

STRESZCZENIE.

Wstęp.

Zanieczyszczenie środowiska, zmiany klimatyczne, niezdrowy tryb i styl życia, codzienna dieta bogata w konserwanty i sztuczne dodatki, a także ksenobiotyki mogą negatywnie wpływać na sprawne funkcjonowanie układu odpornościowego. Bioaerozole, ze względu na swój skład, mogą zakłócać działanie układu immunologicznego i zaburzać jego poszczególne mechanizmy obronne. W konsekwencji być przyczyną wielu chorób tj. reakcje alergiczne, katar sienny, astma, zapalenie oskrzeli, chroniczna niewydolność płuc, rak płuc, choroby układu sercowo-naczyniowego, nieżyty przewodu pokarmowego, zapalenia zatok i spojówek czy infekcje wirusowe.

Mediatory uwalniane z dróg oddechowych po zadziałaniu antygenów i substancji znajdujących się w powietrzu wdychanym, dostają się do krążenia i mogą *in vivo* aktywować komórki układu immunologicznego. Aerozole biologiczne pochodzenia zewnętrznego powstają z drobnoustrojów oraz elementów pochodzenia organicznego znajdujących się między innymi w wodzie i glebie. Cząstki te przybierają formę aerozolu w wyniku działania wiatru, ulewnych, pluskających deszczy, bryzy morskiej.

Wzrost stężenia bioaerozoli w środowisku wewnętrznym może być spowodowany m.in. nadmierną izolacją cieplną budynków, ich złym utrzymaniem, stosowaniem systemów klimatyzacyjnych, względnie wysoką wilgotnością panującą w pomieszczeniach, a także złą wentylacją i brakiem świeżego powietrza. Spośród cząstek bioaerozoli, największe zagrożenie dla zdrowia człowieka niosą małe komórki drobnoustrojów, które są zatrzymywane wewnątrz płuc i usunięcie ich stanowi dla organizmu duży problem.

Zmiany środowiska stają się obiektem coraz większego zainteresowania, dzięki czemu rośnie także poziom zrozumienia ich oddziaływania na organizm człowieka i skłonność do wystąpienia chorób układu oddechowego. Liczne badania naukowe pozwalają zgłębić wiedzę na temat związku między mikroorganizmami obecnymi w powietrzu a alergią, która może przerodzić się w astmę. Zła jakość powietrza w miastach często przekracza dopuszczalne normy. Natomiast przebywanie w budynkach też nie stanowią najlepszej

ochrony, ponieważ znajdujące się w nich powietrze jest pełne chorobotwórczych drobnoustrojów i ich pochodnych. Prowadzone w ostatnich latach badania dowodzą, że bioaerozole mogą być przyczyną wielu chorób takich jak alergię czy nowotwory. Dlatego zbadanie wpływu czynników infekcyjnych, będących składnikiem powietrza wewnętrznego na proces apoptozy limfocytów wydaje się niezwykle istotne. Układ oddechowy człowieka jest układem szczególnie narażonym na kontakt z drobnoustrojami, w tym także bakteriami Gram-ujemnymi, ponieważ nieustannie dostają się one do naszego organizmu w wyniku respiracji.

Apoptoza jako proces czynnym, wymagającym aktywacji wielu genów oraz nakładu energii. Elementem łączącym wszystkie rodzaje przebiegu apoptozy są kaspazy, które w zależności od etapu apoptozy, dzielimy na inicjatorowe oraz wykonawcze. Po zakończeniu apoptozy zawartość komórkowa zostaje zamknięta w ciałkach apoptotycznych związanych z błoną.

Rola apoptozy w infekcji jest najlepiej poznana dzięki licznym badaniom naukowym, ponieważ wirusy i bakterie kodują inhibitory apoptozy, które są niezbędne do wywołania reakcji zapalnej. Większość wirusów hamuje proces apoptozy ponieważ będą one replikować się lepiej, gdy zainfekowana komórka żyje dłużej. Liczne zaburzenia apoptozy przyczynia się do rozwoju wielu schorzeń. Nieodpowiedni stopień nasilenia apoptozy doprowadza do rozwoju schorzeń nowotworowych, autoimmunologicznych i przewlekłych infekcji. Z kolei nadmierna apoptoza doprowadza do chorób neurodegeneracyjnych a także nasilania powikłań procesów niedokrwienia. Mutacje genów uczestniczących w procesach apoptozy i proliferacji komórek oraz genów naprawy DNA zidentyfikowano jako czynniki przyczynowe chorób nowotworowych. Proces apoptozy jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zaburzenia w przeprowadzaniu apoptozy mają bardzo negatywny skutek. Pojawiają się choroby, których profilaktyka i sposób leczenia nie są jeszcze poznane. Proces nowotworzenia i możliwość jego zapobiegania od wielu lat jest celem licznych badań naukowych.

Prace dotyczące apoptozy, w głównej mierze skupiają się na stworzeniu metody pozwalającej na regulowanie (stymulacja, hamowanie) procesu apoptozy np. w komórkach nowotworowych oraz zgłębianiu wiedzy na temat kontroli apoptozy i jej odpowiednim przebiegu w organizmach żywych.

Cel pracy.

Celem pracy była ocena apoptozy limfocytów krwi obwodowej w odniesieniu do wybranych markerów odpowiedzi nieswoistej.

Metody.

Komórki jednojądrowe (PBMC) izolowałam metodą Boyüma. Poprzez system pośredniego znakowania magnetycznego przeciwciałami anti-CD14 z całkowitej puli PBMC metodą negatywnej selekcji pozyskiwałam populację limfocytów. Następnie limfocyty hodowałam przez 48h w medium RPMI-1610 ogrzanym do temperatury 37°C wzbogaconym w antybiotyki streptomycynę (10mg/mL) i penicylinę (100 U/mL) oraz L-glutaminę (200mM) i 10% FBS w obecności: LPS-1µg/ml, SEA-1µg/ml i HPIV-3 (MOI 0,1) Próbę kontrolną stanowiły komórki indukowane PHA (10µg/ml); próbę spontaniczną stanowiły komórki zawieszane w medium hodowlanym RPMI 1640. Próby inkubowałam w temperaturze 37°C, 5% CO₂ oraz 95% wilgotności przez 48h. Po tym czasie, próby wirowałam a nadsączka zabezpieczano w temp. -70 °C w celu oznaczenia markerów odpowiedzi nieswoistej. W osadzie komórkowy oznaczałam apoptozę limfocytów przy użyciu zestawu aneksyna V-FITC, jodek propidyny za pomocą cytometru przepływowego AMNIS z wizualizacją obrazu ImageStream z zastosowaniem oprogramowania IDEAS.

Apoptozę limfocytów badałam z równoczesną identyfikacją na subpopulacje CD4+, CD8+, CD56+ za pomocą zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Ocenę apoptozy limfocytów przeprowadzałam przy zastosowaniu oprogramowaniu IDEAS, poprzez dokładną analizę cytogramów i zdjęć tych komórek.

Do oznaczenia stężeń rozpuszczalnych markerów apoptozy, cytokin oraz katelicyny LL-37 w nadsączach po hodowli limfocytów krwi obwodowej, zastosowałam testy oparte o metodę immunoenzymatyczną ELISA.

Z osadu komórkowego limfocytów wyizolowałam RNA przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit z dodatkowym etapem trawienia DNAzą postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Do etapu odwrotnej transkrypcji przepisania mRNA na cDNA użyłam odpowiedniej ilości RNA i przeprowadzałam za pomocą zestawu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit według protokołu producenta. Następnie oceniałam poziom ekspresji mRNA dla genów TLR1, TLR3, TLR4 metodą Real Time PCR z zastosowaniem aparatu Diagnostic Systems BD MAX, który cechuje się wysoką jakością i możliwością aplikacyjną

w q(RT)PCR. Do obliczeń ilościowego współczynnika RQ ekspresji mRNA wyżej wymienionych genów, stosowano algorytm metody podwójnej delty. Wyniki przedstawiłam jako potęgę z ujemnej podwójnej delty ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Wyniki.

Po 48h hodowli próby SP, zaobserwowałam istotnie statystycznie wyższą apoptozę limfocytów CD4+, CD8+, CD56+, w porównaniu do odsetka tych komórek w czasie T0. Średnia wartość odsetka subpopulacji limfocytów CD4+, CD8+, CD56+ we wczesnej i całkowitej apoptozie, pod wpływem PHA w próbie po 48h hodowli była wyższa w porównaniu do próby SP ($p > 0,05$). Poszczególne etapy apoptozy limfocytów CD4+, CD8+, CD56+ po 48h hodowli pod wpływem LPS, SEA oraz HPIV-3 były istotnie statystycznie wyższe ($p < 0,01$) w porównaniu do odsetka apoptozy tych komórek w próbie SP.

Wykazałam istotny statystycznie wzrost wydzielania stężenia: ICE caspaza-1, Fas/CD95/APO1, TNF- α , Katelicyny LL-37, IL-10, IL 17A, IL-22 w 48h hodowli limfocytów pod wpływem PHA, LPS, SEA, HPIV3 w porównaniu do próby SP oraz pomiędzy próbami stymulowanymi PHA vs HPIV3, PHA vs LPS, PHA vs SEA, PHA vs HPIV3, SEA vs HPIV3. Wykazałam istotny statystycznie wzrost stężenia wydzielania Granzymu B w obecności

PHA, LPS i SEA oraz niższe stężenie wydzielania tego markera w obecności HPIV-3 w odniesieniu do próby spontanicznej SP.

Wykazałam istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji mRNA genu TLR1 po 48h hodowli limfocytów w porównaniu do hodowli po 24h w próbach stymulowanych LPS, SEA, HPIV3. Wykazałam istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji mRNA genu TLR3 po 48h hodowli limfocytów w porównaniu do hodowli po 24h jedynie dla prób stymulowanych HPIV3. Wykazałam wzrost poziomu ekspresji mRNA genu TLR4 po 48h hodowli limfocytów w porównaniu do hodowli po 24h w próbach stymulowanych LPS oraz HPIV3.

Wnioski.

Zastosowane w badaniach czynniki infekcyjne LPS, SEA HPIV-3, które są obecne w bioaerozolach powietrza wewnętrznego w istotny sposób nasilają proces apoptozy limfocytów krwi obwodowej osób zdrowych.

Proces apoptozy limfocytów T w 48h hodowli, w istotny sposób jest modulowany w zależności od stężenia nieswoistych rozpuszczalnych markerów odpowiedzi immunologicznej.

Generowanie poszczególnych markerów odpowiedzi nieswoistej w istotny sposób może modulować proces apoptozy limfocytów T.

Ekspresja mRNA genu dla poszczególnych receptorów TLR, wykazuje zróżnicowany poziom w zależności od czasu hodowli limfocytów jak również od rodzaju i wpływu czynnika biologicznego.

Przedstawione w niniejszej pracy obserwacje potwierdzają przypuszczenia, że czynniki infekcyjne obecne w bioaerozolach mogą mieć znaczący wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego człowieka i mogą być przyczyną osłabienia komórek immunologicznie kompetentnych co zwiększa zapadalność na choroby układu oddechowego.