

# Optimizacija in vitro aktivacije humanih T limfocita pomoću protutijela usmjerenih na CD3, CD28 i CD137 te interleukina 2 radi određivanja perifernih Th17 limfocita kod zdravih mladih ispitanika

---

Munjić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:560047>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Dora Munjić**

**OPTIMIZACIJA IN VITRO  
AKTIVACIJE HUMANIH T LIMFOCITA  
POMOĆU PROTUTIJELA  
USMJERENIH NA CD3, CD28 I CD137  
TE INTERLEUKINA 2 RADI  
ODREĐIVANJA PERIFERNIH TH17  
LIMFOCITA KOD ZDRAVIH MLADIH  
ISPITANIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Dora Munjić**

**OPTIMIZACIJA IN VITRO  
AKTIVACIJE HUMANIH T LIMFOCITA  
POMOĆU PROTUTIJELA  
USMJERENIH NA CD3, CD28 I CD137  
TE INTERLEUKINA 2 RADI  
ODREĐIVANJA PERIFERNIH TH17  
LIMFOCITA KOD ZDRAVIH MLADIH  
ISPITANIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju na Medicinskom fakultetu Osijek Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.

Neposredni voditelj: Nikolina Kolobarić, mag. prot. nat. et amb.

Rad ima 33 lista i 6 slika.

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. na prihvaćenom mentorstvu, stručnom vodstvu, svoj pruženoj pomoći i savjetima pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se Nikolini Kolobarić, mag. prot. nat. et. amb. na trudu, strpljenju i pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela diplomskog rada.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima, jer bez njihove pomoći ne bih ostvarila svoje ciljeve.*

*Hvala svima koji su vjerovali u mene i podržavali me tijekom ovog studija.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Imunost</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2. T-limfociti i prezentacija antigena</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.1. Aktivacija T-limfocita</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.2. Aktivacija i diferencijacija CD4+ T limfocita</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3. <i>In vitro</i> aktivacija humanih T limfocita</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3.1. Kratkotrajna poliklonska stimulacija T limfocita</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3.2. Stimulacija T limfocita pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih na CD3, CD28 i CD137</b> .....	<b>8</b>
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>10</b>
<b>3. CILJEVI</b> .....	<b>11</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>12</b>
<b>4.1. Ustroj studije</b> .....	<b>12</b>
<b>4.2. Ispitanici</b> .....	<b>12</b>
<b>4.3. Metode</b> .....	<b>12</b>
<b>4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi</b> .....	<b>12</b>
<b>4.3.2. Magnetsko sortiranje pomoćničkih CD4+ T limfocita</b> .....	<b>14</b>
<b>4.3.3. Poliklonska aktivacija mononuklearnih stanica periferne krvi</b> .....	<b>14</b>
<b>4.3.4. Imunofenotipizacija Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>) protočnom citometrijom</b> .....	<b>17</b>
<b>4.4. Statističke metode</b> .....	<b>18</b>
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>19</b>
<b>5.1. Analiza mononuklearnih stanica protočnom citometrijom</b> .....	<b>19</b>
<b>5.2. Usporedba PMA/Ionomiociin i Dynabeads stimulacije</b> .....	<b>20</b>
<b>5.3. Udio Th17 limfocita u populaciji pomoćničkih T limfocita izoliranih iz periferne krvi zdravih mladih ispitanika</b> .....	<b>21</b>
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>24</b>

<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>25</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>26</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>29</b>

## POPIS KRATICA

APC – Antigen prezentirajuće stanice (engl. *Antigen presenting cells*)

CaCl<sub>2</sub> – Kalcijev klorid

CD4<sup>+</sup> T limfociti – T limfociti koji na svojoj membrani imaju stanični diferencijacijski antigen 4 (engl. *Cluster of differentiation 4 T lymphocytes*)

CO<sub>2</sub> – Ugljikov dioksid

Con A- Konkavalin A (eng. *Concanavalin A*)

DAG- diacil-glicerol (engl. *Diacylglycerol*)

DMSO – Dimetil sulfoksid

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

FBS – Fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

FcR – Fc receptor (engl. *Fc Receptor*)

FMO – Fluorescencijski minus jedan (engl. *Fluorescence Minus One*)

FoxP3 – Transkripcijski čimbenik FoxP3 (engl. *Forkhead box protein P3*)

FSC – Raspršenje prema naprijed (engl. *Forward side scatter*)

FSC-A – Površina raspršenja prema naprijed (engl. *Forward side scatter area*)

FSC-H – Visina raspršenja prema naprijed (engl. *Forward side scatter height*)

FVD – Fiksabilna boja za vijabilnost stanica (engl. *Fixable Viability Dye*)

IFN $\gamma$  – Interferon gamma (engl. *Interferon gamma*)

IgE- Imunoglobulin E (engl. *Immunoglobulin E*)

IL – Interleukin

IP3- Inozitol-trifosfat (engl. *Inositol trisphosphate*)

MAPK – Mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *Mitogen activated protein kinase*)

MHC – Glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *Major histocompatibility complex*)

NaCl – Natrijev klorid

NaN<sub>3</sub> – Natrijev azid

NFAT5 – Nuklearni faktor aktiviranih T stanica 5 (engl. *Nuclear factor of activated T cells 5*)

NF- $\kappa$ B- Pojačivač nuklearnog faktora-lakog lanca aktiviran B stanicama (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*)

PBMC – Mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*)

PBS – Fiziološka otopina puferirana fosfatima (engl. *Phosphate – buffered saline*)

PLC- $\gamma$ - fosfolipaza C- $\gamma$  (engl. *Phospholipase C- $\gamma$* )



PHA- Fitohemaglutinin (engl. *phytohemagglutinin*)  
PMA – Forbol – 12 – miristat – 13 – acetat (engl. *phorbol – 12 – myristate –13 – acetate*)  
RCF- Relativno centrifugalno polje (engl. *Relative centrifugal field*)  
RPM – Okretaji u minuti (engl. *Revolutions per minute*)  
RPMI – 1640 – Roswell Park Memorial Institute medij (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*)  
SSC – Postranično raspršenje (engl. *Side scatter*)  
SSC-A – Površina postraničnog raspršenja (engl. *Side scatter area*)  
TCR – T stanični receptor (engl. *T cell receptor*)  
Th – pomoćničke T stanice / pomoćnički T limfociti (engl. *T helper cells*)  
TNF – Tumorski čimbenik nekroze (engl. *Tumor necrosis factor*)  
Treg stanice – Regulatorne T stanice / regulatorni T limfociti (engl. *Regulatory T cells*)

## UVOD

### 1. UVOD

#### 1.1. Imunost

Imunost je sposobnost obrane domaćina od stranih antigena, a isto tako sudjeluje i u uklanjanju mrtvih stanica te pokretanju popravka tkiva. Za učinkovitost ljudskog imunološkog sustava ključan je odabir odgovarajućih odgovora protiv napadačkih antigena. Mora biti istovremeno fleksibilan, tj. sposoban prepoznati sve moguće prijetnje i robustan kako bi se spriječio previše snažan ili nepotreban odgovor (1). Imunološki sustav može se podijeliti u dva podsustava: urođeni ili nespecifični imunološki sustav i adaptivni (stečeni) ili specifični imunološki sustav. Urođeni imunološki sustav služi kao brzo djelujuća obrambena linija koja odmah identificira i uklanja potencijalno štetne strane ili endogene čestice, dok adaptivni imunološki sustav jedinstveno cilja i uništava invazivne patogene (1).

#### 1.2. T-limfociti i prezentacija antigena

T-limfociti imaju funkcionalnu ulogu u adaptivnom imunološkom sustavu, što ih čini idealnim staničnim tipom za stvaranje i primanje signala. Raznolikost T-limfocita određena je njihovom specifičnošću za antigene (idiotopom), što je odlučeno tijekom timusnog razvoja staničnim receptorom TCR (engl. *T cell receptor*, TCR). T limfociti mogu reagirati na prethodno obrađene antigene samo nakon njihove diskretne prezentacije od antigen prezentirajućih stanica (engl. *antigen presenting cells*, APCs), makrofaga, dendritičkih stanica ili B-limfocita. *In vivo*, antigen se prezentira CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) engl. *Cluster of differentiation 4 T lymphocytes*) stanicama isključivo dendritičkim stanicama i migracijom do sekundarnih limfoidnih tkiva, te stimulirane T stanice proizvode IL-2 (1,2). Obradeni antigeni uključuju se u glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) na antigen-prezentirajućim stanicama, koji zajedno služe kao ligand za TCR. Ova interakcija neophodna je za aktivaciju T-limfocita i koordinaciju imunološkog sustava kako bi ciljao odgovarajući antigen (3). Aktivacija T stanica ovisi o prirodi prezentiranog antigena, prisutnosti i količini citokina (npr. kemokina i interleukina) i ko-stimulacijskom signalu antigen-prezentirajućih stanica (1).

##### 1.2.1. Aktivacija T-limfocita

## UVOD

Aktivacija T-limfocita ovisi o TCR-MHC interakciji koja pokreće aktivaciju fosfolipaze C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ , engl. *phospholipase C- $\gamma$* ), koja generira diacil-glicerol (DAG, engl. *diacylglycerol*) i inozitol-trifosfat (IP3, engl. *Inositol trisphosphate*). DAG potiče aktivaciju protein kinaze C i mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK, engl. *Mitogen activated protein kinase*), što rezultira pojačivačem lakog lanca nuklearnog faktora aktiviranog B-stanicama (NF- $\kappa$ B, engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*), te se prepisuju geni koji su ključni za aktivaciju i proliferaciju. IP3 omogućuje oslobađanje  $Ca_2^+$  iz endoplazmatskog retikuluma, što rezultira defosforilacijom, a i time aktivacijom nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica (NFAT, engl. *Nuclear factor of activated T cells*). Zatim se NFAT translocira u jezgru, gdje kontrolira transkripciju interleukina 2 (IL-2) koji je osnovni faktora rasta T-limfocita. Za potpunu aktivaciju, funkciju i diferencijaciju T-limfocita potrebno je puno drugih citokina (3). Nakon sazrijevanja, T limfociti mogu postati  $CD4^+$  (pomoćničke, Th) ili  $CD8^+$  (citotoksične, Tc) T stanica poznate i kao efektorske T stanice (4).  $CD4^+$  limfociti stupaju u interakciju s MHC II, a  $CD8^+$  T limfociti s MHC I koji je prisutan na svim stanicama jezgre i trombocitima (4).

### 1.2.2. Aktivacija i diferencijacija $CD4^+$ T limfocita

Aktivacija naivnih  $CD4^+$  stanica odvija se pomoću tri signala:

- I. vezanjem TCR (engl. T-cell receptor) i antigen/MHC II kompleksa, tvoreći imunološku sinapsu
- II. vezanjem ko-stimulacijskih molekula (CD28, CD40L) i njihovih receptora na predočnoj stanici B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40
- III. vezanjem topljivih upalnih medijatora, citokina i kemokina, za receptore na površini T limfocita (5,6).

Nakon aktivacije  $CD4^+$  stanica, one se diferenciraju u različite funkcijske subpopulacije. Pomoćničke Th1 stanice stimulira interleukin-12 (IL-12), a one proizvode IL-2, upalni citokin interferon gama (IFN- $\gamma$ , engl. *Interferon gamma*) i TNF- $\alpha$  (TNF, engl. *Tumor necrosis factor*). One pogoduju klasičnom stanično posredovanom imunitetu, pa ih čine visoko uključenima u uništavanje unutarstaničnih patogena, tumora i aktivaciju citotoksičnih T-limfocita (3-5). Pomoćničke Th2 stanice su stimulirane prisutnošću interleukina 4 (IL-4) i pogoduje im

## UVOD

odsutnost IL-12. One učinkovito djeluju na aktiviranje B-limfocita što rezultira prelaskom izotipa na imunoglobulin E (IgE, engl. *Immunoglobulin E*) i aktivaciju eozinofila. Th17 stanice nastaju u prisutnosti IL-23 i IL-6, dok one izlučuju visoke razine IL-17. Uključene su u patogenezu autoimunih bolesti. CD4 limfociti mogu se diferencirati i na regulatorne T limfocite (Treg stanice, engl. *Regulatory T cells*) koje izlučuju IL-10 te eksprimiraju CD25 i transkripcijski faktor Foxp3 (engl. *Forkhead box protein P3*) (3,5).

### 1.3. *In vitro* aktivacija humanih T limfocita

Stimulacija limfocita u primarnim staničnim kulturama važna je za istraživanje funkcionalnog statusa T stanica u različitim biološkim sustavima te može učinkovito proizvesti veliku količinu citokina, koji odražavaju njihov fenotip i funkcionalni status. U sekundarnim limfnim organima T limfociti poprimaju odgovarajući fenotip (genetski imprinting) i proliferiraju (klonska ekspanzija) te putem periferne krvi odlaze na mjesto upale gdje ostvaruju svoje efektorske učinke, uključujući sintezu i izlučivanje velikih količina citokina sa specifičnim biološkim učincima (7). Tijekom tranzicije u krvi, limfociti su neaktivni tj. proizvode male količine citokina te stoga kada se želi odrediti fenotip i funkcionalni status pomoćničkih limfocita izoliranih iz periferne krvi, najprije ih je potrebno aktivirati (8).

Mitogene molekule i monoklonska antitijela promiču poliklonsku proliferaciju, dok specifični antigen daje monoklonalni ili oligoklonalni odgovor. Idealni stimulans bi trebao biti titriran na najnižoj koncentraciji koja rezultira staničnom aktivacijom, kako se ne bi prikriale moguće promjene u proizvodnji citokina. Također, stimulacija bi trebala biti što kraća, kako funkcija imunoloških stanica ne bi bila ugrožena (8).

#### 1.3.1. Kratkotrajna poliklonska stimulacija T limfocita

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 (8). Mitogeni lektini poput fitohemaglutinina (PHA) i konkavalina A (Con A) se koriste za poliklonsku stimulaciju T stanica (9).

Fitohemaglutinin (PHA, engl. *phytohemagglutinin*) je ekstrakt lektina iz crvenog graha (*Phaseolus Vulgaris*), te sadrži snažna stanično aglutinirajuća i mitogena djelovanja. Podjedinice PHA su dvije različite vrste, leukocitno reaktivne (L) i eritrocitne reaktivne (E).

## UVOD

L ima visok afinitet za površinske receptore limfocita, ali nizak za eritrocite i odgovoran je za mitogena svojstva izolektina. E nosi svojstva aglutiniranja eritrocita. Fitohemaglutinin-P je proteinski oblik, a PHA-M mukoproteinski oblik ovih izolektina (10). Fitohemaglutinin ima potencijal inducirati bliže kontakte između susjednih staničnih membrana.

Konkavalin A (Con A, eng. *Concanavalin A*) je lektin koji veže manozu/glukozu izoliran iz zrna Jack (*Canavalia ensiformis*). Osim mitogenog djelovanja, može izazvati programiranu staničnu smrt putem apoptoze. ConA aktivira NFAT (nuklearni faktor aktiviranih T stanica), obitelj transkripcijskih faktora koji su važni u razvoju i funkciji imunološkog sustava, uključujući receptor T stanica (TCR) (11). Fitohemaglutinin (PHA) i konkanavalin A (Con A) aktiviraju T stanice vezanjem za staničnu membranu glikoproteina, uključujući receptor T stanica (TCR)-CD3 kompleks (9). Antitijela specifična za TCR-CD3 kompleks daju početni aktivacijski signal, ali proliferacija ovisi o ko-stimulacijskom signalu koji je obično izdan putem CD28. Slobodna antitijela često pružaju neadekvatno vezanje receptora za aktiviranje unutarstaničnih signala te su često vezani za pomoćne stanice, zrnca ili čvrstu površinu (9).

Forbol-12-miristat-13- acetat (PMA, engl. *Phorbol 12-myristate 13- acetat*) specifični je aktivator proteinske kinaze C (PKC) i stoga aktivira nuklearni faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B je transkripcijski faktor koji regulira brojne fiziološke funkcije i uključen je u patogenezu različitih bolesti (12). Isto tako, najčešći je i najmoćniji fosfor ester; izaziva širok raspon učinaka na stanice i tkiva. Često se primjenjuje u kombinaciji s ionomicinom (Cell Stimulation Coctail).

Ionomicin je membranopropusni kalcijev ionofor proizveden bakterijom *Streptomyces conglobatus*. Olakšava prijenos kalcijevih iona u/iz stanica te se može koristiti za povećanje intracelularne razine kalcija izazivajući staničnu smrt apoptozom (13). Kombinacija PMA i ionomicina aktivira transkripcijske faktore NF- $\kappa$ B i NFAT što dovodi do proizvodnje citokina (IL-2) (13).

### **1.3.2. Stimulacija T limfocita pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih na CD3, CD28 i CD137**

Stimulacija koja je najsljednija fiziološkim mehanizmima, uključuje one protokole koji oponašaju prijenos signala preko TCR-CD3-CD28 kompleksa. Jedna od takvih metoda uključuje primjenu reagensa Dynabeads<sup>TM</sup>. Ova metoda je jednostavna za aktivaciju i

## UVOD

ekspanziju T stanica i ne zahtijeva hranjive stanice (stanice koje predstavljaju antigen) ili antigen (14). Kit se sastoji od ujednačenih, inertnih, superparamagnetskih kuglice promjera 4,5  $\mu\text{m}$ , slične veličine kao stanice koje predstavljaju antigen i kovalentno su povezane s protutijelima anti-CD3 i anti-CD28. Ova dva antitijela pružaju primarne i ko-stimulacijske signale, optimizirane za učinkovitu aktivaciju i ekspanziju T stanica. Također, rekombinantnim IL-2 može se potaknuti proširenje populacije T stanica. Nakon aktivacije ili ekspanzije, magnetske kuglice mogu se lako ukloniti pomoću DynaMag™ magneta (14). Više valentno vezanje je potrebno, jer samo vezanje TCR-a neće izazvati potpunu aktivaciju T limfocita. To znači da osim TCR-a, moraju biti potrebni i ko-stimulacijski receptori (CD28) kako bi se potaknulo preživljavanje, klonska ekspanzija i diferencijacija (15).

## HIPOTEZA

### 2. HIPOTEZA

U svrhu određivanja fenotipa i funkcionalnog statusa pomoćničkih (CD4<sup>+</sup>) T limfocita periferne krvi zdravih mladih ispitanika, aktivacija pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih na CD3, CD28 i CD137 samostalno ili u prisutnosti interleukina 2 predstavlja optimalniju metoda *in vitro* aktivacije u usporedbi s aktivacijom posredovanom forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA) i ionomicinom.

### 3. CILJEVI

- I. Usporedno provesti protokol aktivacije magnetski sortiranih CD4 T limfocita pomoću
  - a. Dynabeads CD3/CD28/CD137
  - b. PMA i ionomicina, u oba slučaja u prisutnosti Brefeldina A
- II. Odrediti vijabilnost CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> limfocita nakon provedenog protokola aktivacije
- III. Odrediti udio Th17 limfocita u populaciji pomoćničkih T limfocita izoliranih iz periferne krvi zdravih mladih ispitanika
- IV. Usporediti rezultate dobivene usporednim metodama aktivacije



### 4. ISPITANICI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje u kojem su svi ispitanici bili podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu.

#### 4.2. Ispitanici

U studiji je sudjelovalo 10 zdravih mladih pojedinaca obaju spolova. Ispitanicima se uzorkovala puna venska krv iz središnje kubitalne vene pod aseptičnim mjerama predostrožnosti te su korišteni svježi uzorci za protokole aktivacije. Svi su ispitanici bili detaljno informirani o svim protokolima i procedurama ovog istraživanja. Također, svaki ispitanik je morao potpisati informirani pristanak prije ulaska u protokol istraživanja. Praktični dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju, na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Protokol studije je u skladu sa standardima utvrđenima posljednjom revizijom Helsinške deklaracije i odobren od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07, Broj: 2158-61-07-21-52).

#### 4.3. Metode

##### 4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi

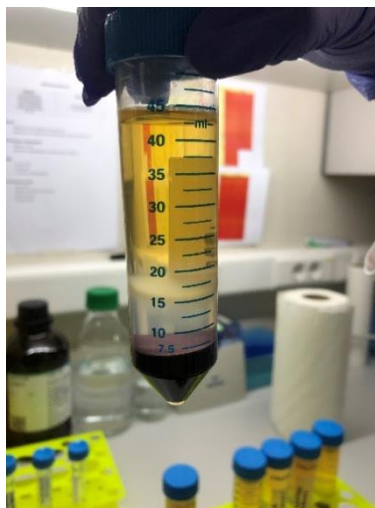
Uzorci pune venske krvi zdravih mladih ispitanika prikupljeni su u tubicama koje sadrže antikoagulans etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) volumena 10 mL (BD Vacutainer, Becton, Dickinson i Company, Franklin Lakes, NJ, SAD) i obrađeni su u roku od 3h od prikupljanja. Potom su iz pune krvi izolirane mononuklearne stanice (od engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) na gradijentu fikola (Ficoll® Paque Plus Cytiva, GE He17-1440-02) prema standardnom protokolu (16).

Prije same izolacije, ohlađeni reagensi i puferi koji se koriste u izolaciji su zagrijani na sobnu temperaturu (RT, ~20-25 °C). Prikupljena puna krv je razrijeđena prethodno pripremljenom 1× fiziološkom otopinom puferiranim fosfatima (PBS, engl. *Phosphate* –

## ISPITANICI I METODE

*buffered saline*) u omjeru 1:1, te se uzorak pažljivo naneo na medij za centrifugiranje Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska) bez miješanja slojeva. Nakon toga, uzorci su se centrifugirali 25 minuta, na RCF (engl. *Relative centrifugal field*) 800 G bez kočnica (Rotina 380, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka). Sloj koji sadrži mononuklearne stanice (Slika 1.) prikupljen je te su stanice isprane dva puta s  $1 \times$  PBS-om. Stanice su obojene s 0,4% Trypan plavom otopinom (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i prebrojene u Bürker-Türk-ovoj komorici (50  $\mu$ l suspenzije stanica i 100  $\mu$ l otopine tripanskog plavila) kako bi se provjerila vijabilnost (17).

Nakon određivanja koncentracije, stanice su kultivirane u RPMI-1640 mediju s L-glutaminom (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), dopunjenim dodatkom fetalnog goveđeg seruma (10 %) (FBS; engl. *Fetal Bovine Serum*, SigmaAldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i penicilin-streptomicinskim antibiotikom (1 %) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka). Stanice su pohranjene u pločice s 24 jažice te stavljene u inkubator (Shel Lab, serija CO<sub>2</sub>, Sheldon Manufacturing Inc, Cornelius, OR, USA) pod sljedećim uvjetima:  $\sim 37$  °C, 5% CO<sub>2</sub>, > 80% razine vlage tijekom 24 sata (17).



**Slika 1. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu fikola.**

*Prikazani su vidljivi slojevi nastali odvajanjem komponenti krvi na gradijentu fikola nakon centrifugiranja (izvor: original autorice rada).*

### 4.3.2. Magnetsko sortiranje pomoćničkih CD4<sup>+</sup> T limfocita

Nakon podešavanja broja stanica na  $1,2 \times 10^7$  te neposredno prije ulaska u protokol aktivacije, CD4<sup>+</sup> T stanice su odvojene iz ukupne smjese mononuklearnih stanica periferne krvi negativnom magnetskom selekcijom putem komercijalno dostupnih magnetskih kuglica (MagneSort™ Human CD4<sup>+</sup> T cell Enrichment kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača. Negativno odabrane stanice su pripremljene za aktivaciju (17,18).

Uzorci su preneseni u polustirenske epruvete od 5 mL sa okruglim dnom (12 x 75 mm; BD Falcon, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), isprani dva puta s 1x PBS (5 min, 800 G) i stanice su bile ponovno suspendirane u 200 µL 1×PBS/3 % FBS/10 mM EDTA (17).

Nakon toga, dodano je 40 µL MagneSort™ Human CD4<sup>+</sup> T cell Enrichment kit, pet puta promiješano vortex-om (IKA® Vortex GENIUS 3), te su stanice inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, dodano je 4 mL 1×PBS/10 mM EDTA i centrifugirano (800 G/5 min). Supernatant je odbačen, a uzorcima je dodano 200 µL 1×PBS/3 % FBS/10 mM EDTA uz 40 µL *MagneSort* zrnaca negativne selekcije. Uzorci su pet puta promiješani vortexom i inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi (17,18).

Kad je završila inkubacija, dodano je 1×PBS/10 mM EDTA do 2,5 mL ukupnog volumena te su stanice ponovno resuspendirane. Epruvete su jedna po jedna stavljane u magnet i inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je magnet koji sadrži epruvetu podignut i supernatant je prebačen u novu epruvetu od 5 mL u jednom kontinuiranom pokretu bez miješanja kako se ne bi smanjila čistoća stanica. Epruvete koje sadrže vezane stanice uklonile su se s magneta te su se ispraznile. Negativno odabrane stanice su spremne za upotrebu (17).

### 4.3.3. Poliklonska aktivacija mononuklearnih stanica periferne krvi

U svrhu poliklonske aktivacije sortiranih pomoćničkih T limfocita iz periferne krvi koristila su se dva usporedna protokola:

- a) kratkotrajna aktivacija pomoću komercijalno dostupnog stimulacijskog koktela koji sadrži forbol-12-miristat-13-acetat (PMA, engl. *phorbol myristate acetate*) i ionomicin u završnoj koncentraciji od 2 µL/mL (Cell stimulation cocktail 500X; eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (19).

## ISPITANICI I METODE

Kako bi se aktivirale CD4<sup>+</sup> T stanice i potaknulo stvaranje citokina, magnetski razvrstane stanice kratko su (4 sata) bile stimulirane s forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) i ionomicinom. Aktivacija CD4<sup>+</sup> T-stanica provedena je u pločama s 24 jažice (~ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, > 80% vlažnosti) (18,19).

Kalcijev klorid (CaCl<sub>2</sub>) dodan je u medij za stimulaciju kako bi izazvao dugotrajnu unutarstaničnu signalizaciju kalcija koja bi izazvala stanični odgovor (5 μL/mL konačna koncentracija). Također, stanicama je dodan Brefeldin A (1000X; eBioscience™, Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific) u konačnoj koncentraciji od 3 μL/mL da bi se spriječilo lučenje citokina i prijenos proteina iz endoplazmatske mrežice u Golgijev aparat te time služi kao inhibitor proteinske sekrecije (20).

Koktel za stimulaciju stanica, Brefeldin A i CaCl<sub>2</sub> dodani su zajedno i istovremeno u staničnu suspenziju.

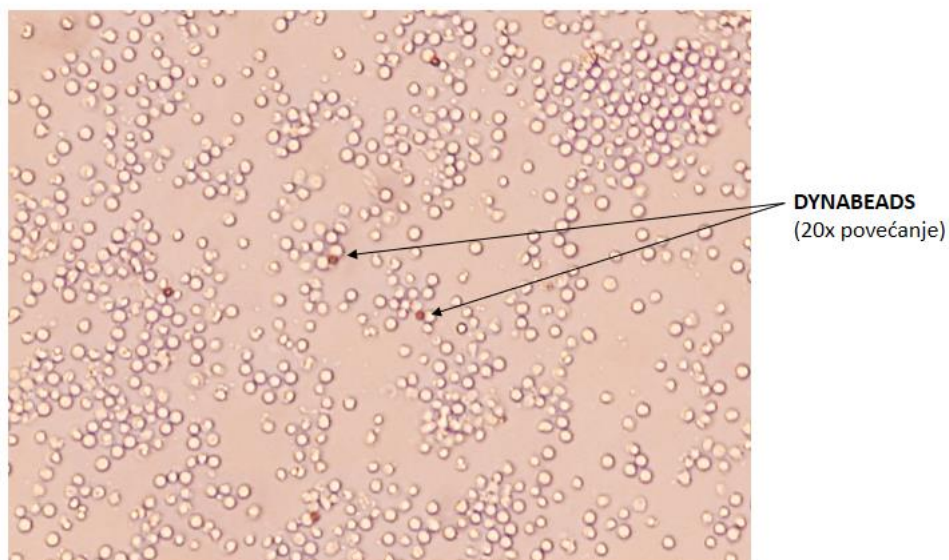
b) aktivacija pomoću magnetskih čestica s adheriranim protutijelima usmjerenim na CD3, CD28 i CD137 tijekom 48 sati. U tu svrhu se koristio komercijalno dostupan komplet Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28/CD137 (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania) (21).

Dynabeads metoda sadrži superparamagnetne polimerne kuglice presvučene optimiziranom smjesom monoklonskih antitijela protiv površinskih molekula CD3, CD28 i CD137. Magnetske čestice svojom veličinom oponašaju antigen prezentirajuće stanice, a prostorna orijentacija protutijela omogućava optimalni angažman CD3, CD28 i CD137 molekula na površini T limfocita, odnosno prijenos unutarstaničnih signala (14).

Aktivacija T limfocita odvila se preko TCR kompleksa, odnosno imitiranjem prirodne aktivacije. Magnetski sortirane CD4<sup>+</sup> stanice su kultivirane sa Dynabeads kuglicama (2 μL/80000 stanica) (Slika 2) u pločicama s 24 jažice. Dodano je 2 μL Dynabeads humanog T-aktivatora CD3/CD28 kako bi se dobio omjer kuglica i stanica 1:1. Rekombinantni ljudski IL-2 (Gibco, ThermoFisher ) koji dovodi do proliferacije T-stanica je dodan u uzorke (30 U/mL). Stanice su inkubirane u vlažnom CO<sub>2</sub> inkubatoru 24 h na 37°C. Posljednja 4 sata inkubacije, u kulturu je dodan Brefeldin A isto kao i u slučaju kratkotrajne aktivacije. Koktel za stimulaciju stanica, Brefeldin A i CaCl<sub>2</sub> dodani su zajedno i istovremeno u staničnu suspenziju.

## ISPITANICI I METODE

Nakon završetka četiri sata inkubacije, dodano je 200  $\mu$ L 0,1 M EDTA i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se zaustavila reakcija.



**Slika 2. Magnetski sortirane  $CD4^+$  T stanice iz humanih PBMC u kulturi s anti-CD23, anti-CD28 i anti-CD137 obloženim Dynabeads kuglicama u kompletiranom RPMI-1640 mediju s FBS-om (10 %) i penicilin-streptomycin antibiotikom (1%).**

*Prikazuje magnetski sortirane  $CD4^+$  T stanice u kulturi anti-CD23, anti-CD28 i anti-CD137 obloženim Dynabeads kuglicama pod povećanjem 20x. (izvor: original autorice rada)*

Za primjenu protočne citometrije bilo je potrebno ukloniti kuglice prije bojenja. Epruveta je stavljena na magnet DynaMag™-5 (Thermo Fisher Scientific) 1-2 minute kako bi se kuglice odvojile od otopine. Supernatant koji sadrži stanice je prenesen u novu epruvetu. (Slika 3.) (14).



**Slika 3. Odvajanje Dynabeadsa iz kulture na magnetu Dynamag 5**

*Prikazano je odvajanje kuglica prije imunofenotipizacije (izvor: original autorice rada)*

#### **4.3.4. Imunofenotipizacija Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>) protočnom citometrijom**

Zastupljenost Th17 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) u ukupnim pomoćničkim CD4<sup>+</sup>T limfocitima izoliranim iz periferne krvi određena je metodom protočne citometrije. Za pripremu uzoraka i bojenje površnih, unutarstaničnih i nuklearnih antigena za protočnu citometriju koristili su se standardni protokoli. Ukratko, prije staničnog bojenja, mrtve stanice su nepovratno obilježene fiksabilnom bojom za vijabilnost Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača, a nespecifično bojenje posredovano vezanjem protutijela za Fc receptore (FcR; engl. *Fc Receptor*) blokirano dodavanjem 5 uL Human TruStain FcX™ reagensa (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD). Nakon 8 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorcima je dodana smjesa specifičnih fluorescentno obilježenih protutijela, kako slijedi:

Za određivanje Th17 limfocita: CD3 PerCP (klon OKT3, eBioscience), CD4 PE-Cy7 (klon RPA-T4), eBioscience), CD196 APC (klon R6H1, eBioscience) i IL-17A FITC (klon eBio64DEC17, eBioscience).

U protokolu za bojanje stanica koristio se fosfatni pufer (PBS) s dodatkom 0,5-1% goveđeg serumskog albumina (BSA; engl. *Bovine serum albumin*) i 0.1% natrijevog azida (NaN<sub>3</sub> prilagođene pH vrijednosti (pH ~7,4) te komercijalno dostupan set pufera za bojanje unutarstaničnih i nuklearnih antigena Foxp3 staining buffer (eBioscience).

## ISPITANICI I METODE

Uz pažljivu pripremu uzorka i optimizaciju protokola bojenja, tijekom uhodavanja pokusa pripremljene su jednobojne, fluorescencijske minus jedan (FMO; engl. *Fluorescence Minus One*), nebojene i negativne kontrole radi pouzdanog razlikovanja pozitivne stanice od pozadinskog/negativnog i nespecifičnog bojenja.

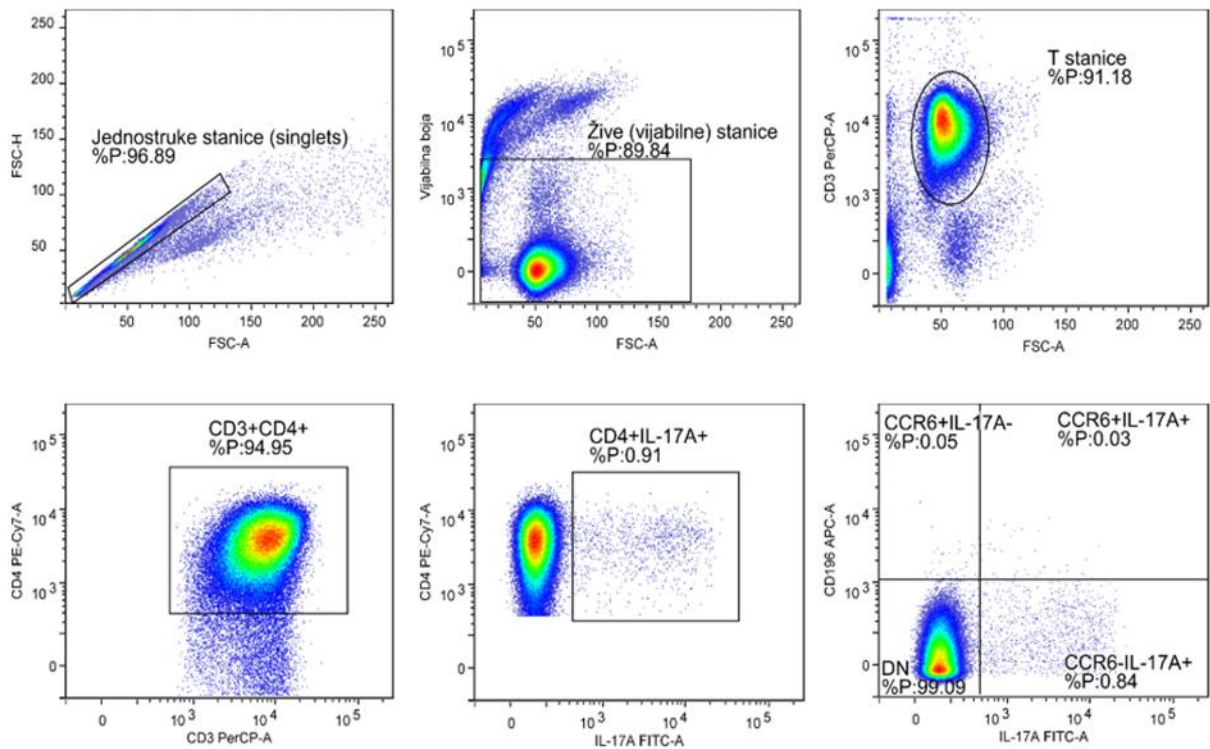
Kompenzacijska matrica izračunata je pomoću komercijalno dostupnih kompenzacijskih kuglica BD<sup>TM</sup> CompBeads mišji Igκ/negativne kontrole (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) i jednobojnih kontrola. Mjerenja uzoraka su provedena na BD FACSCanto II<sup>TM</sup> protočnom citometru (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) opremljenim s 2 lasera (plavim Argon 488 nm, Red HeNe 633 nm). Analiza i vizualizacija podataka učinjena je pomoću FlowLogic programa (v11,0; Inivai Technologies; Mentone; Australija) (17).

### 4.4. Statističke metode

Numerički podatci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitney testom. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije  $r$ , a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\text{Alpha}=0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program SigmaPlot (verzija 11.2, SYSTAT Software, Chicago, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Analiza mononuklearnih stanica protočnom citometrijom



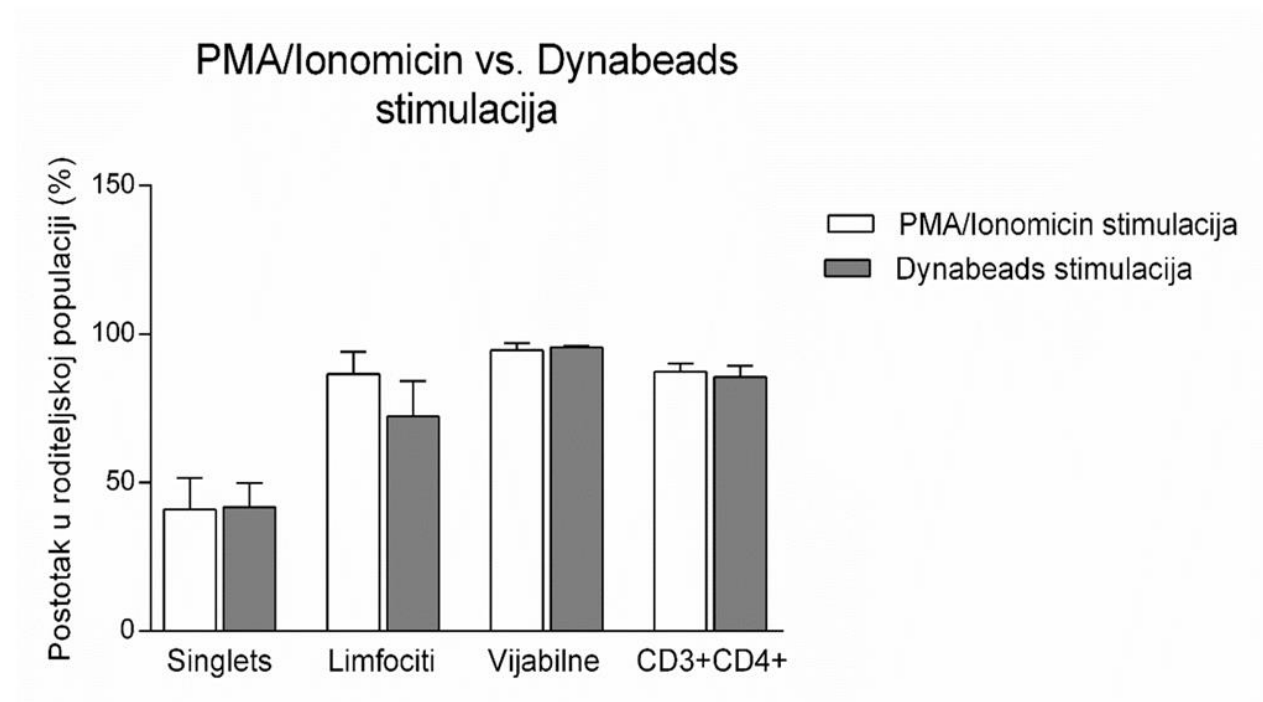
**Slika 4. Reprezentativni primjer analize mononuklearnih stanica iz periferne krvi humanih ispitanika metodom protočne citometrije.**

*Prikazano je susljedno postavljanje prozora za izdvajanje jednostrukih živih mononuklearnih stanica pomoću raspršenja laserske zrake prema naprijed (FSC; engl. forward side scatter). Mrtve su stanice bile isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD; engl. Fixable Viability Dye). Limfociti su izdvojeni analizom FSC-A (engl. Forward side scatter area) i površine postraničnog raspršenja (SSC-A; engl. Side scatter area), dok su T limfociti definirani analizom obilježja FSC-A te izražaja CD3 markera. Također, na slici je prikazana strategiju analize CD<sup>+</sup>4 T limfocita, koji luče IL-17. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II i analizirane primjenom Flow Logic računalnog programa.*



## 5.2. Usporedba PMA/Ionomycin i Dynabeads stimulacije

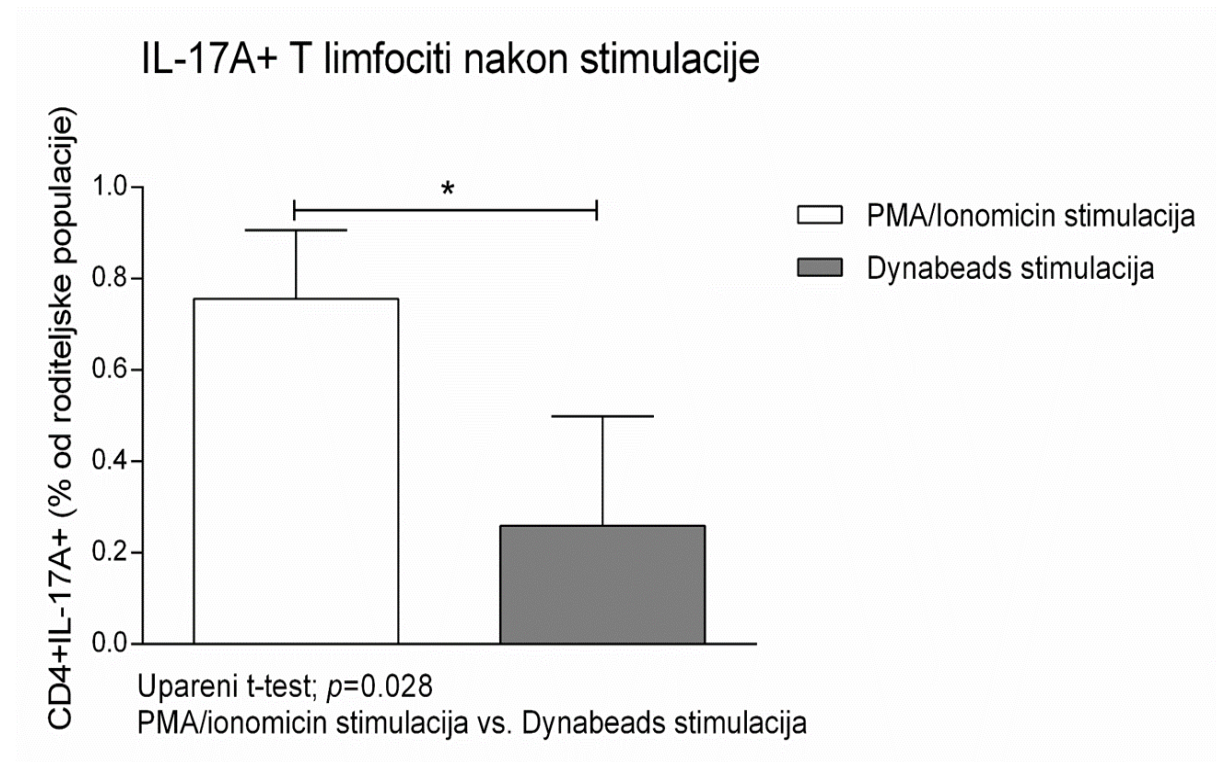
Rezultati na Slici 5. prikazuju frekvenciju jednostrukih stanica, limfocita, živih stanica i CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> stanica usporedno s dvije metode stimulacije. Postotak jednostrukih stanica (singlets) je nepromijenjen kod Dynabeads stimulacije. Za ocjenu sredine korištena je aritmetička sredina (41,78 vs. 40,99), a kao mjera raspršenja standardna devijacija (8,02 vs. 9,48);  $p=0,898$ . Udio limfocita dobiven Dynabeads stimulacijom niži je u odnosu na PMA/ionomycin no razlika nije statistički značajna (72,32 vs. 86,56). Standardna devijacija iznosila je 11,88 vs. 6,75, a  $p=0,06$ . Nema značajne razlike između ove dvije stimulacije u udjelu živih (vijabilnih) stanica (95,52 vs. 94,69;  $p=0,470$ ) i CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> stanica (85,53 vs. 87,30;  $p=0,420$ ).



**Slika 5. Frekvencija jednostrukih stanica (singlets), limfocita, živih stanica (vijabilne) i CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> stanica u perifernoj krvi zdravih ispitanika nakon PMA/ionomycin i Dynabeads stimulacije.**

### 5.3. Udio Th17 limfocita u populaciji pomoćničkih T limfocita izoliranih iz periferne krvi zdravih mladih ispitanika

U ovoj studiji analizirali smo udjele Th17 stanica u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi zdravih mladih ispitanika nakon dvije usporedne metode stimulacije- PMA/Ionomycin i Dynabeads. Rezultati su pokazali značajno veći udio CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>T stanica nakon stimulacije PMA/ionomicinom u odnosu na Dynabeads stimulaciju. Aritmetička sredina iznosila je 0,75 vs. 0,26, a standardna devijacija 0,13 vs. 0,24. (Slika 6.). Th17 limfociti nakon Dynabeads stimulacije imaju statistički značajan manji udio ( $p=0,028$ , upareni t-test).



**Slika 6. Udio CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> T stanica u perifernoj krvi zdravih ispitanika nakon PMA/ionomycin i Dynabeads stimulacije.**

*Prikazuje udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 (Th17 limfociti) u perifernoj krvi zdravih mladih ispitanika. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni uparenim t-testom za male nezavisne uzorke. \*statistički značajna razlika,  $p<0,05$ .*

**6. RASPRAVA**

Stimulacija limfocita u primarnim staničnim kulturama važna je za istraživanje funkcionalnog statusa i fenotipa T stanica u različitim biološkim sustavima. U sekundarnim limfnim organima T limfociti poprimaju odgovarajući fenotip (genetski imprinting) i proliferiraju (klonska ekspanzija) te putem periferne krvi odlaze na mjesto upale gdje ostvaruju svoje efektorske učinke, uključujući sintezu i izlučivanje velikih količina citokina sa specifičnim biološkim učincima. Limfociti su neaktivni, tj. proizvode male količine citokina tijekom tranzicije u krvi, pa ih je potrebno aktivirati.

Poznato je više metoda stimulacije limfocita, a međusobno se razlikuju s obzirom na put aktivacije stanica te biološke učinke koje pokreću na staničnoj razini. Ovisno o eksperimentalnom dizajnu i ciljevima istraživanja potrebno je odabrati optimalnu metodu stimulacije. Idealni stimulans je titriran na najnižoj koncentraciji koja rezultira staničnom aktivacijom, kako se ne bi prikriale moguće promjene u proizvodnji citokina. Također, stimulacija bi trebala biti što kraća, kako funkcija imunoloških stanica ne bi bila ugrožena (8).

Kako bi odabrali optimalnu metodu stimulacije, odnosno pronašli učinkovit stimulans koji može potaknuti najveću količinu proizvodnje citokina pri nižoj dozi i u kraćem vremenu, Wenchao i sur. su testirali produkciju citokina u nerazrijeđenoj kulturi pune krvi štakora. U njihovoj studiji optimalni stimulans je bio PMA/ionomicin; mogao je značajno povećati proizvodnju pet citokina u 6 sati bez značajnih oštećenja imunoloških stanica. Isto tako, druge kliničke studije su potvrdile da PMA može povećati proizvodnju određenih citokina (posebno Th1 tip)(8).

Baran i sur. su u studiji usporedili PHA stimulaciju sa standardnim protokolom koristeći PMA/ionomicin. Oba korištena stimulatora bila su učinkovita za indukciju unutarstanične proizvodnje citokina. Međutim, kinetika pojavljivanja raznih unutarstaničnih citokina bila je različita, npr. kultura tijekom 6 sati za IL-4 bila je optimalna, ali za stimulaciju proizvodnje IL-10 bilo je potrebno 10 sati. PHA je bio bolji za indukciju IL-4, iz čega je zaključeno da je snažniji stimulator od PMA/ionomicina. PMA/ionomicin inducira Th1 profile citokina, dok PHA stimulira širi raspon unutarstaničnih citokina u ljudskim mononuklearnim stanicama (i Th1 i Th2 profile). Štoviše, PHA je bolji izbor kod analize protočnom citometrijom jer čini mnogo manje izraženim promjene u FSC i SSS signalima (7).

## RASPRAVA

S druge strane, Tricket i sur. su koristili stimulaciju s Dynabeads metodom s anti CD3/CD28 kuglicama. Aktivacija T stanica javila se unutar jednog sata od stimulacije, te dosegla plato nakon šest sati. Tijekom prva 4 sata stimulacije T stanica s anti-CD3/CD28 kuglicama uočena je smanjena ekspresija CD25. Stimulacija s 5 kuglica po limfocitu inducirala je jednaku razinu ekspresije CD25 kao sa stimulacijom PHA ili ConA. Zaključeno je da stimulacija s anti CD3/CD28 kuglicama može biti dobra alternativa tradicionalnoj PHA stimulaciji. Prednosti ove metode u odnosu na PHA su izbjegavanje radioaktivnih tvari, mogućnost specifične analize proliferacije T stanica bojenjem monoklonskim protutijelima i skraćeno radno vrijeme (9).

Nadalje, Matheson i sur. su također koristili Dynabeads stimulaciju. Primarne CD4<sup>+</sup> T stanice su izolirane iz periferne krvi i kultivirane u RPMI mediju s 10% FCS i 1% penicilinom/streptomycinom te aktivirane unutar 48 sati korištenjem Dyabeads Human T Activator CD3/CD28 kuglica. Protočnom citometrijom je provjerena čistoća za CD3 i CD4 koja je očekivano bila veća od 95%. Kao zaključak izneseno je da je magnetsko sortiranje stanica bez antitijela nov i učinkovit način odabira transduciranih stanica sisavaca. Metoda je brza, može se dovršiti u jednom satu, te nije potrebno antitijelo što dozvoljava brzo afinitetno pročišćavanje. Poboljšanje čistoće do 0,99% rutinski je postignuto, a nakon otpuštanja s biotinom, stanice ostaju netaknute zaostalim zrcima ili kompleksima antitijela-antigen. Osim što pruža koristan alat za istraživanje znanosti o životu, sustav se može koristiti za odabir genetski modificiranih stanica za gensku terapiju (21).

U ovoj studiji uspoređivala se klasična metoda aktivacije limfocita posredovana forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA) i ionomicinom i aktivacija koja je najbližnja fiziološkim mehanizmima aktivacije stanica- stimulacija pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih na CD3,CD28 iCD137. Sudjelovalo je 10 ispitanika- 5 uzoraka je stimulirano PMA/ionomicinom, a 5 Dynabeads stimulacijom. Postotak jednostrukih stanica (singlets) je viši kod Dynabeads stimulacije, dok je udio limfocita dobiven Dynabeads stimulacijom niži u odnosu na PMA/ionomicin. Nema značajne razlike između ove dvije stimulacije u udjelu živih (vijabilnih) stanica i CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> stanica. Kod određivanja udjela Th17 limfocita u populaciji pomoćničkih T limfocita izoliranih iz periferne krvi zdravih mladih ispitanika, rezultati su pokazali značajno veći udio CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>)T stanica nakon stimulacije PMA/ionomicinom u odnosu na Dynabeads stimulaciju. Iako je Dynabeads stimulacija sa svojim prednostima moderno rješenje za bržu i efikasniju stimulaciju stanica, optimalnu metodu (stimulans) treba birati prema stanicama koje se žele stimulirati.

## ZAKLJUČAK

### 7. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata iz provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. U svrhu određivanja fenotipa i funkcionalnog statusa pomoćničkih ( $CD4^+$ ) T limfocita periferne krvi zdravih mladih ispitanika, aktivacija pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih na CD3, CD28 i CD137 samostalno ili u prisutnosti interleukina 2 ne predstavlja optimalniju metoda *in vitro* aktivacije u usporedbi s aktivacijom posredovanom forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA) i ionomicinom.
2. Udio Th17 limfocita je značajno veći nakon stimulacije PMA/ionomicinom u odnosu na Dynabeads stimulaciju.
3. Nema značajne razlike u vijabilnosti T limfocita nakon obje stimulacije.

## SAŽETAK

### 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Usporediti rezultate dobivene usporednim metodama aktivacije magnetski sortiranih CD4<sup>+</sup> T limfocita pomoću Dynabeads CD3/CD28/CD137 i PMA/ionomicin te odrediti udio Th17 limfocita izoliranih iz periferne krvi zdravih mladih ispitanika

**Nacrt studije:** Studija je ustrojena kao pokusno istraživanje u kojem su svi ispitanici bili podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu

**Ispitanici i metode:** U istraživanju je sudjelovalo 10 zdravih mladih ispitanika kojima je uzorkovana periferna venska krv te izolirane mononuklearne stanice. Iz uzoraka su izdvojeni pomoćnički CD4<sup>+</sup>T limfociti metodom magnetskog sortiranja pomoću komercijalno dostupnog seta (MagniSort™ Human CD4<sup>+</sup> T cell Enrichment kit). Poliklonska aktivacija T limfocita provedena je s dvije usporedne metode; korišten je komercijalni set koji sadrži PMA i ionomicin (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail) i Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28/CD137. Imunofenotipizacija Th17 limfocita provedena je protočnom citometrijom pomoću BD FACS Canto II citometra. Za statističku analizu korišten je program Sigma Plot 11.2.

**Rezultati:** Udio Th17 limfocita je značajno veći nakon stimulacije PMA/ionomicinom u odnosu na Dynabeads stimulaciju. Nema značajne razlike između ove dvije stimulacije u udjelu živih (vijabilnih) stanica.

**Zaključak:** Aktivacija pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih na CD3, CD28 i CD137 ne predstavlja optimalniju metoda in vitro aktivacije u usporedbi s aktivacijom posredovanom forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA) i ionomicinom.

**Ključne riječi:** Antigen aktivacije T stanica; CD4 pozitivni T limfociti; Th17 stanice

## SUMMARY

### 9. SUMMARY

**Title:** Optimization of in vitro human T lymphocytes activation using antibodies directed against CD3, CD28 and CD137, and interleukin 2 for the determination of peripheral Th17 lymphocytes in healthy young subjects

**Objectives:** To compare the results by obtaining comparative methods of activating magnetic sorted CD4<sup>+</sup> T lymphocytes using Dynabeads CD3/CD28/CD137 and PMA/ionomycin and to determine the presence of Th17 lymphocytes isolated from the peripheral blood of healthy young subjects

**Study Design:** The study was organized as an experiment in which all subjects were subjected to the same experimental protocol

**Participants and methods:** 10 healthy young subjects participated in the study. Peripheral venous blood was sampled from which mononuclear cells were isolated. Helper CD4<sup>+</sup>T lymphocytes were isolated from the samples by magnetic sorting using a commercially available set (MagniSort™ Human CD4<sup>+</sup>T cell Enrichment kit). Polyclonal activation of T lymphocytes was performed by two comparative methods; a commercial kit containing PMA and ionomycin (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail) and Dynabeads™ Human T-Activator CD3 / CD28 / CD137. Immunophenotyping of Th17 lymphocytes was performed by flow cytometry using a BD FACS Canto II cytometer. Sigma Plot 11.2 was used for statistical analysis.

**Results:** The presence of Th17 lymphocytes was significantly higher after PMA / ionomycin stimulation compared to Dynabeads stimulation. There is no significant difference between these two stimulations in the proportion of living (viable) cells.

**Conclusion:** Activation by monoclonal antibodies directed to CD3, CD28 and CD137 is not a more optimal method of in vitro activation compared to activation mediated by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and ionomycin.

**Keywords:** CD4-Positive T-Lymphocytes; T cell Activation Antigen; Th17 cells

## LITERATURA

### 10. LITERATURA

1. Barberis M, Helikar T, Verbruggen P. Simulation of Stimulation: Cytokine Dosage and Cell Cycle Crosstalk Driving Timing-Dependent T Cell Differentiation. *Front. Physiol.* 2018; 9:879.
2. Jenkins M, Khoruts A, Ingulli E, Mueller D, McSorley S, Lee Reinhardt R. *in vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:23-45.
3. Elkhatib SK, Case AJ. Autonomic Regulation of T-lymphocytes: Implications in Cardiovascular Disease. *Pharmacol Res.* 2019; 146: 104293.
4. Germain, R. N. T cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2, 309–322
5. Zhu J, Yamane H, Paul W. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol.* 2010; 28: 445–489.
6. Choi J, Craft J. Activation of Naive CD4+ T Cells *In Vivo* by a Self-Peptide Mimic: Mechanism of Tolerance Maintenance and Preservation of Immunity. *J Immunol* 2004; 172:7399-7407;
7. Baran J, Kowalczyk D, Ozóg M, Zembala M. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Mar;8(2):303-13.
8. Wenchao A, Haishan L, Naining S, Lei L, Huiming C. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Sep; 10(9): 3834–3842.
9. Trickett A, Lam Kwan Y. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods.* 2003; 275(1-2):251-5.
10. Movafagh A, Heydary H, Mortazavi-Tabatabaei S, Azargashbd E. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J Pharm Res.* 2011 Autumn; 10(4): 895–903.
11. Mitogen- NFAT Activator. *Invivogen.* Dostupno na: <https://www.invivogen.com/concanavalin-a>. Pristupljeno: 26.8.2021.
13. Ionomycin. *Invivogen.* Dostupno na: <https://www.invivogen.com/ionomycin>. Pristupljeno: 26.8.2021.



## ŽIVOTOPIŠ

14. Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation by Thermo Fisher Scientific. Dostupno na: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/dynabeads\\_hu\\_tAct\\_CD3\\_CD28\\_CD137\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/dynabeads_hu_tAct_CD3_CD28_CD137_man.pdf).

Pristupljeno: 29.8.2021.

15. Poltorak MP, Graef P, Tschulik C, Wagner M, Cletiu V, Dreher S. i sur. Expamers: a new technology to control T cell activation. *Sci Rep.* 2020; 10: 17832.

16. Recommended Standard Method for Isolating Mononuclear Cells. Merck. Dostupno na adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/hematology/recommended-standard-method>. Pristupljeno: 29. 08. 2021.

17. Kolobarić N, Drenjančević I, Matić A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Mihalj M. Dietary Intake of n-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults-A Randomised Study. *Nutrients.* 2021;13(6):1851.

18. MagniSort™ Human CD4 T cell Enrichment Kit. ThermoFisher Scientific. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/8804-6811-74?SID=srch-srp-8804681174?query=MagniSort%E2%84%A2%20Human%20CD4%20T%20cell%20Enrichment%20Kit#/8804-6811-74?SID=srch-srp-8804-6811-74%3Fquery>. Pristupljeno: 30. 08. 2021.

19. eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (500X). ThermoFisher Scientific. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/00-4970-03#/00-4970-03>. Pristupljeno 30. 08. 2021.

20. eBioscience™ Brefeldin A Solution (1000X). ThermoFisher Scientific. Dostupno na adresi; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/00-4506-51?SID=srch-srp-00-4506-51?query=brefeldin%20a%20solution%201000#/00-4506-51?SID=srch-srp-00-4506-51%3Fquery>. Pristupljeno 30. 08. 2021.

21. Matheson NJ, Peden AA., Lehner PJ. Antibody-free magnetic cell sorting of genetically modified primary human CD4+ T cells by one-step streptavidin affinity purification. *PLoS One.* 2014 Oct 31;9(10):e111437.

## ŽIVOTOPIS

### 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Dora Munjić

**Datum i mjesto rođenja:** 21. 10. 1997., Zagreb, Republika Hrvatska

**Adresa:** Gundulićeve Dubravke 22, Zagreb

**Telefon:** +385 933 4034

**E-mail:** munjicdora@gmail.com

#### **Akademsko obrazovanje:**

Školovanje:

- Universidade do Porto- Instituto de Ciencias Biomedicas Abel Salazar, 2021.
- Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet- Sveučilišni diplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike, 2019.-
- Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet – Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike, 2016.–2019.
- Ženska opća gimnazija Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti, Zagreb, 2012.–2016.
- Osnovna škola braće Radić, Botinec, Zagreb, 2004.–2012.