+ T-limfocita u krvi. Također nije bilo razlike među ispitivanim skupinama u postotku CD8+ T-limfocita u BAL-u kao niti u omjeru CD4+/CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a (tablica 6.). Udio CD4+ T-limfocita u BAL-u PPD+ bolesnika bio je na donjoj granici normale, a u PPD- bolesnika iznad granica referentne vrijednosti za zdravu populaciju. Postotak

CD4+ T-limfocita u krvi, te CD8+ u krvi i BAL-u obje skupine ispitanika bio je u granicama referentnih vrijednosti. Ovakve nalaze moramo uzeti s rezervom jer znamo da su infekcija s M. tuberculosis i posljedični razvoj bolesti dinamički procesi. Mi smo ovim istraživanjem dobili uvid u „presjek“ trenutnog stanja (u vrijeme uzimanja ispitivanih materijala). Kada gledamo razlike i povezanosti između postotka T-limfocita krvi i BAL-a, unutar pojedinih skupina, vidimo da u PPD+ skupini bolesnika imamo statistički značajno viši postotak CD4+ T-limfocita u krvi u odnosu na BAL (tablica 7.). Istodobno pratimo i pozitivnu povezanost CD8+ T-limfocita krvi i BAL-a, tj. porast broja CD8+ T-limfocita u krvi prati istovremeno i porast navedenih limfocita u BAL-u. Analizom rezultata postotka CD4+ T-limfocita između krvi i BAL-a unutar PPD- skupine pratimo nešto veći udio CD4+ T-limfocita u BAL-u, no razlika nije statistički značajna (tablica 8.). Jednako tako, razlika između periferne krvi i BAL-a nije statistički značajna i u pogledu postotka CD8+ T-limfocita unutar iste skupine. U toj skupini ispitanika ne nalazimo statistički značajne povezanosti između krvi i BAL-a u pogledu obje subpopulacije T-limfocita, iako je tendencija negativne povezanosti za CD4+ T- limfocite (niže vrijednosti limfocita u krvi prate više u BAL-u). Svi ovi rezultati zajedno, ukazivali bi na intenzivniji lokalni imuni odgovor, poglavito CD4+ T- limfocita, što sugerira bržu migraciju navedenih limfocita iz periferije u pluća PPD- bolesnika ili možda dulje trajanje bolesti u tih bolesnika. U literaturi nalazimo relativno oskudne podatke vezane za ovu problematiku, a ono što postoji neujednačeno je s obzirom na ispitivane skupine i rezultate.

Boussiotis i sur. objavili su rezultate omjera CD4/CD8 u krvi i nisu našli razlike između PPD+ i PPD- bolesnika i zdravih kontrola. Ti rezultati nisu prikazani u radu, a zaključuje se kako je anergija možda uvjetovana postojanjem imunosupresivnog citokina te da se ona ne oporavlja na terapiju tuberkuloze (83). Naši bi se rezultati mogli uklopiti u nalaze Tsao i sur. Naime, oni su u 45 tuberkuloznih bolesnika podijenih na temelju težine kliničke slike i radiološkog nalaza pluća (nije naznačen PPD status) analizirali CD4+ i CD8+ T-limfocite BAL-a i periferne krvi. Našli su visoki postotak CD3+CD4+ T-limfocita, s relativno niskim postotkom CD3+CD8+ T-limfocita i sukladno tome povećanje omjera CD4/CD8 u BAL-u bolesnika s

uznapredovalom formom tuberkuloze pluća u odnosu na one s blagom tuberkulozom. Suprotno tome, u perifernoj krvi našli su viši postotak CD3+CD8+ s relativno manjim postotkom CD3+CD4+ T-limfocitima i padom omjera CD4/CD8 (39). Slične rezultate dobili su i Schwander i sur. istraživanjem BAL-a i periferne krvi u 16 tuberkuloznih PPD+ bolesnika i 23 PPD+ zdrave kontrole. Pokazali su da u tuberkuloznih bolesnika dolazi do nakupljanja antigen-specifičnih T-limfocita (i CD4+ i CD8+) u plućima(86). Također, Ozaki i sur. pokazali su lokalni limfocitni alveolitis u tuberkuloznih bolesnika, a u dva bolesnika koji su bili PPD- i značajan pad limfocita u perifernoj krvi (87). No, te podatke treba uzeti s rezervom glede veličine skupine (na sedam bolesnika su radili BAL). Neki od tih bolesnika nemaju jasno naznačenu reaktivnost na PPD, ali se može pretpostaviti da oni s proširenijom bolešću imaju i slabiji PPD odgovor. S druge strane, Urdaneta i sur. pokazali su da je u početnim formama tuberkuloze u odnosu na difuzno proširenu bolest veća koncentracija T-limfocita fenotipa CD4+CD45RO (fenotipski stanice memorije) (88). Dieli i sur. su, na šest bolesnika s različitim kliničkim formama tuberkuloze i negativnim kožnim testom na PPD, pokazali da T-limfociti fenotipa CD4+ potječu iz periferne krvi te da se sakupljaju na mjestu same upale (89). Bolesnici su oporavili svoju reaktivnost nakon četiri mjeseca antituberkulozne terapije.

Istraživanja na području imunologije tuberkuloze ukazuju da T-limfociti u suradnji s makrofagima ubijaju i razgrađuju bacile tuberkuloze, a u tom je procesu bitna uloga citokina, prvenstveno IFN-γ koji aktivira mikrobicidnu aktivnost makrofaga (19,21,90). U zadnjih se nekoliko godina govori o citokinima kao presudnom čimbeniku u kontroli mikobakterijske infekcije (21,22). Dosadašnja izvješća o Th1 i Th2 tipu citokinske proizvodnje u ljudskoj tuberkulozi su konfliktna, a malo je poznato o njihovoj ulozi u tkivnom oštećenju (30,31).

U ovom smo istraživanju ustanovili da u krvi PPD- bolesnika ima statistički značajno viši postotak CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ (dvostruko pozitivni, CD4+ IFN-γ+) u odnosu na sveukupni broj aktiviranih CD4+ T-limfocita u krvi (tablica 9.). Udio tih limfocita u BAL-u PPD- bolesnika također je nešto viši, no razlika među skupinama nije statistički

značajna. Uspoređujući ove rezultate s onima iz tablice 5. u kojoj vidimo da je postotak CD4+ T-limfocita u BAL-u PPD- ispitanika veći u odnosu na PPD+, a kad gledamo postotak upravo onih T-limfocita koji proizvode IFN-γ, vidimo da je on veći u krvi PPD- ispitanika. Takav nalaz sugerira da u pluća PPD- bolesnika migriraju i oni CD4+ T-limfociti koji ne proizvode dovoljno IFN-γ važnog u imunološkom odgovoru na M. tuberculosis. Moguće je da je baš zbog toga i klinička slika u tih bolesnika teža. Kada promatramo rezultate istraživanja obje skupine u pogledu samo dvostruko pozitivnih limfocita (CD4+ IFN-γ+) vidimo da među ispitivanim skupinama nema statistički značajne razlike, iako medijani za CD4+ IFN-γ+ sugeriraju da je veći udio tih limfocita u BAL-u PPD- bolesnika (tablica 10.). Rezultati udjela CD8+ IFN-γ+, u odnosu na sveukupni broj tih CD8+ T-limfocita, prate rezultate dobivene za CD4+ IFN-γ+, ali tu ne nalazimo statistički značajne razlike (tablica 9.). Gledajući samo postotak dvostruko pozitivnih CD8+ IFN-γ+ u BAL-u obiju skupina, nalazimo nešto veći postotak tih limfocita u PPD+ skupini bolesnika, no bez statističke značajnosti (tablica 10.). Određeni postotak IL4+ T-limfocita bio je prisutan samo u krvi dva PPD- bolesnika, no to nismo smatrali značajnim (tablica 15.A). U drugih bolesnika IL4+ T-limfociti nisu ustanovljeni (tablica 15.). Svi ovi rezultati navode na misao da u PPD- bolesnika postoji veća aktivnost onih limfocita koji su važni upravo u specifičnom imunološkom odgovoru. Dosadašnji rezultati u literaturi o ovom problemu vrlo su konfliktni. Naime, Baliko i sur. izvjestili su o većoj koncentraciji IL-4 i IL-10 te manjoj IL-12 pozitivnih limfocita periferne krvi (imunocitokemijski) u anergičnih bolesnika (85). Osnovni prigovor tom istraživanju jest da iz njega nisu isključeni bolesnici s mogućim alergijama, a anergični bolesnici označeni su kao osobe s kožnom reakcijom manjom od 10 mm. Sve je to moglo utjecati na rezultate istraživanja. Imunoregulatornim citokinima se smatraju IL-12 i IL18, a induciraju proizvodnju IFN-γ u upalnoj reakciji (91). S druge strane, IL-10 je imunosupresivna molekula s djelovanjem na makrofagnu deaktivaciju i modulaciju proinflamatornih citokina. S obzirom na takve podatke, zbrku u to područje unosi i istraživanje samog Leeja i sur. (91). Naime, oni su određivali ELISA testom razinu IFN-γ te njegovih regulatornih citokina u perifernoj krvi osamnaestero bolesnika s

uznapredovalom, rezistentnom tuberkulozom (nije naznačen PPD test) i devetnaestero PPD+ zdravih kontrola. Našli su povišenu koncentraciju IL-18 i IL-10 u oboljelih od tuberkuloze, a proizvodnja IFN-γ u tih ispitanika bila je reducirana. Istovremeno, našli su visoku povezanost proizvodnje IL-12 s IL-10, ali ne i s IFN-γ ili IL-18. Takvi rezultati sugerirali su kompletnu citokinsku disregulaciju u teškoj formi tuberkuloze koja je rezistentna na uobičajenu terapiju. Slične rezultate dobili su i Boussiotis i sur. Oni su izvjestili o povećanoj proizvodnji IL-10 , ali ne i IFN-γ (ELISA testom) periferne krvi u anergičnih bolesnika, koji tijekom antituberkulozne terapije nisu oporavili svoj odgovor, te sugeriraju da je takav odgovor naprosto prirođen (83). Suprotno tome, neki radovi pokazuju reduciran Th1 odgovor periferne krvi u tuberkuloznih bolesnika u odnosu na PPD+ zdrave kontrole, ali ne i povećan Th2 odgovor. Antituberkulozna terapija u tih je bolesnika oporavila Th1 odgovor (92,93). U prilog oporavka Th1 odgovora govore podaci Marchant-a i sur. Oni su našli da novorođena djeca mogu razviti Th1 tip odgovora nakon imunizacije s BCG-om, dok je Th2 tip prisutan u trenutku rođenja i kasnije. Primjećeno je da novorođenčad imunizirana s BCG-om po rođenju imaju u četvrtom mjesecu života značajno veći nivo IFN-γ u krvi nakon stimulacije s PPD-om. Istovremeno se razina PPD-om induciranog IL-4 nije bitnije mjenjala (94). Dlugovitzky i sur. u svoja dva rada (95,96) izvjestili su da je serumska razina IFN-γ, određena ELISA metodom, značajno veća u bolesnika s minimalnom i srednje proširenom tuberkulozom pluća, za razliku od onih koji imaju uznapredovalu bolest. Istovremeno je razina IL-4 i IL-10 bila veća u bolesnika sa srednje i jako proširenom bolešću. U ovim radovima također nemamo podatke o jačini PPD kožne reakcije. Magnani i sur. izvjestili su o smanjenoj razini IFN-γ u perifernoj krvi četiri PPD kožno negativna tuberkulozna bolesnika u odnosu na 18 PPD kožno pozitivnih tuberkuloznih bolesnika (97). Torres i sur. mjerili su razinu citokina u perifernoj krvi, ELISA testom, sedam tuberkuloznih bolesnika nepoznatog PPD status i dvanaestero zdravih kontrola koji su u djetinjstvu cijepljeni BCG-om, a sada su PPD+. Prema tim podacima tuberkulozni bolesnici su, za razliku od zdravih PPD reaktora, zakazali u proizvodnji IFN-γ, ali su imali visoku razinu IL-10 (98). Slično su u svom istraživanju dobili Hussain i sur.

(99). Rezultate oprečne ovim navedenima, a u skladu s rezultatima ovog rada iznijeli su Yamada i sur. (100). Oni su u 43 bolesnika s tuberkulozom pokazali značajni porast razine cirkulirajućeg IL-18 i IFN-γ usporedno sa zdravim kontrolama. Cirkulirajući IL-18 i IFN-γ korelirao je s težinom bolesti i bio je veći u bolesnika s težim stupnjem bolesti. Također je IL-18 korelirao s IFN-γ. Interesantno je i istraživanje Vankayalapati i sur.: oni su u uzorcima periferne krvi 17 tuberkuloznih bolesnika i deset zdravih kontrola određivali razinu IFN-γ i IL-10 ELISA metodom. Našli su da je koncentracija IFN-γ i IL-10 u tuberkuloznih bolesnika veća, no nakon stimulacije s mikobakterijskim antigenima proizvodnja IFN-γ je bila značajno manja, ali ne i IL-10 što je shvaćeno kao poremećaj u regulaciji citokina (101).

Ranije iznesena istraživanja o citokinskom profilu tuberkuloznih bolesnika rađena su u perifernoj krvi, mjerenjem citokina u supernatantu kultura mononuklearnih stanica, nakon specifične stimulacije PPD-om ili nakon nespecifične stimulacije mitogenima, prvenstveno s ciljem razjašnjenja imunologije bolesti. S obzirom na laboratorijsku metodu (ne znamo koje su sve stanice proizvele mjerene citokine) i neujednačenost skupina ti podaci nisu idealni za usporedbu s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem. Novija istraživanja citokinskog profila tuberkuloznih bolesnika rađena su mjerenjem intracelularnih citokina T-limfocita periferne krvi. Tako su Crevel i sur. mjerili razinu unutarstaničnih citokina CD4+ i CD8+ T-limfocita periferne krvi 18 tuberkuloznih bolesnika klinički različitog stadija bolesti i 14 PPD+ zdravih kontrola. Našli su da među skupinama nema razlike u proizvodnji IFN-γ, ali da je u tuberkuloznih bolesnika veća proizvodnja IL-4 (30). U ovom se radu ne nalaze podaci o mogućim alergijama. Suprotno tome, Smith i sur. pokazuju pad koncentracije IFN-γ i porast IL-4 CD8+ T-limfocita periferne krvi u deset bolesnika s plućnom tuberkulozom u odnosu na deset zdravih BCG-iranih osoba (38). Nema podataka o PPD statusu ili mogućim alergijama niti jedne ispitivane skupine.

U ranije iznijetim studijama zapažamo važnost Th1 i Th2 citokinskog profila T-limfocita periferne krvi u imunom odgovoru na tuberkulozu. Gledajući na moguću povezanost tih citokinskih profila, i lokalno u plućima, nalazimo srazmjernu oskudnost podataka. Među prvim izvješćima o lokalnoj

proizvodnji citokina na samom mjestu infekcije ona su istraživanja Robinsona i sur (102). Oni su našli u devet tuberkuloznih bolesnika, s pozitivnim PPD kožnim testom, značajno veći broj limfocita BAL-a s ekspresijom mRNA za IFN-γ u odnosu na četiri zdrava dobrovoljca. Nije bilo razlike među ispitivanim skupinama u broju T-limfocita i makrofaga, kao i u ekspresiji mRNA za IL-2, IL-4 i IL-5. Slične rezultate poslije su dobili Taha i sur. (103). Somoskövi i sur. analizirali su BAL 43 tuberkulozna bolesnika. Našli su povećanu razinu i Th1 i Th2 citokina, ali bez statističke značajnosti u bolesnika s uznapredovalom bolešću u odnosu na one s blagom formom (104). Ostali istraživači također ukazuju na limfocitni alveolitis fenotipa CD4+ u BAL-u bolesnika s uznapredovalom formom tuberkuloze pluća. U supernatanu kultura mononuklernih stanica ELISA testom našli su značajniju sekreciju IFN-γ , ali ne i IL-4 (105). Najnoviji rezultati Tsao i sur. također podupiru hipotezu da stanice koje proizvode IFN-γ, moguće CD4+ T-limfociti, ključne su komponente u imunom odgovoru na M. tuberculosis, u što se uklapaju i rezultati ovog istraživanja. Oni su u BAL-u 45 bolesnika s aktivnom tuberkulozom pokazali značajno veću razinu IFN-γ i IL-2 u teškoj formi bolesti, koji su se smanjili nakon antituberkulozne terapije. Istovremeno, u perifernoj krvi našli su povišenu razinu IL-2, ali ne i IFN-γ (106).

Većina se istraživača, prema tome, slaže glede snažnog Th1 odgovora i proizvodnje IFN-γ u BAL-u usporedno sa slabim odgovorom u perifernoj krvi. Novija istraživanja oboljelih od tuberkuloze, i na životinjskim modelima, također ukazuju da je imuni odgovor za vrijeme tuberkulozne infekcije dominantan u plućima (90,107,108,109). Sve to potvrđuje dominaciju plućnog imunog odgovora i aktivno „regrutiranje“ specifičnih CD4+ T-limfocita u pluća u vrijeme tuberkulozne infekcije. U ovom se istraživanju prati statistički značajna razlika u udjelu limfocita koje proizvode IFN-γ u odnosu na sveukupni broj tih limfocita bilo CD4+ ili CD8+, između periferne krvi i BAL-a unutar pojedinih skupina. Naime, u PPD+ skupini nalazimo u krvi, usporedno s BAL-om, statistički značajno manji postotak CD4+ ili CD8+ T-limfocita koje proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne stimulacije s PMA i ionomicinom (tablica 11.). Sukladno podacima iz

literature, rezultati i ovog istraživanje govore o većoj imunološkoj aktivnosti u BAL-u bolesnika s aktivnom plućnom tuberkulozom. Slične rezultate dobili smo i promatranjem postotka samo dvostruko pozitivnih stanica (CD4+IFN-γ ili CD8+IFN-γ+). Ti rezultati prikazani su u tablici 12. Krv u PPD+ skupini ima statistički značajno manje spomenutih dvostruko pozitivnih limfocita. Istovremeno u pogledu povezanosti, u toj skupini nalazimo da pad CD8+IFN-γ+ T-limfocita periferne krvi, u odnosu na sveukupni broj aktiviranih CD8+ T-limfocita, prati porast tih limfocita u BAL-u (negativna povezanost). Analizirajući te podatke u PPD- skupini ispitanika nalazimo značajne razlike samo u pogledu CD4+IFN-γ+ T-limfocita (tablica 13. i 14.). Naime u krvi PPD- bolesnika nalazimo značajno manji postotak i CD4+IFN-γ+ T-limfocita u odnosu na sveukupni broj tih aktiviranih CD4+ T-limfocita i samo dvostruko pozitivnih (CD4+IFN-γ+). Istovremeno, porast CD4+IFN-γ+ T-limfocita krvi u odnosu na sveukupni broj tih aktiviranih CD4+ T-limfocita, prati porast broja tih limfocita u BAL-u (pozitivna povezanost). Ti rezultati sugeriraju smanjeni imuni odgovor limfocita periferne krvi i povećanu aktivnost u plućima. Istovremeno, aktivnost CD4+ T limfocita u PPD- skupini bolesnika nije popraćena povećanjem aktivnosti u CD8+ T-limfocitima.

U imunom dogovoru u aktivnoj tuberkulozi sudjeluju razne stanice koje proizvode različite citokine. Prema tome, važna je tehnika određivanja pojedinih citokina i saznanje o aktivnosti pojedinih stanica u citokinskoj proizvodnji. Primjerice, Tsao i sur. izvjestili su o povećanoj proizvodnji makrofagnih citokina u aktivnoj tuberkulozi (110). Tako su u jednoj studiji na ljudima (107), T-limfociti bili izdvojeni od leukocita u BAL-u i inkubirani s mononuklearnim stanicama periferne krvi i antigenima M. tuberculosis, a potom su mjerili ugradnju ^{3}H-timidina i sintezu DNA u stanicama BAL-a. Koristeći se ELISPOT testom našli su veći broj stanica u BAL-u koje produciraju IFN-γ, sa specifičnošću za M. tuberculosis, u osoba koji su bili u izravnom kontaktu s oboljelima od aktivne tuberkuloze, za razliku od zdravih PPD+ osoba. U tom su se radu istraživači koristili kompleksnom eksperimentalnom tehnikom zbog zanimanja o mogućem supresivnom utjecaju alveolarnih makrofaga i njihove nepodesnosti kao antigen-prezentirajućih stanica. Učinkovitost antigen-prezentirajućih stanica i

impresivan antigen-specifični CD4+ limfocitni citokinski odgovor pokazali su i drugi istraživači u jednostavnije dizajniranim studijama (111).

Rezultati ovog istraživanja uklapaju se i u rezultate dosadašnjih sličnih istraživanja. Naime, Gerosa i sur. u svom radu su objavili da je citokinska produkcija IFN-γ i IL-10 (određivani su RIA analizom) prosječno veća u BAL-u tuberkuloznih bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i perifernu krv (112). Napretkom tehnike, naročito protočne citometrije koja omogućava određivanje fenotipa stanica i njegovu proizvodnji odrerđenih citokina, otvaraju se novi vidici u istraživanju uloge citokina u tuberkuloznom procesu. Najnovija istraživanja Garcije i sur. (32) ukazuju na reduciranu proizvodnju Th1 citokina (naročito IFN-γ) u perifernoj krvi. Istovremeno, na mjestu tuberkulozne bolesti (ispitivali su svega dva uzorka BAL-a), CD4+ i CD8+ T-limfociti su proizvodili Th1 citokine IL-2 i IFN-γ. Istraživali su jedanaest bolesnika s aktivnom tuberkulozom (od toga su napravili samo dvije BAL-e) i četrnaest kontrola. Oni su uz Th1 citokine određivali i Th2 citokine navedenih T-limfocita, čija je uloga u tuberkulozi manje jasna, a dotadašnji su rezultati istraživanja na tom području kontroverzni. U ovom istraživanju, IL-4 nije bio detektabila, iako je rađen standardnim načinom, odnosno metodom koja je imala pozitivne rezultate u analizi IL-4 u drugim uzorcima (78,113). Svojim istraživanjem autori sugeriraju „odjeljivanje“ specifičnih T-limfocita, uglavnom Th1 fenotipa iz periferne krvi u pluća. Još su dalje Barry i sur. (33) određivali citokinski profil CD4+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u 22 bolesnika s tuberkulozom (plućna i izvanplućna tuberkuloza) i 14 kontrola (bolesnici koji su zahtijevali bronhoskopiju zbog drugih bolesti). Svi tuberkulozni bolesnici bili su HIV negativni, a nema podataka o kožnom testu na PPD. Našli su značajnu limfocitozu u BAL-u bolesnika i s plućnom i izvanplućnom tuberkulozom. Omjer CD4/CD8 u tuberkuloznih bolesnika bio je varijabilan, ali u referentnim vrijednostima za zdravu populaciju, što se uklapa u rezultate ovog istraživanja. Postotak CD4+ T-limfocita koji su proizvodili IFN-γ u BAL-u, nakon inkubacije s PPD-om, svih tuberkuloznih bolesnika bio je značajno veći u odnosu na kontrolnu skupinu. Potom su istraživali ima li razlike u aktivnosti CD4+ T-limfocita u perifernoj krvi između bolesnika s aktivnom tuberkulozom i zdravih BCG-

iranih osoba. Tu nisu našli statistički značajne razlike, što se uklapa u dosadašnja saznanja o tom području. Naime, prilikom planiranja ovog istraživanja mogli smo oformiti dvije skupine ispitivanih bolesnika, gdje je PPD+ skupina ujedno i kontrola budući da je u Republici Hrvatskoj zakonski obavezno BCG-e. U sve se to uklapaju i rezultati Barry i sur. koji su našli limfocitozu i povišenu proizvodnju IFN-γ u BAL-u bolesnika s izvanplućnom tuberkulozom. Također, u tom su radu našli i slabu aktivnost CD4+ T-limfocita u perifernoj krvi, za razliku od BAL-a tuberkuloznih bolesnika. Time su pretpostavili da se antigen specifični T-limfociti aktivno nakupljaju na mjestu infekcije u plućima, što rezultira relativnom deplecijom u krvi.

Uspoređujući rezultate ovog istraživanja s onima iz literature, naročito s dva zadnja koja su najsličnija našem, vidimo da se oni uglavnom uklapaju u dosadašnja saznanja o imunologiji tuberkuloze. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na veću imunološku aktivnost CD4+ T- limfocita u PPD- bolesnika u odnosu na PPD+. Istovremeno, u obje skupine ispitanika nalazimo veću imunološku aktivnost u BAL-u u odnosu na perifernu krv. Takvi rezultati sugeriraju veću imunološku aktivnost, naročito CD4+ T-limfocita, lokalno u plućima na mjestu tuberkulozne upale.

6. ZAKLJUČAK

1. Skupine PPD+ i PPD- ispitanika ujednačene su obzirom na dob i indeks tjelesne mase.
2. Udio CD4+ T-limfocita u BAL-u PPD- ispitanika je značajno veći u odnosu na udio tih T-limfocita u BAL-u PPD+ skupine ispitanika.
3. Nema razlike među skupinama u udjelu CD4+ T-limfocita u krvi, te CD8+ T-limfocita u krvi i BAL-u.
4. Nema razlike između skupina u omjeru CD4+/CD8+ T-limfocita, ni u krvi ni u BAL-u.
5. U perifernoj krvi PPD+ skupine ispitanika postoji veći postotak CD4+ T-limfocita u odnosu na BAL.
6. Porast udjela CD8+ T-limfocita u perifernoj krvi prati i porast udjela tih T-limfocita u BAL-u u PPD+ skupini ispitanika.
7. Između krvi i BAL-a PPD- skupine ispitanika nema značajnih ni razlika ni povezanosti u postotku CD4+ i CD8+ T-limfocita.
8. U perifernoj krvi PPD- ispitanika u odnosu na PPD+ ispitanike nalazimo veći postotak CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije, a u odnosu na ukupni postotak tih T-limfocita u perifernoj krvi.
9. Nema razlike između ispitivanih skupina u postotku CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije, u odnosu na postotak tih limfocita u BAL-u, te CD8 T-limfocita u krvi i BAL-u.
10. Udio i CD4+ i CD8+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije je veći u BAL-u, u odnosu na krv, u PPD+ skupini ispitanika.
11. Pad udjela CD8+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ u odnosu na sveukupni broj tih T-limfocita periferne krvi prati porast udjela tih limfocita u BAL-u u PPD+ skupini ispitanika.
12. Udio CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije u odnosu na ukupni postotak tih T-limfocita u

BAL-u je veći u odnosu na udio tih limfocita u perifernoj krvi u PPD- skupini ispitanika.

13. U PPD- ispitanika nema razlike između BAL-a i krvi u pogledu CD8+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ.
14. Porast udjela CD4+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ+, u odnosu na sveukupni postotak tih T-limfocita u perifernoj krvi nakon kratkotrajne poliklonske stimulacije, prati porast udjela tih T-limfocita u BAL-u PPD- skupine ispitanika.
15. Prisutnost IL-4 potvrdili smo u CD4+ T-limfocitima periferne krvi dva PPD- bolesnika s plućnom tuberkulozom, dok su ostali T-limfociti periferne krvi i BAL-a zakazali u proizvodnji navedenog citokina.

7. SAŽETAK

Stanicama je posredovana imunost, naročito CD4+ T-limfocitima, ključna u eliminaciji mikobakterija u tuberkulozi. Dosadašnja saznanja o Th1 i Th2 tipu citokinske proizvodnje u ljudskoj tuberkulozi konfliktna su i malo se zna o njihovoj ulozi u tkivnom oštećenju.

Mi smo istraživali citokinski odgovor CD4+ i CD8+ T-limfocita periferne krvi i BAL-a u 20 PPD+ i devet PPD- bolesnika s aktivnom plućnom tuberkulozom. Uzorci periferne krvi i BAL-a svakog bolesnika bili su kratkotrajno inkubirani s PMA i ionomicinom ili bez njih, nakon čega smo na protočnom citometru određivali CD4+ i CD8+ T-limfocite koji su proizvodili IFN-γ ili IL-4. Između PPD+ i PPD- skupine nije bilo razlike u dobi ispitanika i BMI.

PPD- bolesnici su, u odnosu na PPD +, imali značajno veći postotak CD4+ T-limfocita u BAL-u. Nije bilo značajnije razlike među grupama u postotku CD4 T-limfocita u perifernoj krvi i CD8+ u perifernoj krvi i BAL-u. Istovremeno, PPD- bolesnici iskazali su značajno veći postotak CD4+ T-limfocita u perifernoj krvi koji su proizvodili IFN-γ, a u odnosu na sveukupni broj tih aktiviranih CD4+ T-limfocita. Nije bilo razlike između skupina u proizvodnji IFN-γ od CD8+ T-limfocita krvi i BAL-a i CD4+ T-limfocita BAL-a. CD4+ T-limfociti periferne krvi dva PPD- bolesnika su proizvodili IL-4, a ostali su T-limfociti periferne krvi i BAL-a zakazali u proizvodnji navedenog citokina.

Unutar PPD+ skupine bolesnika našli smo značajno veći postotak i CD4+ i CD8+ T-limfocita koji proizvode IFN-γ u BAL-u u odnosu na perifernu krv, dok je u PPD- skupine BAL bio aktivniji samo u CD4+ proizvodnji IFN-γ.

Ovakvi rezultati sugeriraju veću imunološku aktivnost u PPD- bolesnika u krvi, a BAL je obje skupine ispitanika aktivniji u odnosu na perifernu krv. Sve to sugerira da u tuberkulozi dolazi do odjeljivanja T-limfocita, naročito onih koji proizvode IFN-γ, iz periferne krvi u pluća.

8. SUMMARY

„Cytokine profile of T-lymphocytes from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in patients with active pulmonary tuberculosis“

Cell-mediated immunity, especially from CD4+ T-lymphocyte function, plays an important role in eliminatig mycobacteria in tuberculosis. Reports on Th1-type and Th2-type cytokines in human tuberculosis are conflicting, and little is known about their role in tissue damage.

We examined the cytokine responses of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (BAL) from 20 purified protein derivative skin-positive (PPD+) and from nine PPD skin-negative patients with active pulmonary tuberculosis. Parallel blood and BAL fluid samples from each subject were shortly incubated with or without PMA and ionomycin, and the proportions of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes producing interferon-γ (IFN-γ) or interleukin-4 (IL-4) were measured by flow cytometry. There was no age or BMI difference of examiness between PPD+ and PPD- group.

PPD- patients, in relation to PPD+ patients, had a significant higher percent of CD4+ T-lymphocytes in the BAL. No significant difference was found between groups in percent CD4+ T-lymphocytes in peripheral blood and CD8+ T-lyphocytes peripheral blood and BAL. At the same time, PPD-patients have shown a significant higher percent of CD4+ T-lymphocytes which produced IFN-γ in relation to the entire number activated CD4+ T-lymphocytes in a peripheral blood. No significant difference was found in the production IFN-γ of CD8+ T-lymphocytes peripheral blood and BAL and CD4+ T-lymphocytes in the BAL. CD4+ T-lymphocytes of peripheral blood in two PPD-patients produced IL-4 while the rest of the T-lymphocytes peripheral blood and BAL suppressed the production of this cytokine.

Among PPD+ patients group we have found a higher percent of CD4+ as well as CD8+ T-lymphocytes which produce IFN-γ in BAL in relation to

the peripheral blood, while the BAL in PPD- group was more active only in CD4+ production IFN-γ.

These results suggest a higher immune activity in the blood of PPD- patients while the BAL is more active in both groups of examinees in relation to the peripheral blood. It suggests that the separation of T-lymphocytes, specially those producing IFN-γ from peripheral blood to the lungs, occurs in tuberculosis.

9. LITERATURA

1.Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M i sur. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proct Natl Acad Sci USA 2002; 99(6):3684-3689.

2. Rook GAW, Seak G, Ustjanowski A. M. tuberculosis: immunology and vaccination. Eur Respir J 2001; 17:537-557.

3. Tonge PJ. Another brick in the wall. Nature Structural Biology 2000; 7:94-96.

4. Stenger S, Modlin RL. Control of Mycobaterium tuberculosis through mammalian Toll-like receptors. Currenet Opinion in Immunology 2002; 14:452-457.

5. Young DB, Kaufmann SH, Hermans PW, Thole JE. Mycobacterial protein antigens: a compilation. Mol Microbiol 1992; 6(2):133-145.

6. Andersen P, Askgaard D, Ljungquist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from Mycobacterium tuberculosis during growth. Infect Immun 1991; 59:1905-1910.

7. Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. Clinical Infectious Diseases 1993; 17:968-975.

8. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356:1099-1104.

9. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and

virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. Infect Immun 1996; 64:16-22.

10 .Roche PW, Winnter N, Triccas JA, Feng CG, Britton WJ. Expresion of Mycobacterium tuberculosis MPT64 in recombinant M. smegmatis: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis. Clin Exp Immunol 1996; 103:226-232.

11. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 1998; 393:537-544.

12. Young DB. A post-genomic perspective. Nature Med 2001; 7:11-12.

13. Raupach B, Kaufmann SHE. Immune responses to intracellular bacteria. Curr Opin Immunol 2001; 13:417-428.

14. Welsh DA, Mason CM. Host defense in respiratory infections. Med Clin North Am 2001; 85(6):1329-1347.

15. Crapo JD, Harmsen A, Sherman MP, Musson RA. Pulmonary immunobiology and inflammation in pulmonary diseases. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162:1983-1986.

16. Sim GK, Augustin A. Recent advances in the immunobiology of the lung. U: Gardner DE, Crapo JE, McClellan RO, ur. Toxicology of the lung. Philadelphiy: Taylor and Fracis, 1999:173-195.

17. Rook GA, Zumla A. Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. Curr Opin Pulm Med 2001; 7(3):116-123.

18. Moore BB, Moore TA, Toews GB. Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defences. Eur Respir J 2001; 18:846-856.

19. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157:679-691.

20. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161:1376-1395.

21. Barnes PF, Wizwl B. Type 1 cytokines and the pathogenesis of tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161:1773-1774.

22. Holland SM. Immunotherapy of mycobacterial infections. Semin Respir Infect 2001; 16:47-59.

23. Dekaris D, Rabatić S, Imunologija. U: Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, ur. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak, 2003:52-67.

24. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, T cell-mediated immunity. U: Immunobiology: The immune system in health and disease. New York: Garland Publishing, 2001:295-340.

25. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, Signaling through lymphocyte receptors. U: Immunobiology: The immune system in health and disease. New York: Garland Publishing, 1999:163-193.

26. Chapter 13, Effector mechanisms of cell-mediated immunity. U: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, ur. Celleular and molecular immunology. Philadelphia. W.B. Saunders company, 2000:291-308.

27. Merchant RK, Schwartz DA, Helmers RA, Dayton CS, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage cellularity. The distribution in normal volunteers. Am Rev Respir Dis 1992; 148:448-453.

28. Nel AE, Slaughter N. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: Role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. J Alergy Clin Immunol 2002; 109(6):901-915.

29. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. Ann Rheum Dis 2002; 61(suppl II):1154-1158.

30. Crevel R, Karyada E, Preyers F, Leendres M, Kullberg BJ, Nelwan RHH, Meer JWM. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. J Infect Dis 2000; 181:1194-1197.

31. Fenhalls G, Wong A, Bezuidenhout J, Helden P, Bardin P, Lukey PT. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. Infect Immun 2000; 68:2827-2836.

32. Garcia M, Vargas JA, Castejón, Navas E, Durantez A. Flow-cytometric assessment of lymphocyte cytokine production in tuberculosis. Tuberculosis 2002; 82(1):37-41.

33. Barry SM, Lipman MC, Bannister B, Johnson MA, Janossy G. Purified protein derivative-actived type 1 cytokine-producing CD4+ T lymphocytes in the lung: a characteristic feature of active pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. J Infect Dis 2003; 187:243-250.

34. Jo EK, Park JK, Dockrell HM. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. Curr Opin Infect Dis 2003; 16:205-210.

35. Kaufmann SHE. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. Tuberculosis 2003; 83:107-111.

36. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. Tuberculosis 2003; 83:98-106.

37. Lazarević V, Flynn JA. CD8+ T cells in tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2002: 166:1116-1121.

38. Smith SM, Klein MR, Malin AS, Sillah J, McAdam KPWJ, Dockrell HM. Decreased IFN-γ and increased IL-4 production by human CD8+ T cells in response to Mycobacterium tuberculosis in tuberculosis patients. Tuberculosis 2002; 82(1):7-13.

39.Tsao TCY, Chen CH, Hong JH, Hsieh MJ, Tsao KC, Lee CH. Shifts of T4/T8 T lymphocytes from BAL fluid and peripheral blood by clinical grade in patients with pulmonary tuberculosis. Chest 2002; 122:1285-1291.

40. Lahn M. The role of cells in the airwais. J Mol Med 2000; 78:409-425.

41. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Signaling through lymphocyte receptors. U: Immunobiology:The immune system in health and disease. New York, 1999:163-193.

42. Lipskomb MF, Bice DE, Lyons CR, Schuyler MR, Wilkes D. The regulation of pulmonary immunity. Adv Immunol 1995; 59:369-455.

43. Boras Z, Juretić A, Rudolf M, Užarević B, Treščec A. Cellular and humoral immunity to purified protein derivative (PPD) in PPD skin reactive and nonreactive patients with pulmonary tuberculosis: comparative analysis of antigen specific lymphocyte proliferation and IgG antibodies. Croat Med J 2002; 43(3):359-363.

44. Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. APMIS 1995; 103:161.

45. Callard R, Gearing A. Cytokine receptor superfamilies. U: The cytokine factsbook. London. Academic Press Limited, 1994:18-27.

46. Schreiber RD, Chaplin DD. Cytokines, inflammation and innate immunity. U: Frank MM, Austen KF, Claman HN, Unanue ER, ur. Immunologic diseases. New York: Little, Brown and Company, 1995:279-310.

47. Boehm U, Klamp T, Groot M. Cellular responses to interferon-γ. Annu Rev Immunol 1997; 15:749-795.

48. Song CH, Kim HJ, Park JK et al. Depressed IL-12, but not IL-18 production in response to a 30- and 32-kDa mycobacterial antigen in patients with active pulmonary tuberculosis. Infect Immun 2000; 68:4477-4484.

49. Fenhails G, Stevens L, Bezuidenhout J et al. Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. Immunology 2002; 105:325-335.

50. Keane J, Gershon S, Wise RP et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med 2001; 345:1098-1104.

51. Orme JM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. Immunol Today 1999; 20(7):307312.

52. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ et al. IL-10-producing T cells supress immune responses in anergic tuberculosis patients. J Clin Invest 2000; 105:1317-1325.

53. Ekerfelt C, Ernerudh J, JenMalm MC. Detection of spontaneous and antigen-induced human interleukin-4 responses in vitro: comparison of ELISpot, a novel ELISA and real-time PCR. J Immunol Methods 2002; 260:55-67.

54. Schauer U, Jung T, Krug N, Frew A: Measurement of intracellular cytokines. Immunol Today 1995; 17:305-306.

55. Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. J Immunol Methods 1998; 212:89-98.

56. Andersson U, Andersson J, Lindfors A, Wagner K, Möller G, Heusser CH. Simultaneous production of interleukin 2, interleukin 4, interferon gamma by activated human blood lymphocytes. Eur J Immunol 1999; 20:1591-1596.

57. Nylander S, Kalies I. Brefeldin A, but not monoensim, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. J Immunol Methods 1999, 224:69-76.

58. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. A gentle fixation and permeabilization method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA quantification Cytometry 1991; 12:279-285.

59. Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. Eur Respir J 2002; 36:54s-65s.

60. Kurth R, Haas WH. Epidemiology, diagnostic possibilites, and treatment of tuberculosis. Ann Rheum Dis 2002; 61(Suppl II):ii59-ii61.

61. Pavlović M, Peroš-Golubičić T. Tuberkuloza. U: Vrhovac B, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, ur. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak d.o.o., 2003:1559-1570.

62. Grange JM. Effective vaccination against tuberculosis-a new ray of hope. Clin Exp Immunol 2000; 120:232-234.

63. Kaufman SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis. Macmillan Magazines 2001; 1:20-30.

64. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infecton. Lancet Infect Dis 2003; 3:578-590.

65. Long R, Gardam M, Tumor necrosis factor-(alpha) inhibitors and the reactivation of latent tuberculosis infection. CMAJ 2003; 168(9):1153-1156.

66. Vorken H, Massy SG, Fallat R, Kaplan L, Kleeman CR. Antidiuretic principle in tuberculous lung tissue of a patient with pulmonary tuberculosis and hyponatremia. Ann Intern Med 1970; 72:383-387.

67. Balabanić-Kamauf B. Mikrobiološke pretrage tuberkuloze i pneumonija. U: Peroš-Golubičić T, Pavlović M, ur. Tuberkuloza, pneumonija, pneumonitis-upalne bolesti plućnog parenhima. Zagreb: Medicinska Naklada, 2002:21-34.

68. Young DB. Ten years of research progress and what's to come. Tuberculosis 2003; 83:77-81.

69. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. Eur Respir J 2002; 20 (suppl. 36):87s-94s.

70. Mor N, Simon B, Heifets L. Bacteriostatic and bactericidal activities of Benzoxazinorifamycin KRM-1648 against Mycobaterium tuberculosis and Mycobacterium avium in human macrophages. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:1482-1485.

71. Bastian I, Stapledon R, Colebunders R. Current thinking on the menagement of tuberculosis. Curr Opin Pulm Med 2003; 9:186-192.

72. Nash DR, Douglass JE. Anergy in active pulmonary tuberculosis. Chest 1980; 77:32-37.

73. Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17:968-975.

74. Gagro A, Rabatić S, Bendelja K, Jelačić J, Gotovac K, Sabioncello A, Dekaris D. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. Eur J Immunol 1999; 24:125-131.

75. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J Immunol Methods 1993; 159:197-207.

76. Baughman RP, Drent M. Role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. Clin Chest Med 2001; 22:331-341.

77. Rennard SI, Aalbers R, Bleecker E, Klech H, Rosenwasser L, Olivieri D, Sibille Y. Bronchoalveolar lavage: performance, sampling procedure, processing and assessment. Eur Respir J 1998; 11(suppl. 26):13s-15s.

78. Inui N, Chida K, Suda T, Nakamura H. Th1/Th2 and Tc1/Tc2 profiles in peripheral blood and broncholaveolar lavage fluid cells in pulmonary sarcoidosis. J Allergy Clin Immunol 2001; 107:337-344.

79. Jason J, Larned J. Single-cell cytokine profiles in normal humans: comparison of flow cytometric reagents and stimulation protocols. J Immunol Methods 1997; 207:13-22.

80. LenziniL, Rottoli P, Rottoli L. The spectrum of human tuberculosis. Clin Exp Immunol 1977; 27:230-237.

81. Mejia-Lopez H, Vaca-garcia O, Cristerna-Aquirre JM, Cruz-Chavaz A, Selman-Lama M, Taylor ML. Tuberculous anergic sera or purified protein derivative treatmen induces modification in lymphocyte transformation of cells from patients with tuberculosis. J Clin Microb 1990; 28:344-349.

82. Bhatnagar R, Malaviya AN, Narayanan S, Rajgopalan P, Kumar R, Bharadway OP. Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1977; 115:207-212.

83. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ i sur. IL-10 producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. J Clin Invest 2000; 105:1317-1325.

84. Penn RL, Betts RF. Lower respiratory tract infections (including tuberculosis). U: Reese RE, Betts RF, ur. A practical approach to infectious diseases. Boston/Toronto/London: Little, Brown and Company, 1991: 199-277.

85. Balikó Z, Szereday L, Szekeres-Bartho J. Th2 biased immune response in cases with active Mycobacterium tuberculosis infection and tuberculin anergy. Immunol Med Microbiol 1998; 22:199-204.

86. Schwander SK, Torres M, Sada E i sur. Enhanced responses to Mycobacterium tuberculosis antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 1998; 178:1434-1445.

87. Ozaki T, Nakahira S, Tani K, Ogushi F, Yasuoka S, Ogura T. Differential cell analysis in bronchoalveolar lavage fluid from pulmonary lesions of patients with tuberculosis. Chest 1992; 102:54-59.

88. Urdaneta E, Feo-Figarella E, Montalvo C i sur. Characterization of local memory cells in stage-classified pulmonary tuberculosis: preliminary observation. Scand J Immunol 1998; 47:496-501.

89. Dieli F, Singh M, Spallek R i sur. Change of Th0 to Th1 cell-cytokine profile following tuberculosis chemotherapy. Scand J Immunol 2000; 52:96-102.

90. Condos R, Rom WN, Weiden M. Lung-specific immune response in tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4(2):s11-s17.

91. Lee JS, Song CH, Kim CH i sur. Profiles of IFN-γ and its regulatory cytokines (IL-12, IL-18 and IL-10) in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis. Clin Exp Immunol 2002; 128:516-524.

92. Zhang M, Lin Y, Iyer DV i sur. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1995; 63(8):3231-3234.

93. Bhattacharyya S, Singla R, Dey AB, Prasad HK. Dichotomy of cytokine profiles in patients and high-risk healthy subjects exposed to tuberculosis. Infect Immun 1999; 67(11):5597-5603.

94. Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO et sur. Newborns develop a Th1-type immune response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin vaccination. J Immunol 1999; 163:2249-2255.

95. Dlugovitzky D, Torres-Morales A, Rateni L i sur. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. FEMS Immunol Microbiol 1997; 18:203-207.

96. Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L i sur. *In vitro* synthesis of interferon-γ, transforming growth factor-β and interleukin-1β by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the severity of pulmonary involvement. Scand J Immunol 1999; 49:210-217.

97. Magnani ZI, Confetti C, Besozzi G i sur. Circulating, Mycobacterium tuberculosis-specific lymphocytes from PPD skin test-negative patients with tuberculosis do not secrete interferon-gamma (IFN-γ) and lack the cutaneous lymphocyte antigen skin-selective homing receptor. Clin Exp Immunol 2000; 119:99-106.

98. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy houshold contact in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1998; 66(1):176-180.

99. Hussain R, Kaleem A, Shahid F i sur. Cytokine profiles using whole-blood assays discriminate between tuberculosis patients and healthy endemic controls in a BCG-vaccinated population. I Immunol Methods 2002; 264:95-108.

100. Yamada G, Shijubo N, Shigehara K, Okamura H, Kurimoto M, Abe S. Increased levels of circulating interleukin-18 in patients with advanced tuberculosis. Am J Respi Crit Care Med 2000; 161:1786-1789.

101. Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE i sur. Serum cytokine concentrations do not parallel Mycobacterium tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis Clin Infect Dis 2003; 36:24-28.

102. Robinson DS, Ying S, Taylor IK i sur. Evidence for a Th1-like bronchoalveolar T-cell subset and predominance of interferon-gamma gene activation in pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1994; 149:989-993.

103. Taha RA, Kotsimbos TC, Song YL, Menzies D, Hamid Q. IFN-γ and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:1135-1139.

104. Somoskövi A, Zissel G, Zipfel PF i sur. Different Cytokine patterns correlate with the extension of disease in pulmonary tuberculosis. Eur Cytokine Netw 1999; 10(2):135-141.

105. Condos R, Rom WN, Liu YM, Schluger NW. Local immune response correlate with presentation and outcome in tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157:729-735.

106. Tsao TCY, Huang CC, Chiou WK, Yang PY Hsieh MJ, Tsa KC. Levels of interferon-γ and interleukin-2 receptor-α for bronchoalveolar lavage fluid and serum were correlated with clinical grade and treatment of pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6(8):720-727.

107. Schwander SK, Torres M, Carranza C i sur. Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of Mycobacterium tuberculosis in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community J Immunol 2000; 165:1479-1485.

108. Chackerian AA, Perera TV, Behar SM. Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 2001; 69:2666-2674.

109. Saunders BM, Frank AA, Orme JM, Cooper AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. Infect Immun 2000; 68(6):3322-3326.

110. Tsao TCY, Hong J, Huang C, Yang P, Liao SK, Chang KSS. Increased TNF-α, IL-1β and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. Tuberc Lung Dis 1999; 79(5):279-285.

111. Havenith CE, van Haarst JM, Breedijk AJ i sur. Enrichment and characterization of dendritic cells from human bronchoalveolar lavages. Clin Exp Immunol 1994; 96:339-343.

112. Gerosa F, Nisii C, Righetti S i sur. CD4+ T cell clones producing both interferon-γ and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. Clin Immunol 1999; 92(3):224-234.

113. Bendelja K, Gagro A, Baće A i sur. Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry. Clin Exp Immunol 2000; 121:332-338.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27. veljače 1960. godine u Klobuku, Republika Bosna i Hercegovina. Osnovnu sam školu završila u Klobuku, a gimnaziju u Ljubuškom. Medicinski fakultet u Zagrebu upisala sam 1978. godine gdje sam diplomirala 1983. godine. Stručni ispit položila sam u Mostaru 1984. godine, a od 1985. do 1995. godine radila sam u Bolnici za plućne bolesti i TBC Klenovnik. Specijalistički ispit iz pulmologije položila sam 1991. godine u Zagrebu. Od 1995. godine radim u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“ u Zagrebu, kao liječnica specijalist pulmologije. Postdiplomski studij iz Alergologije i kliničke imunologije završila sam u Zagrebu. Stupanj magistra znanosti iz područja medicine (imunologija tuberkuloze) stekla sam 1997. godine. Do sada sam objavila dva znanstvena rada u časopisu s međunaradno priznatom recenzijom.