



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Diplomsko delo

**Učinek agonistov in antagonistov
endokanabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na
izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah
gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo**

September, 2016

Rok Petrijan



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Rok Petrijan

**Učinek agonistov in antagonistov
endokanabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na
izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah
gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo**

Diplomsko delo

Maribor, 2016



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Učinek agonistov in antagonistov endokanabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje

Študent: Rok Petrijan

Študijski program: univerzitetni študijski program I. stopnje Kemijska tehnologija

Predvideni strokovni naslov: diplomirani inženir kemijske tehnologije (UN)

Mentor: prof. dr. Uroš Potočnik

Komentor: asist. ddr. Matjaž Deželak

Maribor, 2016



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Številka: K1006254

Datum: 15.03.2016

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 44/2015)

izdajam

SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Rok Petrijan, študent-ka univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, lahko izdela diplomsko delo.

Mentor-ica: red. prof. dr. Uroš Potočnik

Somentor-ica: asist. ddr. Matjaž Deželak

Naslov diplomskega dela:

UČINEK AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ENDOKANABINOIDNIH RECEPTORJEV CB1 IN CB2 NA IZRAŽANJE NEKATERIH CITOKINOV V CELIČNIH KULTURAH GOJENIH LIMFOIDNIH CELIC BOLNIKOV Z ASTMO

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

THE EFFECT OF AGONISTS AND ANTAGONISTS OF CB1 AND CB2 RECEPTORS ON EXPRESSION OF SOME CYTOKINES IN LYMPHOID CELL CULTURES DEVELOPED FROM ASTHMATIC PATIENTS

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije do 30.09.2016 v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice v roku 3 delovnih dni.

Obvestiti:

- kandidata -ko,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv



DEKAN:

red. prof. dr. Zdravko Kravanja



FAKULTETA ZA KEMIJO IN
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Kazalo

Kazalo.....	I
Izjava	III
Zahvala	IV
Povzetek	V
Abstract	VI
Seznam tabel.....	VII
Seznam slik.....	VIII
Uporabljene kratice in simboli	XII
1 Uvod.....	1
1.1 Opredelitev bolezni.....	2
1.2 Patofiziologija astme	2
1.2.1 Dejavnik tumorske nekroze- α	4
1.3 Klinična slika, diagnoza in zdravljenje.....	5
2 Endokanabinoidni sistem in kanabinoidi	6
2.1 Endokanabinoidni sistem.....	6
2.2 Agonisti in antagonisti endokanabinoidnih receptorjev	8
2.3 Kanabinoidi in imunski sistem	8
3 Eksperimentalni del	10
3.1 Laboratorijska oprema in materiali.....	10
3.1.1 Mononuklearni levkociti iz periferne krvi (PBMC).....	10
3.1.2 Kemikalije in reagenti	10
3.1.3 Raztopine in pufri.....	11
3.1.4 Začetni oligonukleotidi.....	12
3.1.5 Laboratorijska oprema.....	13
3.2 Metode dela	14
3.2.1 Izolacija mononuklearnih levkocitov iz periferne krvi	14
3.2.2 Gojenje izoliranih celičnih kultur.....	14
3.2.3 Izolacija RNA in proteinov	15
3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	17
3.2.5 Prenos western.....	20
3.2.6 Analiza morfoloških značilnosti PBMC s pretočno citometrijo	22

3.2.1	Mikroskopija	22
3.2.2	Obdelava podatkov	22
4	Rezultati in diskusija.....	23
4.1	Optimizacija temperature qPCR.....	23
4.2	Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov	24
4.3	Rezultati optimizacije bioaktivnih snovi za tretiranje gojenih PBMC	25
4.3.1	Optimizacija časa inkubacije PBMC s TNF.....	25
4.3.2	Optimizacija koncentracije TNF	31
4.3.3	Optimizacija časa TNF po 18 urah aklimatizacije PBMC	36
4.3.4	Optimizacija koncentracije agonista ACEA.....	39
4.4	Tretiranje PBMC astmatičnih in zdravih posameznikov s sintetičnimi kanabinoidi 42	
5	Zaključek.....	47
6	Literatura.....	48
6.1	Viri slikovnega materiala.....	52
7	Priloge	53
7.1	Priloga 1.....	53
7.2	Priloga 2.....	58
7.3	Priloga 3.....	66
7.4	Priloga 4.....	70

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal sam, prispevki drugih so posebej označeni. Pregledal sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

Vir: PubMed, ScienceDirect

Gesla:	Število referenc
asthma	12
TNF	4
endocannabinoid system, cannabinoid receptors, CB1, CB2	10
cannabinoids	6
ACEA	1
AM251	2
immunomodulation by cannabinoids, cannabinoids and immune system	25
PBMC, cell culture	4
gene exspression	1

Skupno število pregledanih člankov: 80

Skupno število pregledanih knjig: 3

Maribor, september 2016

Rok Petrijan
podpis

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Urošu Potočniku za idejno zasnovo in končen pregled diplomske naloge in somentorju asist. ddr. Matjažu Deželaku za pomoč, svetovanje in usmerjanje pri eksperimentalnem in teoretičnem delu ter pomoč pri urejanju vsebinskega dela diplomske naloge.

Zahvala gre tudi Carini Pinto Kozmus za svetovanje in usmerjanje pri diplomskem delu ter pomoč pri eksperimentalnem delu.

Posebna zahvala gre mojim staršem in bratu za vso podporo in razumevanje v času študija in izdelave diplomske naloge.

Učinek agonistov in antagonistov endokanabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

Povzetek

Astma je kronična vnetna bolezen dihal, pri kateri se pod vplivom različnih dražljajev zožijo dihalne poti, pojavi se njihovo kronično vnetje in nabiranje sluzi v bronhijih. Vse to vodi v oteženo dihanje, občutek stiskanja prsnega koša in kašljanja, predvsem sredi noči ali zgodaj zjutraj. V diplomski nalogi smo se osredotočili na *ex vivo* proučevanje endokanabinoidnega sistema pri imunskem odzivu bolnikov z astmo in predlagali alternative trenutnim načinom zdravljenja s protivnetnimi (ti. preprečevalci) in bronhodilatatornimi (ti. olajševalci) zdravili. Zanimal nas je učinek agonistov in antagonistov kanabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje citokinov in obeh receptorjev. V ta namen smo v limfoidnih celičnih kulturah bolnikov z astmo in zdravih posameznikov izmerili izražanje genov *CNR1*, *CNR2*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL8*, *IL10* in *CSF2* v odvisnosti od tretiranja z različnimi sintetičnimi kanabinoidi.

Da bi *ex vivo* simulirali vnetno okolje smo celične kulture gojili v prisotnosti dejavnika tumorske nekroze- α (TNF), ki se je v različnih raziskavah izkazal kot pomemben posrednik vnetnega odgovora. Za najbolj optimalne rezultate gojenja celičnih kultur iz vzorcev astmatičnih bolnikov in zdravih posameznikov, smo najprej izvedli optimizacijo koncentracije uporabljenega TNF in časa njegove inkubacije ter optimalne koncentracije uporabljenih sintetičnih kanabinoidov, pri čemer nam je kot merilo služila stopnja izražanja genov. Med samo optimizacijo parametrov nismo potrdili predpostavljene odvisnosti izražanja *CNR2* od učinkov TNF, zato načrtovanega tretiranja z njegovimi agonisti in antagonistami nismo izvedli. V celičnih kulturah tretiranih z ACEA (sintetični agonist receptorja CB1) smo pri vzorcih astmatičnih bolnikov izmerili povišano ekspresijo *IL5* v primerjavi z netretiranimi celicami in celicami zdravih posameznikov. V astmatičnih vzorcih je bila povišana tudi ekspresija genov *CNR1* in *IL4* v primerjavi z zdravimi posamezniki, vendar ni bilo učinka ACEA. S tretiranjem celic z AM251 (sintetični antagonist receptorja CB1) smo potrdili, da učinki ACEA dejansko potekajo preko CB1 receptorja.

Iz dobljenih rezultatov je mogoče sklepati, da kanabinoidi z učinkom na izražanje citokinov lahko vplivajo na delovanje vnetnega procesa pri bolnikih obolelih za astmo, zato bi lahko v prihodnosti služili kot pomembne farmakološke učinkovine za zdravljenje astme.

Ključne besede: astma, kanabinoidi, kanabinoidni receptorji, citokini, dejavnik tumorske nekroze alfa, periferne mononuklearne celice, genska ekspresija

UDK: 616.248:575.113(043.2)

The effect of agonists and antagonists of CB1 and CB2 receptors on expression of some cytokines in lymphoid cell cultures developed from asthmatic patients

Abstract

Asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract, in which, under the influence of different stimuli, airways narrow and chronic inflammation and the accumulation of mucus in the bronchi emerge. All this leads to shortness of breath, feeling of tightness of the chest, and coughing, particularly at night or early in the morning. In this thesis, we focused on *ex vivo* study of the endocannabinoid system (ECS) in the immune response of patients with asthma with the aim to explore its potential as a novel drug target and treatment procedures. If the involvement of ECS in asthma would be confirmed, alternatives to the current methods of treatment with anti-inflammatory and bronhodilatory medicines could be developed. We were interested in the effect of agonists and antagonists of cannabinoid receptors (CB) 1 and 2 on the expression of selected cytokines and both receptors. In this manner, we measured gene expressions of *CNR1*, *CNR2*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL8*, *IL10* and *CSF2* in the lymphoid cell cultures of patients with asthma and healthy individuals as a function of treatment with synthetic cannabinoids.

In order to simulate an *ex vivo* inflammatory environment, cell cultures were grown in the presence of tumor necrosis factor- α (TNF), which already proved as a major mediator of the inflammatory response in a variety of studies. To achieve best results we first performed the optimization of TNF concentration and its incubation time together with the optimization of cannabinoid concentration, where the level of cytokine gene expressions served as a measure. During parameter optimization, we did not confirm the hypothesized dependence of *CNR2* expression with TNF treatment; therefore, we did not perform the planned treatment with its agonists and antagonists.

Results showed that in cell cultures treated with CB agonist expression of *IL5* was elevated in cells of asthmatic patients in comparison with untreated asthmatic cells and the cells of healthy individuals. In comparison with healthy individuals, we found higher *CNR1* and *IL4* gene expression, but there was no effect of CB1 agonist. The treatment of cells with CB1 antagonist, we confirmed that the effects of CB1 agonist actually took place via CB1 receptor.

From the obtained results it can be concluded that cannabinoids may affect the operation of the inflammatory process in patients suffering from asthma via cytokine genes expression. Components of ECS could therefore serve as an important pharmacological targets for future development of novel strategies for asthma.

Key words: asthma, cannabinoids, cannabinoid receptors, cytokines, tumor necrosis factor alpha, peripheral blood mononuclear cell, gene expression

UDK: 616.248:575.113(043.2)

Seznam tabel

Tabela 3-1: Seznam kemikalij in reagentov za gojenje PBMC ter izolacijo RNA in proteinov.	10
Tabela 3-2: Kemikalije in reagenti za izvedbo PCR reakcije, prenosa western in pretočne citometrije.....	11
Tabela 3-3: Nukleotidno zaporedje in proizvajalec začetnih oligonukleotidov.....	12
Tabela 3-4: Seznam uporabljene laboratorijske opreme in njihov proizvajalec.	13
Tabela 3-5: Program PCR reakcije za izvedbo reverzne transkripcije.....	18
Tabela 3-6: Sestava reakcijske mešanice za analizo genske ekspresije <i>CNR2</i> , <i>CNR1</i> , <i>IL8</i> , <i>IL4</i> , <i>IL5</i> , <i>IL10</i> , <i>CSF2</i> , <i>IL6</i> , <i>ACTB</i> , <i>GAPDH</i> , <i>B2M</i>	19
Tabela 4-1: Optimalne koncentracije in temperature prileganja začetnih oligonukleotidov.	24
Tabela 4-2: Rezultati analize viabilnosti PBMC pretočne citometrije.....	42
Tabela 7-1: Seznam informacij o vzorcih proteinov prenosa western pri optimizaciji parametrov.....	53
Tabela 7-2: Seznam informacij o vzorcih proteinov prenosa western pri inkubaciji PBMC astmatičnih in zdravih posameznikov s sintetičnimi kanabinoidi.....	70

Seznam slik

Slika 1-1: Shema zdravega in vnetega bronhija.	2
Slika 1-2: Imunski odgovor preko Th1 in Th2 signalne poti.	3
Slika 1-3: Imunski odziv pri alergijski astmi.	4
Slika 2-1: Shematski prikaz aktivacije kanabinoidnih receptorjev CB1, CB2, GPR55 in TRPV1 s kanabinoidi	7
Slika 3-1: Razporeditev faz pred in po centrifugiranju	14
Slika 3-2: Struktura območja za štetje celic na hemocitometru.	15
Slika 3-3: Fazna separacija makromolekul iz liziranih celic.	16
Slika 3-4: Shematski potek izolacije RNA.	16
Slika 3-5: Izolacija proteinov.	16
Slika 3-6: Graf reakcije pri qPCR.	17
Slika 3-7: Shematski prikaz sestavin elektroforetske celice (levo) in dejanski fotografiji ene izmed naših elektroforez (desno).	20
Slika 4-1: Fotografija agaroznega gela optimizacije temperature za gen <i>IL6</i>	23
Slika 4-2: Fotografija agaroznega gela optimizacije temperature za gen <i>IL10</i>	23
Slika 4-3: Fotografija agaroznega gela optimizacije temperature za gen <i>CSF2</i>	23
Slika 4-4: Izražanje tarčnih genov po 1, 3 in 6 h inkubacije PBMC s TNF (1.eksperiment). 25	
Slika 4-5: Izražanje tarčnih genov po 1, 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF (2.eksperiment).	26
Slika 4-6: Izražanje tarčnih genov po 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF (3.eksperiment). 26	
Slika 4-7: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (1. eksperiment).	27
Slika 4-8: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (1. eksperiment).	28
Slika 4-9: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (2. eksperiment).	28
Slika 4-10: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (2. eksperiment).	29
Slika 4-11: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (3. eksperiment).	29
Slika 4-12: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (3. eksperiment).	30
Slika 4-13: Stopnja izražanja <i>CNR1</i> v odvisnosti od koncentracije TNF.	31
Slika 4-14: Stopnja izražanja <i>CNR2</i> v odvisnosti od koncentracije TNF.	32
Slika 4-15: Stopnja izražanja <i>IL4</i> v odvisnosti od koncentracije TNF.	32
Slika 4-16: Stopnja izražanja <i>IL5</i> v odvisnosti od koncentracije TNF.	32
Slika 4-17: Stopnja izražanja <i>IL8</i> v odvisnosti od koncentracije TNF.	33
Slika 4-18: Stopnja izražanja <i>IL10</i> v odvisnosti od koncentracije TNF.	33
Slika 4-19: Stopnja izražanja <i>CSF2</i> v odvisnosti od koncentracije TNF.	33
Slika 4-20: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) pri optimizaciji koncentracije TNF.	34

Slika 4-21: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) pri optimizaciji koncentracije TNF.	35
Slika 4-22: Stopnja izražanja <i>CNR1</i> po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.	36
Slika 4-23: Stopnja izražanja <i>CNR2</i> po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.	37
Slika 4-24: Stopnja izražanja <i>IL4</i> po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.	37
Slika 4-25: Stopnja izražanja <i>IL5</i> po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.	37
Slika 4-26: Stopnja izražanja <i>IL8</i> po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.	38
Slika 4-27: Stopnja izražanja <i>IL10</i> po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.	38
Slika 4-28: Stopnja izražanja gena <i>CNR1</i> po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.....	39
Slika 4-29: Stopnja izražanja gena <i>CNR2</i> po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.....	40
Slika 4-30: Stopnja izražanja gena <i>IL4</i> po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.	40
Slika 4-31: Stopnja izražanja gena <i>IL8</i> po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.	41
Slika 4-32: Stopnja izražanja gena <i>IL10</i> po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.	41
Slika 4-33: Stopnja izražanja gena <i>CNR1</i> po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).	43
Slika 4-34: Stopnja izražanja gena <i>IL4</i> po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251(KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).	43
Slika 4-35: Stopnja izražanja gena <i>IL5</i> po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251(KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).	44
Slika 4-36: Stopnja izražanja gena <i>CNR2</i> po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251(KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).	45
Slika 4-37: Stopnja izražanja gena <i>IL8</i> po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251(KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).	45
Slika 4-38: Stopnja izražanja gena <i>IL10</i> po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).	46
Slika 4-39: Stopnja izražanja gena <i>CSF2</i> po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).	46
Slika 7-1: Fotografija 1. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.	54
Slika 7-2: Fotografija 1. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	54
Slika 7-3: Fotografija 2. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.	55
Slika 7-4: Fotografija 2. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	55

Slika 7-5: Fotografija 3. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.	56
Slika 7-6: Fotografija 3. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	56
Slika 7-7: Fotografija 4. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.	57
Slika 7-8: Fotografija 4. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	57
Slika 7-9: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu AST1.	58
Slika 7-10: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400 \times povečavi v vzorcu AST1.	58
Slika 7-11: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu AST1.....	59
Slika 7-12: Visok signal CALC in 7-AAD v vzorcu AST1.....	59
Slika 7-13: Visok signal CALC in nizek signal 7-AAD v vzorcu AST1.....	59
Slika 7-14: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu AST1.....	59
Slika 7-15: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu AST2.	60
Slika 7-16: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400 \times povečavi v vzorcu AST1.	60
Slika 7-17: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu AST1.....	61
Slika 7-18: Visok signal CALC in 7-AAD v vzorcu AST2.....	61
Slika 7-19: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu AST2.....	61
Slika 7-20: Srednji signal CALC in 7-AAD v vzorcu AST2.....	61
Slika 7-21: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu CON1.....	62
Slika 7-22: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400 \times povečavi v vzorcu CON1.....	62
Slika 7-23: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu CON1.....	63
Slika 7-24: Visok signal CALC in nizek signal 7-AAD v vzorcu CON1.....	63
Slika 7-25: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu CON1.....	63
Slika 7-26: Srednji signal CALC in 7-AAD v vzorcu CON2.	63
Slika 7-27: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu CON2.....	64
Slika 7-28: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400 \times povečavi v vzorcu CON2.....	64
Slika 7-29: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu CON2.....	65
Slika 7-30: Slika 7 24: Visok signal CALC in nizek signal 7-AAD v vzorcu CON2.....	65
Slika 7-31: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu CON2.....	65
Slika 7-32: Srednji signal CALC in 7-AAD v vzorcu CON2.	65
Slika 7-33: Mikroskopska fotografija vzorca AST1 pred gojenjem celic.....	66
Slika 7-34: Mikroskopska fotografija vzorca AST2 pred gojenjem celic.....	66
Slika 7-35: Mikroskopska fotografija vzorca KON1 pred gojenjem celic.....	67
Slika 7-36: Mikroskopska fotografija vzorca KON2 pred gojenjem celic.....	67

Slika 7-37: Mikroskopska fotografija vzorca AST1 med gojenjem celic.....	68
Slika 7-38: Mikroskopska fotografija vzorca AST2 med gojenjem celic.....	68
Slika 7-39: Mikroskopska fotografija vzorca KON1 med gojenjem celic.....	69
Slika 7-40: Mikroskopska fotografija vzorca KON2 med gojenjem celic.....	69
Slika 7-41: Fotografija 5. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1. ..	71
Slika 7-42: Fotografija 5. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	71
Slika 7-43: Fotografija 6. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1. ..	72
Slika 7-44: Fotografija 6. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	72
Slika 7-45: Fotografija 7. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1. ..	73
Slika 7-46: Fotografija 7. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	73
Slika 7-47: Fotografija 8. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1. ..	74
Slika 7-48: Fotografija 8. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	74
Slika 7-49: Fotografija 9. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1. ..	75
Slika 7-50: Fotografija 9. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.	75

Uporabljene kratice in simboli

Kratice

7-AAD	7-aminoaktinomicin D
AC	adenilat-ciklaza
ACEA	arahidonil-2-kloroetilamid, sintetični kanabinoid
<i>ACTB</i>	gen za β -actin
AEA	arahidoniletanolamid, anandamid
2-AG	2-arahidonilglicerol
AM251	sintetični kanabinoid
AST	vzorec astmatika
<i>B2M</i>	gen za beta-2-mikroglobulin
BSA	fetusni serum goveda (<i>ang.</i> Bovine Serum Albumin)
cAMP	ciklični adenozinmonofosfat
CALC	kalcein
CB1	kanabinoidni receptor 1
CB2	kanabinoidni receptor 2
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CK	adenilat-ciklaza
<i>CNR1</i>	gen za kanabinoidni receptor 1
<i>CNR2</i>	gen za kanabinoidni receptor 2
COX2	ciklooksigenaza 2
<i>CSF2</i>	gen za granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči faktor
ddH ₂ O	ultra čista voda
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
ERK	od zunajceličnega signala odvisna kinaza (<i>ang.</i> extracellular signal-regulated kinase)
<i>GAPDH</i>	gen za gliceraldehid-3-fosfat
GMCSF	granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči faktor
GPR55	z G-proteini sklopljen receptor 55 (<i>ang.</i> G Protein-Coupled Receptor 55)
FAAH	hidrolaza amidov maščobnih kislin (<i>ang.</i> Fatty Acid Amide Hydrolase)
FEV1	prostornina izdihanega zraka v 1. sekundi (<i>ang.</i> Forced Expiratory Volume in 1. second)
IFN γ	interferon γ
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IL1	interlevkin 1

IL2	interlevkin 2
IL4	gen za interlevkin 4
IL4	interlevkin 4
IL5	gen za interlevkin 5
IL5	interlevkin 5
IL6	gen za interlevkin 6
IL6	interlevkin 6
IL8	gen za interlevkin 8
IL8	interlevkin 8
IL10	gen za interlevkin 10
IL10	interlevkin 10
IL12	interlevkin 12
IL13	interlevkin 13
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza (<i>ang.</i> JUN Amino-Terminal Kinase)
KON	vzorec zdravega posameznika
MAPK	mitogen-aktivirane protein kinaze (<i>ang.</i> Mitogen-Activated Protein Kinase)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
PBMC	periferne mononuklearne celice (<i>ang.</i> Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>ang.</i> Polymerase Chain Reaction)
PEF	meritev največjega pretoka zraka med izdihom (<i>ang.</i> Peak Expiratory Flow)
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaze
PKA	protein kinaza A (<i>ang.</i> Protein Kinase A)
p38 MAPK	p38 z mitogeni aktiviranih protein-kinaz
RNA	ribonukleinska kislina
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
THC	Δ^9 -tetrahidrokanabinol
Th0	pomagalni limfociti T tipa 0
Th1	pomagalni limfociti T tipa 1
Th2	pomagalni limfociti T tipa 2
TNF	dejavnik tumorske nekroze- α (<i>angl.</i> Tumor Necrosis Factor- α)
TNF- β	dejavnik tumorske nekroze- β (<i>angl.</i> Tumor Necrosis Factor- β)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (<i>ang.</i> Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)
TRVP1	vaniloidni receptor 1 (<i>ang.</i> Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1)

Simboli

C _q	cikel kvantifikacije
$\Delta\Delta C_q$	relativna ekspresija
geom. sr. ref. gen	geometrijska sredina referenčnega gena
rcf	relativna centrifugalna sila (ang. Relative Centrifugal Force)
rpm	obratov na minuto (ang. Revolutions per Minute)
t.gen	tarčni gen

1 Uvod

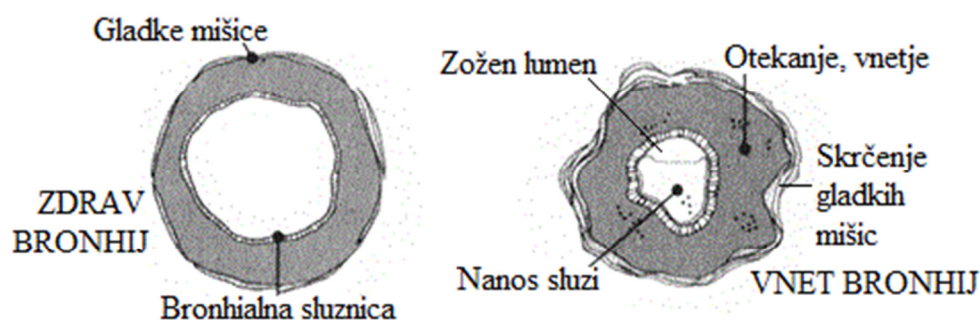
Astma spada med najpogostejše kronične bolezni pljuč. Raziskave kažejo, da obolevnost za astmo v zadnjem času narašča, in to predvsem pri otrocih, čeprav se bolezen pojavlja v vseh starostnih skupinah. Prevalenca pri otrocih znaša do 30%, pri odraslih pa v posameznem starostnem obdobju največ 5% [1]. Vzrok za pojav astme še vedno ni povsem pojasnjen, najverjetneje pa gre za kombinacijo genetskih, razvojnih in okoljskih dejavnikov. S pravilnim zdravljenjem je pri večini bolnikov sicer mogoče doseči popolno stabilizacijo bolezni, vendar astme zaenkrat še z nobenim znanim zdravilom ne moremo pozdraviti dokončno, tj. odpraviti njenih temeljnih vzrokov. Če bolezen ne izzveni sama, je običajno potrebno dolgoletno, tudi doživljenjsko simptomatsko zdravljenje. Poleg tega se določen delež bolnikov ne odzove niti na zdravila, ki so dandanes v klinični uporabi za lajšanje simptomov [2]. Skratka, ker še ni zdravila, s katerim bi astmo lahko dokončno pozdravili, in ker tudi zdravila za simptomatsko zdravljenje niso vedno učinkovita, je iskanje molekularnih tarč za razvoj novih zdravil še kako aktualno.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na proučevanje endokanabinoidnega sistema pri imunskem odzivu bolnikov z astmo. Endokanabinoidni sistem sodeluje pri regulaciji številnih fizioloških in patoloških funkcij, med drugim pri protivnetnem odgovoru imunskega sistema, zato je potencialna tarča za zdravljenje astme. V primeru potrditve vpletenosti endokanabinoidnega sistema v pojav oz. razvoj astme, bi to bila namreč najhitrejša in najbolj neposredna priložnost za terapevtski pristop. Agonisti, antagonist in inhibitorji receptorjev endokanabinoidnega sistema CB1 in CB2 namreč že obstajajo, tako sintetični kot naravni rastlinski.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti učinke sintetičnih agonistov in antagonistov receptorjev CB1 in CB2 na izražanje citokinov in obeh receptorjev. V ta namen smo v limfoidnih celičnih kulturah bolnikov z astmo in zdravih posameznikov izmerili izražanje genov *CNR1*, *CNR2*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL8*, *IL10* in *CSF2* v odvisnosti od tretiranja z različnimi sintetičnimi kanabinoidi. Naša hipoteza je bila, da imajo sintetični kanabinoidi učinek na izražanje citokinov v limfoidnih celičnih kulturah, ta učinek pa se razlikuje med celičnimi kulturami bolnikov z astmo in celičnimi kulturami zdravih posameznikov.

1.1 Opredelitev bolezni

Patofiziološko je astma stanje kroničnega vnetja dihalnih poti, ki prazadene pljuča v celoti, predvsem pa sapnice (bronhije) in bronhiole. Zanj je značilna preodzivnost dihalnih poti na številne dražljaje, zaradi česar prihaja do spazma (mišični krč) dihalnih poti. Sapnice (bronhiji) se na običajno nenevarne povzročitelje, kot so pelod, hladen zrak, telesni napor ali duševna obremenitev odzovejo z močno vnetno reakcijo (Slika 1-1). Vnetna reakcija povzroči nabrekanje sluznice dihalnih poti, zvečano nastajanje goste sluzi in močnejšo prekrvavitev. Pri tem se izločajo tudi vazokonstriktorji, tj. kemijski mediatorji oz. posredniki, ki povzročijo skrčenje bronhialnih mišic.



Slika 1-1: Shema zdravega in vnetega bronhija (1).

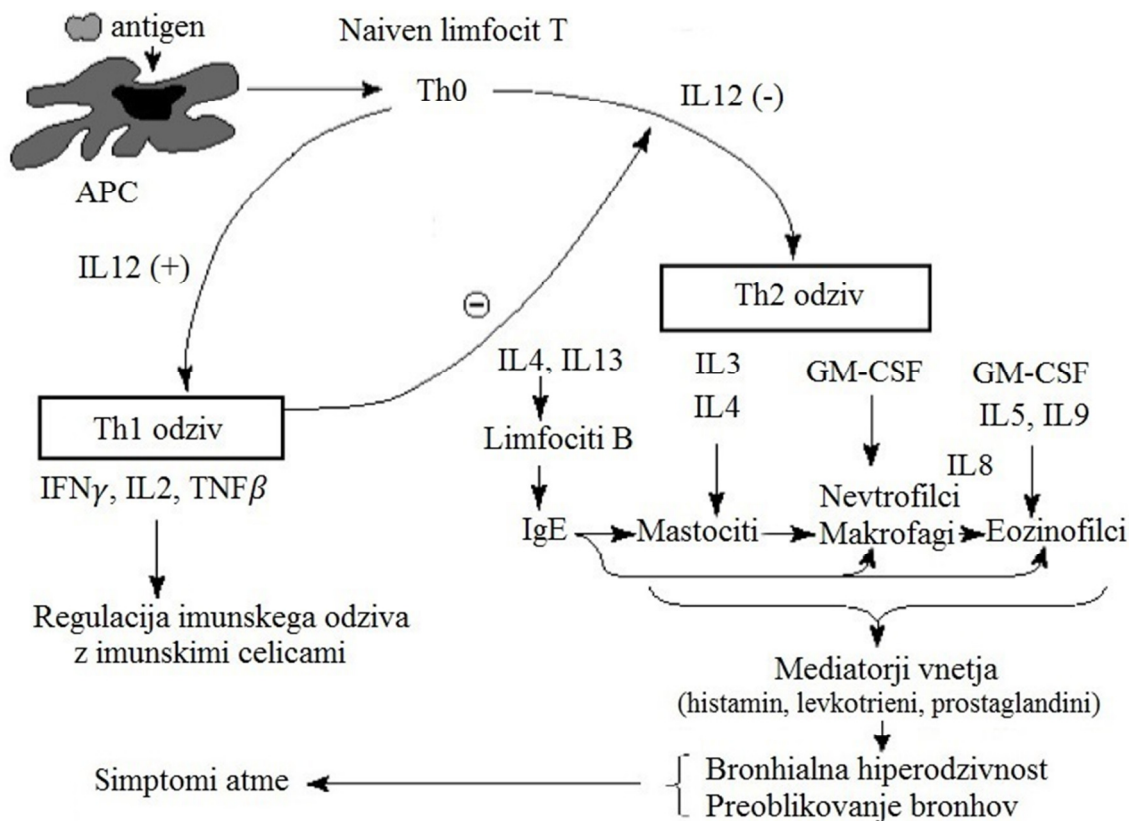
Zaradi cirkadiane variabilnosti je zapora dihal najbolj izrazita v zgodnjih jutranjih urah, najmanjša pa pozno popoldne. Zapora sapnic povzroča težje prehajanje zraka in popusti spontano ali po uporabi ustreznih zdravil. Osnovni vzrok vnetja je neznan. Vnetje bronhijev lahko sprožijo različni alergeni (pelod, hišne pršice, cvetni prah), hladen zrak, telesni napor, duševna obremenitev, virusi in nekatere bakterije. Glede na povzročitelje lahko bolezen delimo na alergijsko in nealergijsko (intrinzično) obliko astme, pri čemer pa poteka vnetje pri vseh oblikah astme enako. [3]

1.2 Patofiziologija astme

Cilj vsakega vnetnega procesa, ki ga povzroči imunski odziv je odstranitev tujka iz telesa. Pri astmi govorimo o preobčutljivostni reakciji, saj gre za imunski odziv proti sicer neškodljivim tujkom. Takšen imunski odziv organizmu bolj škodi kot koristi. Potek vnetnega odziva spremlja medsebojno sodelovanje raznovrstnih in številnih celic. V patogenezi astme so to predvsem mastociti, eozinofilci, alveolarni makrofagi, limfociti in nevtrofilni levkociti [4]. Ustrezne celice na mestu vdora potencialnih škodljivcev v telo za medsebojno signaliziranje uporabljajo neposredne stike preko receptorskih povezav in z izločanjem topnih proteinskih signalnih molekul imenovanih-citokini. Najbolj znani citokini, ki lahko vplivajo na imunske reakcije, so interferoni, dejavnik tumorske nekroze in interleukini.

Alergen se po vstopu v organizem poveže z antigen predstavitevno celico (APC) in CD4⁺ limfocitom T, posledično sproščanje interleukina (IL) 2 pa inducira vnetni odgovor. To vodi do razvoja Th0 celic pomagalk, ki se odvisno od okolja diferencirajo v Th1 ali Th2 celice pomagalk (Slika 1-2). Th1 limfociti T sproščajo interferon γ (IFN γ), IL2 in dejavnik

tumorske nekroze- β (TNF- β), ki aktivirajo makrofage za fagocitozno dejavnost, stimulirajo CD8⁺ limfocite T za izločanje IL2 in inhibirajo funkcije Th2 celic. Pri astmatskem vnetju prevladuje Th2 posredovan imunski odgovor z izločanjem interlevkinov IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 in IL13. IL1, IL3, IL8, dejavnik tumorske nekroze- α (TNF) in granulocitne makrofage stimulirajoči rastni faktor (GM-CSF) so skupni obema podtipoma Th0. [5,6]

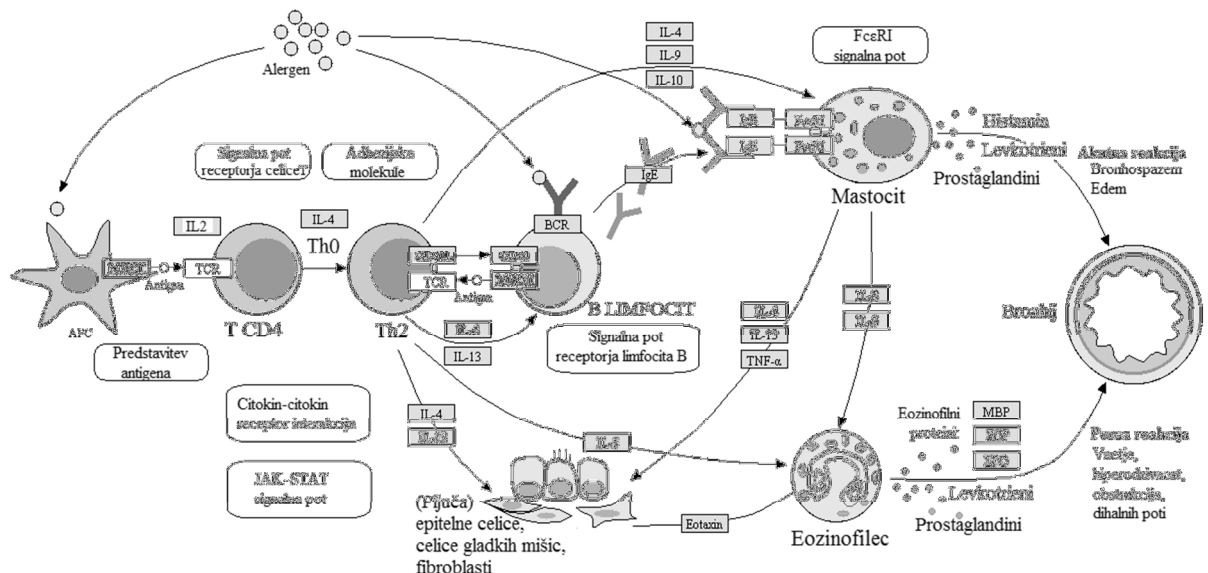


Slika 1-2: Imunski odgovor preko Th1 in Th2 signalne poti (2). Slika prikazuje diferenciacijo Th0 limfocita v Th1 oz. Th2 limfocit ob stiku antigena z antigen predstavitevno celico (APC). To vodi do sproščanja različnih od Th1/Th2 odvisnih citokinov. Ti regulirajo imunski odziv z vplivom na imunske celice, ki izločajo mediatorje vnetja. V primeru Th2 odgovora to vodi do pojava simptomov astme. Od Th1 odvisni citokini inhibirajo odgovor preko Th2 signalne poti in obratno (na sliki prikazano z znakom \ominus).

Ti citokini igrajo različne vloge v vnetnem procesu. IL10 spodbuja imunski odgovor in produkcijo Th2 celic, IL6 pa modulira imunski odgovor. IL4 in IL13 delujeta na B limfocite in stimulirata sintezo antigen odvisnih IgE protiteles. Pri tem sodelujeta tudi IL5 in IL9, poleg tega pa regulirata tudi razvoj in diferenciacijo eozinofilcev. IL8 je kemoatraktni faktor za nevtrofilce in za aktivacijo eozinofilcev. IL3 in IL4 sta rastna faktorja za mastocite, GM-CSF pa je ključen za razvoj in dozorevanje nevtrofilcev, eozinofilcev in makrofagov. Citokini Th1 delujejo zaviralno na delovanje citokinov Th2 in obratno. [7]

Th2 celice z izločanjem interlevkinov IL4 in IL13 aktivirajo B limfocite, ki začnejo sintetizirati imunoglobuline E (IgE). IgE protitelesa se vežejo na mastocite preko visoko afinitetnega receptorja Fc ϵ Rc (Slika 1-3). Ponovni stik z enakim antigenom sproži fazo akutne reakcije. Mastociti degranulirajo in sproščajo žilno aktivne amine (histamin), levkotriene, prostaglandine in druge mediatorje. Mediatorji mastocitov povročijo rekrutacijo in aktivacijo tudi drugih imunskih celic (eozinofilcev, nevtrofilcev, makrofagov) in

strukturnih celic (gladke mišice, fibroblasti). Te zaznamujejo pozno fazo astmatske reakcije, ki ni zastopana pri vseh astmatskih bolnikih. Vse to vodi do vnetnega preoblikovanja bronhijev, do trajne zadebelitve stene in nepovratne zapore, kar povzroča kronične astmatske simptome. [8]



Slika 1-3: Imunski odziv pri alergijski astmi (3).

1.2.1 Dejavnik tumorske nekroze- α

Dejavnik tumorske nekroze- α (TNF) je celični signalni protein (citokin), ki ga izločajo predvsem aktivirani makrofagi in monociti, pa tudi druge celice, kot so limfociti, mastociti, nevtrofilci, eozinofilci, naravne celice ubijalke, celice gladkih mišic, tumorske celice in nevroni. Je hormonu podoben peptid, ki lahko signalizira na dolge razdalje ali učinkuje na lokalni ravni kot parakrini mediator. TNF je vključen v številne biološke procese kot so proliferacija, diferenciacija, apoptoza, presnova lipidov in koagulacija. Kot endogeni pirogen inducira vročino, inhibira genozo tumorjev, učinkuje kot glavni posrednik akutnega vnetnega odgovora in je odgovoren za številne sistemske zaplete pri hudih okužbah. Pomembna vloga TNF je spodbujanje vnetnega odziva in regulacija imunskih celic. Preko vpliva na adhezijske molekule povzroča nakopičenje levkocitov, predvsem nevtrofilcev in eozinofilcev, v področje vnetja. Stimulira tudi ostale imunske celice, predvsem mononuklearne fagocite, k izločanju vnetnih citokinov IL1, IL6 in drugih kemokinov. [9]

TNF je vpleten v nastanek številnih bolezni, vključno z avtoimunskimi, kardiovaskularnimi, nevrološkiimi in rakom. Ima pomembno vlogo tudi v številnih pljučnih boleznih kot so astma, kronični bronhitis, kronične obstruktivne bolezni, akutna poškodba pljuč in akutni respiratorni distressni sindrom. Asociacijske študije, ki so primerjale polimorfizme tega gena med različnimi skupinami bolnikov in zdravimi posamezniki so potrdile tudi povezavo z astmo [10]. Pri astmi je ugotovljena povišana ekspresija TNF in njegova provnetna vloga na okrepitev astmatskega vnetja prek aktivacije jedrnega faktorja- κ B (NF- κ B), aktivatorskega proteina-1 (AP-1) in drugih transkripcijskih dejavnikov [11].

1.3 Klinična slika, diagnoza in zdravljenje

Simptomi in znaki astme so raznoliki, obdobja brez težav se menjujejo z obdobji, ko se pojavijo astmatični simptomi. Ti se kažejo kot nočni kašelj ali nočna dušenja, dispneja, piskanje ali stiskanje v prsnem košu (prisotnost visokofrekvenčnih monofoničnih piskov). Bolnik sope, ima plitek vdih, občutek stisnjenosti v prsih in možno kašlja ob stiku z alergeni, mrzlim zrakom, po telesnem naporu ali ob intenzivnem čustvovanju.

Diagnoza astme se postavi na podlagi anamneze, telesnega pregleda in funkcijskih preiskav. V slednje uvrščamo preiskavo pljučne funkcije, kamor spadajo meritve največjega pretoka zraka med izdihom (PEF), prostornino izdihanega zraka v 1. sekundi (FEV1) in deležem vitalne kapacitete, ki ga izdihnemo v 1. s, poznan kot - Tiffenau indeks. Za klinično potrditev bronhospazma je potrebna meritev odgovora na bronhodilatator ali z bronhialnim provokacijski testom z metaholinom. V okviru funkcijskih preiskav se opravijo tudi krvne preiskave in testi alergije.

Cilj zdravljenja je urejena astma, torej popoln nadzor oziroma stabilizacija bolezni. To pomeni stanje brez simptomov bolezni, bolnik ima normalno pljučno funkcijo in je brez omejitev osebnih dejavnosti. Za zdravljenje astme uporabljamo olajševalna zdravila, ki delujejo na gladke mišice in širijo bronhije ter preprečevalna zdravila, ki s protivnetnim delovanjem zmanjšujejo pretirano bronhialno vzdražljivost. Kot olajševalci se uporabljajo beta 2 agonisti in antiholinergiki, kot protivnetna zdravila pa uporabljamo inhalacijske kortikosteroide in inhibitorje cisteinil-levkotrienske poti. Za zdravljenje težke alergijske astme se uporabljajo rekombinantna humanizirana monoklonska protitelesa razreda IgG (Omalizumab), ki se vežejo na Fc regijo prostih imunoglobulinov IgE in tako preprečijo njihovo vezavo na celice. [3,12,13]

2 Endokanabinoidni sistem in kanabinoidi

Izolacija glavne psihotropne učinkovine konoplje Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC) leta 1964 velja za začetek modernega farmakološkega pristopa h kanabinoidom. Odkritje endokanabinoidnega sistema in spoznanja o njegovi vlogi pri različnih fizioloških dogajanjih v organizmu (metabolizem [14], kardiovaskularni [15], endokrini [16], dihalni [17] in imunski [18] sistem) je sprožilo mnogo raziskav o delovanju kanabinoidov in njihovih terapevtskih učinkih. Z njimi že lahko zdravimo slabost, spodbudimo apetit, blažimo nevropatsko bolečino in spastičnost pri multipli sklerozi ter blažimo bolečino pri bolnikih z rakom [19]. Mnogo študij je pokazalo, da kanabinoidi uravnavajo protivnetni odgovor imunskega sistema pri različnih boleznih, kot so multipla skleroza, septični šok, revmatoidni artritis in alergijska astma [20-23]. Naše raziskave v tem diplomskem delu pa so bile usmerjene v preverjanje potencialne terapevtske uporabnosti nekaterih sintetičnih kanabinoidov pri bolnikih z astmo.

2.1 Endokanabinoidni sistem

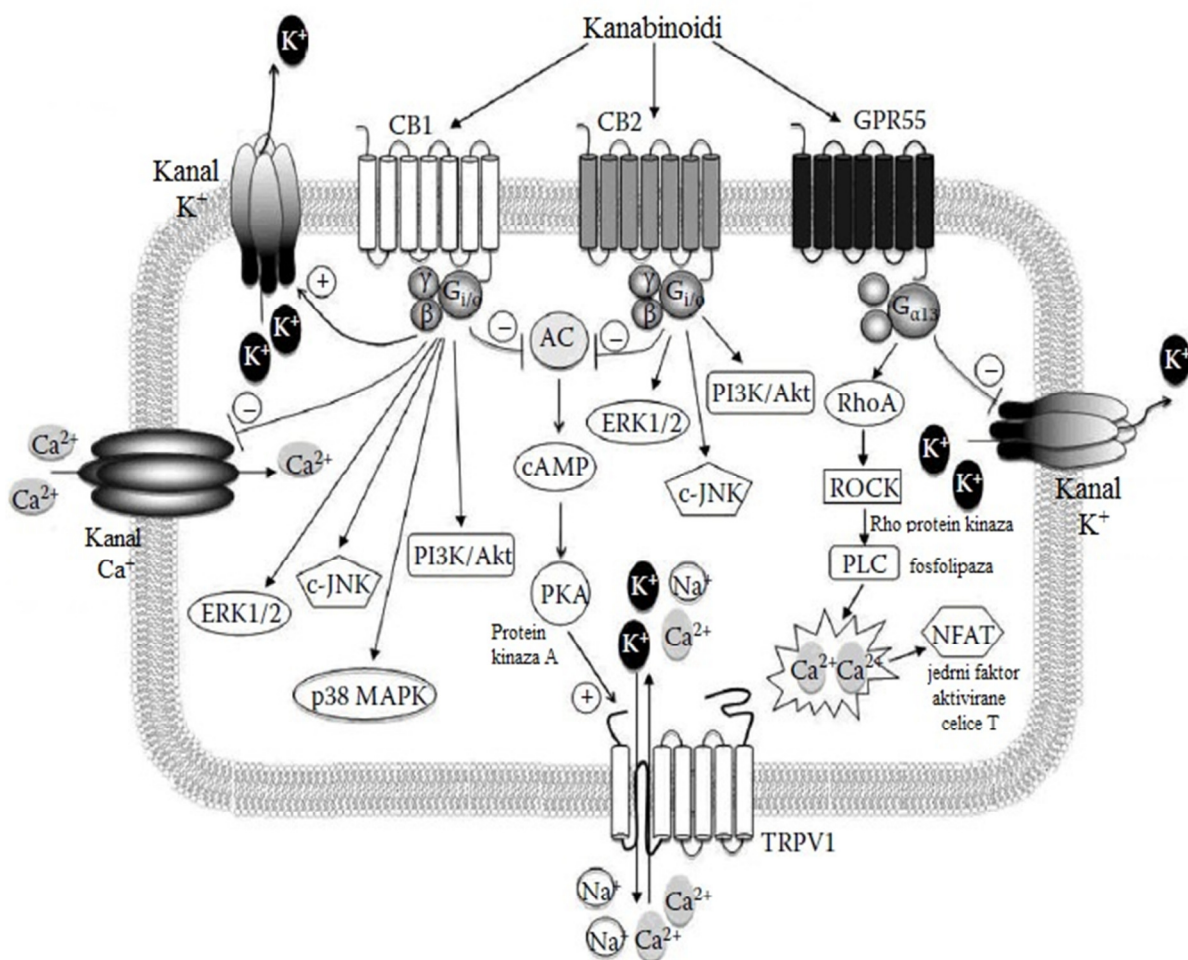
Koncept endokanabinoidnega sistema predstavljajo kanabinoidni receptorji, endokanabinoidi ter encimi, ki sodelujejo pri procesu sinteze, privzema in razgradnje kanabinoidov. Endokanabinoidi so endogeni ligandi kanabinoidnih receptorjev, ki so kot neuro- in imunomodulatorji vpleteni v različne fiziološke procese (nastajanje bolečine, kognitivni procesi, motorična aktivnost, endokrine funkcije, vnetje, imunski sistem, ipd.) [24,25]. Kemijsko so lahko amidi, estri ali etri, z dolgimi nenasičenimi maščobnimi kislinami, sintetizirani iz arahidonske kisline [26]. Zaradi hidrofobnih molekul delujejo lokalno in povzročajo biološki učinek v bližini mesta sinteze. Poznanih je več predstavnikov, najbolj preučena pa sta arahidoniletanolamid (anandamid, AEA) in 2-arahidonilglicerol (2-AG) [27].

Sinteza endokanabinoidov poteka po več poteh z različnimi encimi (fosfolipaza D, fosfolipaza C, α,β -hidrolaza 4, različne fosfataze) v trenutku ustreznega fiziološkega dražljaja. Ena izmed poti sinteze AEA je iz N-arahidonilfosfatidil etanolamina, ki ga fosfolipaza D katalizira v AEA [28]. Iz celice se izločijo pod vplivom toka kalcijevih ionov [29]. Tudi razgradnja endokanabinoidov poteka po več poteh. Najprej poteka endokanabinoidni prenos preko plazemske membrane v celico, kjer je hidroliziran s specifičnim encimom (npr. razgradnja AEA s hidrolazo amidov maščobnih kislin (FAAH), razgradnja 2-AG s ciklooksigenazo 2 (COX2)) [30].

Tako endokanabinoidi, kot njihovi rastlinski in sintetični analogi učinkujejo preko vezave na kanabinoidna receptorja CB1 in CB2. Ta spadata med visokoafinitetne 7-transmembranske z G-proteini sklopljene receptorje. Aktivirana receptorja signalizirata preko inhibitornih proteinov G_i in G_o , kar povzroči različne znotrajcelične procese: inhibicijo adenilat-ciklaze (AC) in posledično znižanje koncentracije cikličnega adenozin monofosfata (cAMP), aktivacijo od zunajceličnega signala odvisne kinaze (ERK), aktivacijo c-Jun N-terminalnih kinaz (JNK) in p38 z mitogeni aktiviranih protein-kinaz (p38 MAPK, protein velikosti 38 kDa), ki so povezani predvsem z rastjo, diferenciacijo in kontrolo apoptoze celic, aktivacijo fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K), razgradnjo sfingomieline ter z nastankom ceramidov (Slika 2-1). Aktivacija CB1 stimulira difuzijo K^+ ionov in inhibira difuzijo Ca^{2+} ionov, (oba

pomembna sekundarna obveščevalca v celici) skozi kalijeve in kalcijeve kanale v celični membrani.[31]

Kanabinoidi lahko učinkujejo tudi na vaniloidni receptor 1 (TRVP1), ki je ionski kanal za prenos kationov in na z G-proteini sklopljen receptor 55 (GPR55).[32]



Slika 2-1: Shematski prikaz aktivacije kanabinoidnih receptorjev CB1, CB2, GPR55 in TRPV1 s kanabinoidi (4). Aktivacija receptorjev povzroči različne znotrajcelične procese preko celičnih obveščevalcev: adenilat-ciklaza (AC); ciklični adenozin monofosfat (cAMP); z mitogeni aktivirane protein-kinaze ERK, JNK in p38; jedrni faktor aktiviranih T celic (NFAT); fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K), protein kinaza A (PKA); fosfolipaze C (PLC); Rho protein kinaza (ROCK).

Gena, ki kodirata najpomembnejša kanabinoidna receptorja sta *CNR1* in *CNR2* [33]. Receptorji CB1 so prisotni predvsem v centralnem živčnem sistemu (bazalni gangliji, cerebellum, korteks, hipokampus, amigdala, talamus, hipotalamus) pa tudi v perifernih tkivih (testisi, žilni endotelij, vranica, periferni živci, jetra, nadledvična žleza, srce, pljuča, prostata) [26,34]. Receptorji CB2, ki imajo le 44 % homologijo v zaporedju aminokislin s CB1 [35], so izraženi predvsem v perifernih tkivih, vključno s celicami imunskega sistema [36]. Najdena je bila tudi izraženos CB1 na B in T celicah ter monocitih, vendar so CB2 v primerjavi s CB1 bolj izraženi na imunskih celicah, zato pomembno vplivajo na delovanje imunskega sistema in vnetne procese [37,38].

2.2 Agonisti in antagonisti endokanabinoidnih receptorjev

Kanabinoidi so v splošnem snovi, ki so po strukturi in/ali farmakoloških lastnosti podobni THC. Glede na njihovo strukturo jih lahko razdelimo v klasične kanabinoide (analoge THC), neklasične kanabinoide (biciklični in triciklični analogi THC), aminoalkilindole (sintetični kanabinoidi) in derivate arahidonske kisline (endokanabinoide). [39]

V diplomskem delu smo ugotavljali učinek kanabinoidov arahidonil-2-kloroetilamida (ACEA) in AM251. ACEA je sintetični agonist kanabinoidnega receptorja CB1, ki se v glavnem veže na CB1 in ima nizko afiniteto do receptorja CB2 [40]. AM251 je sintetični antagonist receptorja CB1. Njegova K_i (inhibitorna konstanta) vrednost za CB1 je 7,49 nM, kar pomeni 306-krat večjo selektivnost v primerjavi s CB2 [41,42].

2.3 Kanabinoidi in imunski sistem

Številne študije usmerjene v iskanje terapevtske uporabe kanabinoidov so pokazale, da le-ti lahko vplivajo na apetit [43], regulacijo sladkorja v krvi [44], bolečino [45], mišično šibkost [46], termoregulacijo [47], tumorigenezo [48] in spomin [49]. Različne aplikacije s kanabinoidi pa so pokazale tudi njihov potencial pri ponovni vzpostavitvi ravnovesja imunskega sistema. Imunomodularni učinki kanabinoidov še niso povsem pojasnjeni, je pa znano, da lahko nekateri zmanjšajo pretiran imunski odziv pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi (multipla sklerozna, artritis, lupus, encefalomyelitis, Parkinsonova bolezen) in igrajo pomembno vlogo pri nevrogeni in pri nevrodegeneraciji [50].

Novejše študije intenzivno proučujejo učinke kanabinoidov na funkcijo imunskih celic (T in B limfociti, makrofagi, naravne celice ubijalke) z uporabo živalskih modelov in kultiviranjem celic. Kanabinoidne imunosupresorske lastnosti se kažejo predvsem kot uravnavanje tvorbe citokinov in kemokinov, inhibicija proliferacije celic, indukcija apoptoze celic in aktivacija regulatornih T celic [51-54]. Kanabinoidi pravtako regulirajo produkcijo sintaze dušikovega oksida, dušikovega oksida in reaktivnih kisikovih spojin v imunskih celicah, ki igrajo pomembno vlogo pri celičnem signaliziranju in služijo kot obrambni mehanizem proti različnim antigenom [55].

Odkrili so sposobnost kanabinoidov uravnavanja imunskega odziva z učinkom na sproščanje hormonov. Študija s THC je pokazala povišano stopnjo adrenokortikotropnega hormona in kortikosterona, ki sta odgovorna za zmanjšano sproščanje imunoregulatornih molekul, kot sta kortizol in spolni hormon ter inhibicijo imunskega odziva. [56]

Kanabinoidi uravnavajo izražanje različnih citokinov z učinkom na imunske celice, tudi Th limfocite. Vendar se je v mnogih študijah učinek na Th1/Th2 produkcijo specifičnih citokinov velikokrat izkazal kot kontradiktoren, odvisen od koncentracije komponent in/ali izbranega modela. [57]

Raziskana je bila vloga kanabinoidov pri alergijsko induciranem vnetju dihalnih poti pri živalskih modelih. Tretiranje s kanabinolom (CBN) in THC je znižalo ekspresijo mRNA *IL2*, *IL4*, *IL5* in *IL13* ter signifikantno oslabilo izločanje IgE in prekomerno produkcijo sluzi v pljučih [58]. Podobno je študija aplikacije THC pokazala bronhodilatatorni učinek pri astmatičnih pacientih [59].

Za AEA, ki je sintetiziran v pljučnem tkivu [60], so ugotovili, da učinkuje na vnetne procese preko od CB1/CB2 receptorjev-neodvisnih mehanizmov. Ta inhibira TNF z direktno inhibicijo inhibitorja NF- κ B (I κ B) [61]. Študija, ki se je ukvarjala s pacienti z blago alergijsko astmo je s 24 h spremljanjem izpostavljenosti alergenom pokazala štirikrat povišano produkcijo AEA v bronhoalveolarnih tekočinah [62].

Tretiranje aktiviranih človeških T celic s kanabinoidi je pokazalo, da le-ti inhibirajo izzvano signaliziranje preko T celičnih receptorjev, kot je aktivacija T limfocitov, MAPK, indukcija IL2 in proliferacija T celic, in sicer v smislu odvisnosti od CB1/CB2 in regulacije s cAMP aktivirano protein kinazo A (PKA) [63]. Kanabinoidi preko aktivacije CB1 inhibirajo tudi ekspresijo prenašalca signala IL12 kompleksa (IL-12R β 2), ki je odgovoren za razvoj Th1 celic [64].

Skratka, učinki kanabinoidov na imunski sistem so kompleksni in vedno več raziskav potrjuje, da je endokanabinoidni sistem lahko potencialna tarča za zdravljenje astme.

3 Eksperimentalni del

Eksperimentalni del diplomskega dela se je izvajal v laboratorijih Centra za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete Univerze v Mariboru. V laboratoriju smo izvedli naslednje eksperimentalne postopke: izolacija mononuklearnih levkocitov iz vzorcev periferne krvi astmatičnih in zdravih posameznikov, gojenje izoliranih celic v celičnih kulturah, tretiranje celičnih kultur s sintetičnimi kanabinoidi, merjenje ekspresije genov z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR), analiza proteinov s prenosom po westernu ter analiza morfologije in viabilnosti celic s pretočno citometrijo in mikroskopijo.

3.1 Laboratorijska oprema in materiali

3.1.1 Mononuklearni levkociti iz periferne krvi (PBMC)

V raziskavi smo gojili primarne celične kulture mononuklearnih levkocitov (PBMC) izoliranih iz periferne krvi astmatičnih in zdravih posameznikov. Bolnikom z astmo so bili vzorci krvi odvzeti v Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Maribor tekom njihovega ambulantnega zdravljenja ob predhodnem soglasju njihovih staršev, oz. zakonitih zastopnikov. Vse nadaljnje delo s krvnimi vzorci je potekalo v laboratorijih Centra za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete Univerze v Mariboru. V raziskavo smo vključili dva vzorca krvi otrok obolelih za astmo, pri katerih je bila bolezen na novo diagnosticirana in še nista prejela nobene za astmo predpisane terapije.

3.1.2 Kemikalije in reagenti

Tabela 3-1: Seznam kemikalij in reagentov za gojenje PBMC ter izolacijo RNA in proteinov.

Kemikalija oz. reagent	Proizvajalec (država)
EDTA	Sigma-Aldrich (Nemčija)
PBS	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Lympholyte	Cedarlane (Kanada)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco by Life Technologies (ZDA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco by Life Technologies (ZDA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco by Life Technologies (ZDA)
TNF- α	Gibco by Life Technologies (ZDA)
ACEA	Abcam (Združeno kraljestvo)
AM251	Abcam (Združeno kraljestvo)
Streptomycin	Gibco by Life Technologies (ZDA)
L-glutamin	Gibco by Life Technologies (ZDA)
TRIZol® REAGENT	Ambion life Technologies (ZDA)
Etanol absolutni	Merck (Nemčija)
Natrijev citrat	Merck (Nemčija)
Kloroform	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Izopropanol	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Gvanidinijev hidroklorid v etanolu	Sigma-Aldrich (Nemčija)
RNase free water	Roche (Nemčija)

Tabela 3-2: Kemikalije in reagenti za izvedbo PCR reakcije, prenosa western in pretočne citometrije.

Kemikalija oz. reagent	Proizvajalec (država)
Agaroz	Sigma-Aldrich (Nemčija)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	AB Applied Biosystems (ZDA)
LightCycler® 480 SYBR Green Master mix	Roche (Nemčija)
SDS	Merck (Nemčija)
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%	BIO-RAD (ZDA)
Amonijev persulfat (APS)	BIO-RAD (ZDA)
TEMED	BIO-RAD (ZDA)
Tris	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Glicin	Sigma-Aldrich (Nemčija)
2-merkaptetanol	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Bromofenol modro	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Goveji fetusni albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Nemčija)
Ditiotreitol (DTT)	Invitrogen (ZDA)
Anti-beta Actin antibody (ab8227)	Abcam (Združeno kraljestvo)
Anti-Cannabinoid Receptor I antibody	Abcam (Združeno kraljestvo)
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed	Abcam (Združeno kraljestvo)
Speed Bead® 400041	Amnis (Nemčija)

3.1.3 Raztopine in pufri

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

DMEM za gojenje PBMC smo pripravili z dodatkom 5% FBS, 0,5% streptomicina in penicilina ter 2% L-glutamina.

TBE (1×)

Za pripravo 10× koncentriran elektroforetski pufer smo zatehtali 108 g Tris baze, 55 g borove kisline, 7,44 g EDTA in dopolnili z ddH₂O do 1 L. Za agarozno elektroforezo smo ta pufer redčili z ddH₂O v razmerju 1 : 9.

PBS pufer

PBS pufer smo pripravili z raztapljanjem ene tablete PBS v 200 mL ddH₂O.

Koncentriran elektroforetski pufer

Za pripravo 5× koncentriran elektroforetski pufer smo zatehtali 7,6 g Tris baze, 36 g glicina, 2,5 g SDS in dopolnili z ddH₂O do 500 mL. Za poliakrilamidno elektroforezo smo ta pufer redčili z ddH₂O v razmerju 1 : 4.

Tris-HCl

0,5 M Tris-HCl s pH 6,8 smo pripravili tako, da smo najprej 12,1 g Tris raztopili v 150 mL ddH₂O in potem titrirali s HCl do pH 6,8 ter dopolnili z ddH₂O do 200 mL. Za pripravo 10% SDS smo zatehtali 1 g SDS in dopolnili z ddH₂O do 10 mL.

Priprava gela za SDS-PAGE

Za pripravo ločevalnega in zbiralnega gela smo sledili navodilom TGX Stain-Free FastCast proizvajalca BIO-RAD. Ločevalno raztopino smo za dva gela pripravili tako, da smo zmešali 6 mL raztopine Resolver A, 6 mL raztopine Resolver B, 60 µL 10% APS in 6 µL TEMED. Za zbiralno raztopino smo za dva gela zmešali 2 mL raztopine Stacker A, 2 mL raztopine Stacker B, 20 µL 10% APS in 4 µL TEMED. 10% razopino APS smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,1 g APS in dopolnili z ddH₂O do 1 mL. V kaseto smo najprej nalili raztopino

ločevalnega gela. Na to smo potem previdno nalili raztopino zbiralnega gela. Pri tem smo morali paziti, da ni prišlo do mešanja gelov in do nastanka zračnih mehurčkov. Vstavili smo še glavniček in pustili polimerizirati 30-45 min.

TBST pufer

Najprej smo pripravili 1 L 10× TBS in sicer smo zatehtali 24,23 g Tris, 80,06 g NaCl, dopolnili z 800 mL ddH₂O in titrirali s HCl do pH 7,6 ter dopolnili z ddH₂O do 1000 mL. TBST smo pripravili tako, da smo zmešali 100 mL TBS (10X) in 1 mL Tween20 ter dopolnili ddH₂O do 1 L.

Raztopina govejega fetusnega albumina (BSA)

5% raztopine BSA smo pripravili z zatehtanjem 5 g BSA in dopolnitvijo do 100 mL TBST.

Fiksirna raztopina ter raztopini za barvanje in razbarvanje gela

Pripravili smo fiksirno raztopino (50% metanol, 10% očetna kislina, ddH₂O), raztopino za barvanje gelov (0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% očetna kislina ddH₂O) in raztopino za razbarvanje gelov (40% metanol, 10% očetna kislina, ddH₂O).

3.1.4 Začetni oligonukleotidi

Tabela 3-3: Nukleotidno zaporedje in proizvajalec začetnih oligonukleotidov.

Gen	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Proizvajalec (država)
<i>CNR1</i>	GCTCTCGAGATACCCAAGCA GCCTTAGAGCGTGAACCGTA	IDT (ZDA)
<i>CNR2</i>	GGGAGAGGACAGAAAACAACCTG GAGCTTGTCTAGAAGGCTTTGG	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>IL4</i>	CTTTGTCAGCATTGCATCGT GATTTGCAGTGACAATGTGAGG	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>IL5</i>	CACTGAAGAAATCTTTCAGGGAAT CCGTCTTTCTTCTCCACACTTT	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>IL6</i>	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA CTGCAGCCACTGGTTCTGT	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>IL8</i>	GAGCACTCCATAAGGCACAAA ATGGTTCCTTCCGGTGGT	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>IL10</i>	GATGCCTTCAGCAGAGTGAA GCAACCCAGGTAACCCTTAAA	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>CSF2</i>	TCTCAGAAATGTTTGACCTCCA GCCCTTGAGCTTGGTGAG	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAAGATGGTGATGGGATTTC	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>ACTB</i>	CATCGAGCACGGCATCGTCA TAGCACAGCCTGGATAGCAAC	Sigma-Aldrich (Nemčija)
<i>B2M</i>	TTCTGGCCTGGAGGCTATC TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC	Sigma-Aldrich (Nemčija)

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

3.1.5 Laboratorijska oprema

Tabela 3-4: Seznam uporabljene laboratorijske opreme in njihov proizvajalec.

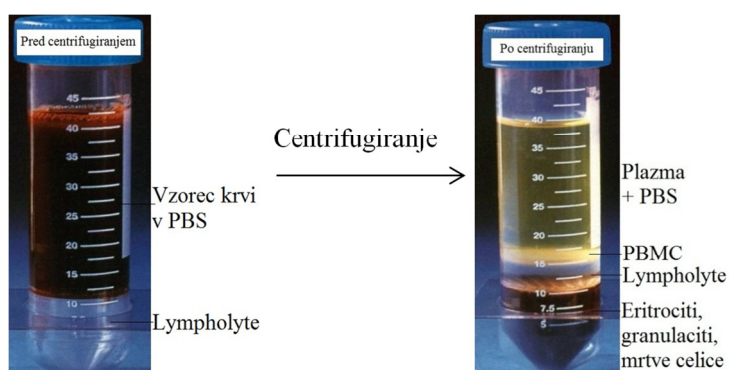
Oprema	Proizvajalec (država)
vodna kopel	Kambič laboratorijska oprema (Slovenija)
laminarij	Thermo Fisher Scientific (ZDA)
mikroskop	ZEISS (Nemčija)
PCR-termostat	Biometra (Nemčija)
Roche LightCycler® 480	Roche Applied Science (Nemčija)
QuantStudio™ 12K Flex	Applied Biosystems (ZDA)
Inkubator sesalskih celičnih kultur	Panasonic (Japonska)
Centrifuga LMC3000	Biosan (ZDA)
Centrifugi Sarstedt	Sarstedt (Nemčija)
Vorteks Vibromix 10	Tehtnica Železniki (Slovenija)
Elektronska pipeta Matrix Impact 2	Thermo Fisher Scientific (ZDA)
Elektronska pipeta Integra pipeteboy	Integra biosciences AG (Švica)
Mikropipete FINEPIPETE 10 uL, 100 uL, 200 uL, 1000 uL	Thermo Fisher Scientific (ZDA)
TKA Pacific UP-UPW sistem za čiščenje vode	ELGA (Združeno kraljestvo)
Termo-stresalnik	VWR (ZDA)
Elektroforezne celice	Biometra (Nemčija)
iBlot Dry Blotting System	Invitrogen (ZDA)
BenchPro 4100 Card Procession Station	Invitrogen (ZDA)
Syngene G:BOX	Syngene (ZDA)

3.2 Metode dela

3.2.1 Izolacija mononuklearnih levkocitov iz periferne krvi

Iz skupine astmatičnih ali zdravih posameznikov smo pridobili 12 mL venske krvi, ki je bila odvzeta v epruveto z EDTA (standardne vijolične epruvete za odvzem krvi). Pripravili smo 12 mL PBS v 50 mL sterilni falkonki in dodali enako količino vzorca krvi ter premešali s pipetiranjem.

V novo sterilno 50 mL falkonko smo odpipetirali 12 mL Lympholyte. Na Lympholyte smo nanесли celotno mešanico krvi in PBS. Suspenzijo smo nanašali počasi in previdno s pipeto ob steni in pazili, da se ni premešala s Lympholyte (Slika 3-1).



Slika 3-1: Razporeditev faz pred in po centrifugiranju (5).

Sledilo je 30 min centrifugiranje pri 400 rpm na 4°C. Med centrifugiranjem je prišlo do razporeditve faz kot prikazuje Slika 3-1. Vmesno belo fazo s PBMC smo prenesli v novo sterilno falkonko, dodali 15 mL PBS-ja in centrifugirali 10 min pri 400 rpm. Supernatant smo zavrgli in še enkrat ponovili postopek spiranja s PBS.

Celice smo nato resuspendirali v 1800 μ L PBS z 10% FBS in po kapljicah dodali 200 μ L DMSO, ki je imel vlogo krioprotektanta. Suspenzijo celic smo odpipetirali v dve 2 mL krioviali, in sicer v vsako po 1 mL. Krioviali smo postavili v zamrzovalno posodo -Mr. Frosty in shranili v zamrzovalnik na -80°C.

3.2.2 Gojenje izoliranih celičnih kultur

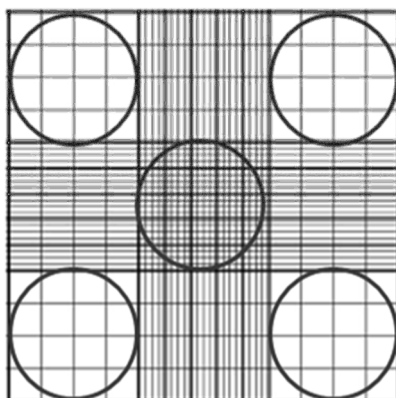
Pripravo in gojenje PBMC smo izvajali v ustreznem laboratoriju za celične kulture. Za zagotavljanje čistega delovnega okolja smo za pripravo PBMC pred gojenjem uporabljali laminarij, vse delovne površine pa smo razkužili s 70% etanolom. Celice smo gojili v inkubatorju na 37°C in v atmosferi s 5% CO₂.

3.2.2.1 Priprava celic pred gojenjem

Zamrznjeni krioviali s suspenzijo PBMC smo vzeli iz zamrzovalne posode in odtalili v vodni kopeli s 37°C (približno 2 min odtajanje s sprotnim mešanjem). Suspenzijo smo prenesli v 30 mL na 37°C ogreto raztopino DMEM in centrifugirali 10 min pri 2.000 rpm. Medij smo nato odsesali s črpalko, celice pa resuspendirali v 1 mL raztopine DMEM. Za pripravo ugodne koncentracije PBMC za gojenje, ki je 10⁶ celic/mL, smo celice prešteli na hemocitometru z mikroskopom. Na podlagi tega smo izračunali celotno število celic v 1 mL in suspenzijo redčili z DMEM do ustrezne koncentracije za gojenje.

3.2.2.2 Štetje celic na hemocitometru

K 50 μ L suspenzije celic smo dodali 100 μ L komercialne raztopine 0,4% Trypan Blue. To smo nanесли na objektno stekelce hemocitometra, predhodno pokrito s krovnim stekelcem. Objektno stekelce hemocitometra je sestavljeno iz dveh mrežnih kvadratov, ki sta razdeljeni na devet manjših kvadratkov. Hemocitometer smo postavili na mikroskop in celice prešteli v kvadratih, označenih na Sliki 3-2.



Slika 3-2: Struktura območja za štetje celic na hemocitometru.

Koncentracijo celic smo izračunali na podlagi enačbe:

$$\frac{\text{celice}}{\text{mL}} = \frac{\sum \text{celic v vseh kvadratih} \cdot \text{faktor redčenja}}{0,0025(\text{števena površina}) \cdot 5(\text{št. števnih kvadratov}) \cdot 0,1}$$

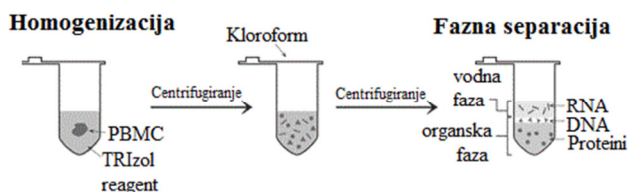
3.2.2.3 Priprava ploščic za gojenje PBMC in njihova inkubacija

Sledila je priprava ploščic s 24 jamicami, kjer smo v vsako jamico ploščice odpipetirali 0,5 mL suspenzije celic. Pred inkubacijo celic z ustrezno bioaktivno snovjo smo počakali 18-24 h, da so se celice aklimatizirale. Nato smo dodali 0,5 mL raztopine DMEM z dodatkom ustrezne količine bioaktivne snovi (TNF, sintetični kanabinoidi) in celice inkubirali ustrezno dolgo, odvisno od aplikacije našega poskusa.

3.2.3 Izolacija RNA in proteinov

Po končanem gojenju smo medij s celicami prenesli iz jamic ploščice v 1,5 mL tubice in centrifugirali 5 min pri 10.000 rpm na 4°C. Nastala je vidna usedlina. Medij smo nato previdno z ozirom na usedlino odpipetirali v nove 1,5 mL tubice in jih shranili na -80°C. V jamice ploščice, kjer so ostale celice, pritrjene na dno (pretežno monociti), smo dodali 250 μ L TRIzol reagenta in celice sprali s podlage s pipetiranjem. Resuspendirane celice v TRIzol reagentu smo iz jamic prenesli v tubice z usedlino. Te smo shranili na -20°C do postopka izolacije RNA in proteinov.

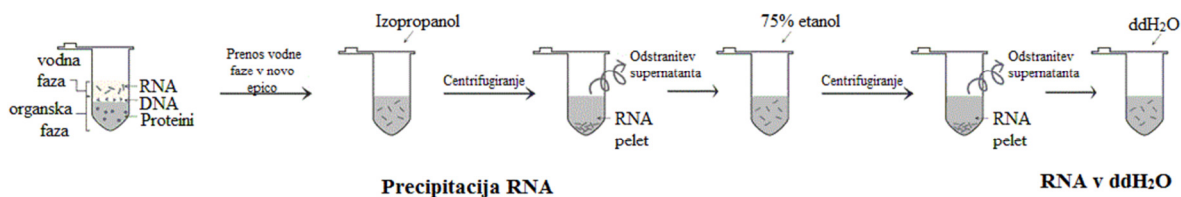
Da bi zagotovili celotno disociacijo nukleoproteinskega kompleksa, smo vzorce pustili 5 min na sobni temperaturi. Dodali smo 50 μ L koroforma in močno stresli ter pustili vzorce še 2-3 min na sobni temperaturi. Mešanico smo centrifugirali 15 min pri 12.000 rcf na 2-8°C, da se je ločila v tri faze: spodnja rdeča (proteini), vmesna bela (DNA), ter zgornja prozorna raztopina (RNA) (Slika 3-3).



Slika 3-3: Fazna separacija makromolekul iz liziranih celic (6).

3.2.3.1 Izolacija RNA

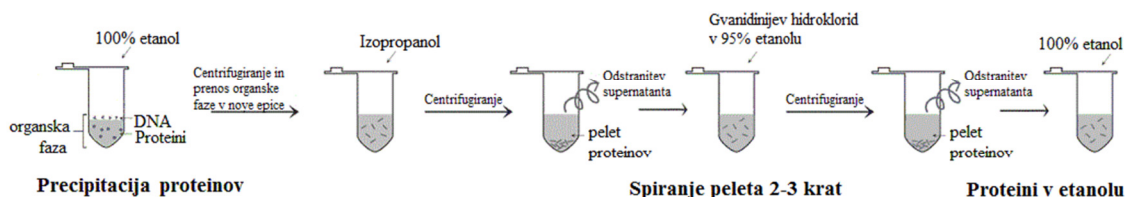
Vodno fazo smo prenesli v novo 1,5 mL tubico, dodali 125 μ L izopropanola, premešali z obračanjem in pustili, da se je 20 min inkubirala na sobni temperaturi. Le to smo potem centrifugirali 10 min pri 12.000 rcf na 2-8°C. RNA je med centrifugiranjem oblikovala usedlino ob strani in na dnu tubice. Odstranili smo supernatant in sprali RNA usedlino z dodatkom 1 mL 75% etanola. Vzorce smo vorteksirali in centrifugirali 5 min pri 12.000 rcf na 2-8°C. Nato smo spet zavrgli supernatant in RNA usedline posušili na zraku za 5-10 minut. K usedlinam smo dodali 17 ali 22 μ L ddH₂O (odvisno od pričakovane količine izolirane RNA), vorteksirali in inkubirali še 5-10 min na sobni temperaturi. Vzorcem smo izmerili koncentracijo za nadaljni postopek izvedbe reverzne transkripcije (Slika 3-4).



Slika 3-4: Shematski potek izolacije RNA (6).

3.2.3.2 Izolacija proteinov

Za precipitacijo DNA iz vmesne in organske faze smo dodali 75 μ L 100% etanola, premešali z obračanjem in vzorce inkubirali še 2-3 min na sobni temperaturi. Te smo nato centrifugirali 5 min pri 2.000 rcf na 2-8°C. Po centrifugiranju smo supernatant odlili v nove 1,5 mL tubice in nadaljevali z izolacijo proteinov. Proteine smo precipitirali z dodatkom 375 μ L izopropanola, pustili 10 min na sobni temperaturi in jih nato centrifugirali 10 min pri 12.000 rcf na 2-8°C. Nastala je vidna usedlina. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa 2-3 krat sprali z 500 μ L 0,3 M gvanidinijevega hidroklorida v 95% etanolu. Med vsakim spiranjem smo vzorce inkubirali 20 min na sobni temperaturi in centrifugirali 5 min pri 7.500 rcf na 2-8°C. Po končanem spiranju smo dodali 1 mL 100% etanola, vorteksirali in vzorce inkubirali še 20 min na sobni temperaturi. Te smo nato centrifugirali 5 min pri 7.500 rcf na 2-8°C. Suspendirane proteine v 100% etanolu smo shranili na -80°C do nadaljnega postopka izvedbe prenosa western (Slika 3-5).

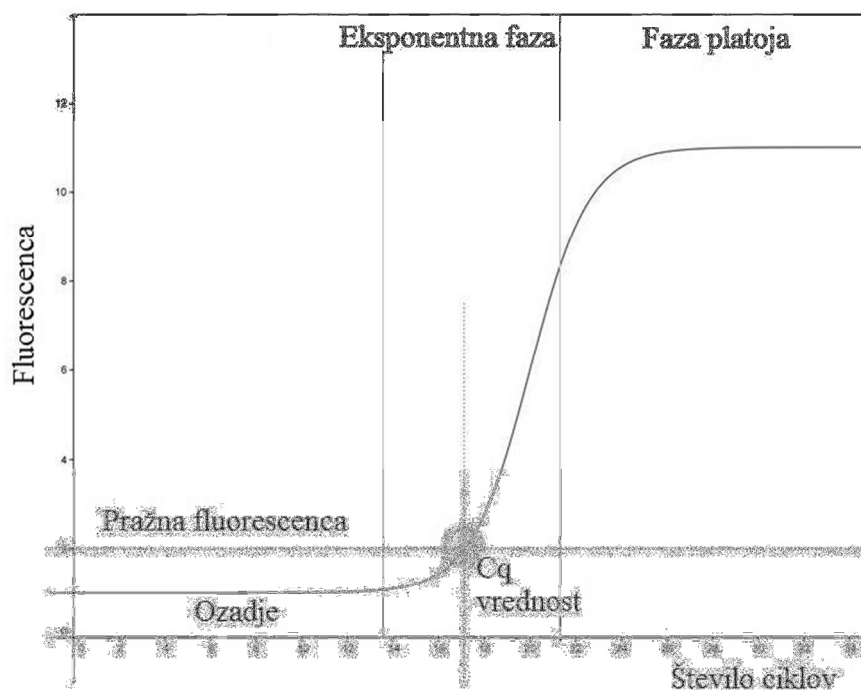


Slika 3-5: Izolacija proteinov (6).

3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR je metoda za *in vitro* sintezo DNA, pri kateri v natančno uravnanih termostatih v reakcijski zmesi s termostabilno DNA-polimerazo pomnožimo tarčni odsek DNA. Potek reakcije je ciklični. Vsak cikel predstavljajo tri stopnje z inkubacijo pri treh različnih temperaturah: denaturacija DNA, nalaganje začetnih oligonukleotidov in izgrajevanje komplementarne verige. Pri diplomskem delu smo uporabljali konvencionalno metodo PCR, in sicer za optimizacijo temperature PCR reakcije in za prepis RNA v cDNA (ti. reverzna transkripcija). Za optimizacijo koncentracije začetnih oligonukleotidov in za kvantitativno določitev RNA v začetnem vrcu smo uporabljali novejšo tehniko, kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR).

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času omogoča kvalitativno analizo in merjenje količine produkta v vsakem ciklu med reakcijo. Pomnoževanje in detekcija potekata sočasno in temeljita na merjenju fluorescence. V reakcijo zato vključimo tudi fluorescentne molekule (barvila, sonde), ki se specifično vežejo na komplementarno molekulo DNA in fluorescirajo samo ko so vezane na dvoverižno DNA. Potek reakcije je prikazan na Sliki 3-6. Abscisa predstavlja število ciklov, ordinata pa jakost fluorescence, ki jo oddaja nastajajoči produkt in je sorazmerna s količino produkta. Količina produkta najprej raste eksponentno, ki se v zadnji fazi prevesi v fazo platoja.



Slika 3-6: Graf reakcije pri qPCR (7).

Metoda qPCR omogoča merjenje nastalega produkta v eksponentni fazi PCR reakcije. V tej fazi prav tako določimo prazno fluorescenco, ki predstavlja odziv, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Cikel, v katerem vzorec preide to mejo, imenujemo cikel kvantifikacije (Cq). [65]

3.2.4.1 Optimizacija temperature in koncentracije začetnih oligonukleotidov *IL6*, *IL10* in *CSF2*

Za učinkovit in zadovoljiv potek PCR je bilo potrebno poiskati najustreznejše temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov. V ta namen smo naredili reakcijsko mešanico z zadostno količino začetnih oligonukleotidov in to mešanico nanesti v osem 0,2 mL tubic s cDNA in v osem 0,2 mL tubic z vodo (negativna kontrola). Za vsako izmed osem ponovitev smo izvedli PCR pri različnih temperaturah pripenjanja začetnih oligonukleotidov v rangu 55-65°C.

Po končani PCR smo produkte analizirali z agarozno elektroforezo, s katero smo preverili pri kateri temperaturi nastanejo najintenzivnejši iskani produkti in nič oz. minimalno nespecifičnih produktov.

Agarozni gel smo pripravili tako, da smo zatehtali 1,6 g agaroze in jo raztopili v 80 mL 1×TBE pufra s pomočjo segrevanja v mikrovalovni pečici. Tej raztopini smo dodali 3 uL etidijevega bromida in vse skupaj vlili v nosilec s vstavljenim glavničkom ter počakali, da se je gel strdil (prib. 30 min). Strjenemu gelu smo odstranili glavniček in gel potopili v 1×TBE puffer v elektroforetski kadički. V žepke smo nanesti vzorce, ki smo jih predhodno pomešali s 5 uL barvila 0,25% ksilen-cianol. V en žepok pri vsaki ponovitvi smo nanesti tudi velikostni standard. Elektroforeza je tekla pri konstantni napetosti, prilagojeni posamezni elektroforezi (120-150V). Gele smo fotografirali z aparatom Syngene G:BOX.

Ker prevelika količina začetnih oligonukleotidov lahko privede do njihove nespecifične vezave na matrično DNA, premajhna pa ne zagotovi tvorbe iskanega produkta v zadostni količini, je bilo potrebno določiti tudi optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov. Pripravili smo različne koncentracije začetnih oligonukleotidov in vzorec cDNA redčili z ddH₂O v različnih razmerjih (1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:39, 1:79). Začetne oligonukleotide in cDNA pri različnih koncentracijah smo nanesti na ploščico in sicer v dveh ponovitvah začetni oligonukleotid iste koncentracije in cDNA. Tako pripravljeno ploščico smo analizirali s tehniko qPCR z uporabo Roche LightCycler.

3.2.4.2 Reverzna transkripcija

Iz PBMC izolirane molekule RNA smo z reverzno transkripcijo prepisali v molekule cDNA. Pri tem smo se ravnali po protokolu proizvajalca kompleta reagentov. Izhodna količina RNA za 20 uL reakcijo je bila 2 ug. Če je bila koncentracija RNA prenizka smo uporabili največji možen volumen RNA, tj. 14,2 µL. Pripravili smo osnovno mešanico, ki je za en vzorec vsebovala 2 uL 10× RT pufra, 0,8 uL dNTP, 2 uL začetnih oligonukleotidov in 1 uL reverzne transkriptaze. Program PCR reakcije je naveden v Tabeli 3-5.

Tabela 3-5: Program PCR reakcije za izvedbo reverzne transkripcije.

Čas [min]	10	120	5
T [°C]	25	37	85

3.2.4.3 Analiza ekspresije genov s qPCR

Za analizo genske ekspresije smo izvedli qPCR s pomočjo aparata Roche LightCycler® 480. Za izvedbo qPCR je bila uporabljena iz RNA molekul prepisana cDNA.

Tabela 3-6: Sestava reakcijske mešanice za analizo genske ekspresije *CNR2*, *CNR1*, *IL8*, *IL4*, *IL5*, *IL10*, *CSF2*, *IL6*, *ACTB*, *GAPDH*, *B2M*.

Komponenta	Volumen (uL)
cDNA	2
SYBR Green I Master	2,5
Začetni oligonukleotid 1	a
Začetni oligonukleotid 2	b
H ₂ O	c

Komponente, označene z a, b in c se spreminjajo glede na koncentracijo začetnih oligonukleotidov za optimalno izvedbo qPCR.

Z uporabo qPCR smo določili Cq vrednosti tarčnega in referenčnega gena. Vrednosti Cq tarčnih genov *CNR1*, *CNR2*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL8*, *IL10* in *CSF2* smo normalizirali na Cq vrednosti referenčnih genov *ACTB*, *B2M* in *GAPDH*, in sicer tako, da smo od Cq tarčnih genov odšteli geometrijsko sredino Cq vrednosti referenčnih genov. Relativno ekspresijo smo določili z metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [66] na podlagi enačb:

$$\Delta\Delta C_q = (C_{q,t.gen} - C_{q,geom.sr.ref.gen})_{vzorca} - \text{povprečje}(C_{q,t.gen} - C_{q,geom.sr.ref.gen})_{kontrola}$$

$C_{q,t.gen}$ – cikel kvantifikacije tarčnega gena

$C_{q,geom.sr.ref.gen}$ – geometrijska sredina ciklov kvantifikacije referenčnih genov

$2^{-\Delta\Delta q}$ = lineariziran nivo ekspresije

3.2.5 Prenos western

Iz gojenih PBMC izolirane proteine smo identificirali s prenosom western.

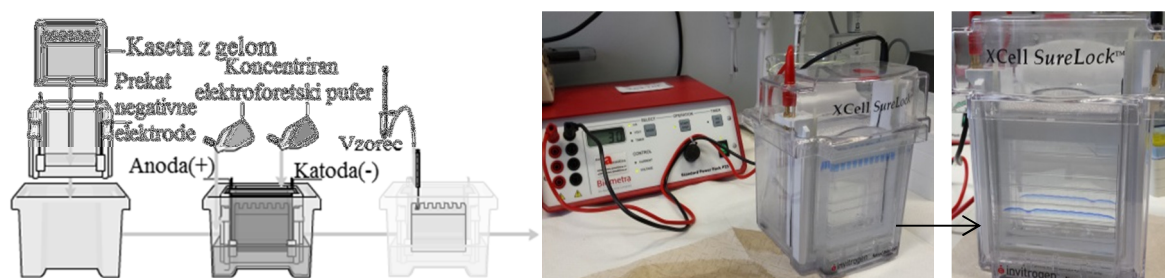
Prenos western je pogosta in uporabna metoda za detekcijo in analizo proteinov. Osnovna ideja vključuje poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodatkom natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE) in prenos po velikosti ločenih proteinov na nitrocelulozno membrano, saj protitelesa zaradi velike velikosti molekul težko difundirajo skozi poliakrilamidni gel. Na membrano vezane proteine specifično detektiramo s protitelesi. Nezasedena mesta na membrani nato blokiramo z inkubacijo v raztopini govejega albumina, nemastnega mleka v prahu ali kazeina. Ta korak je nujen, da preprečimo nespecifično vezavo protiteles. Sledi inkubacija v raztopini primarnih protiteles, ki se specifično vežejo na protein in inkubacija v raztopini sekundarnih protiteles, ki so usmerjena proti primarnim protitelesom. Sekundarna protitelesa so običajno označena z encimom, ki ob inkubaciji z ustreznim reagentom tvori zaznaven signal. [67]

3.2.5.1 Priprava vzorcev

Iz tubic s proteini v 100% etanolu smo odstranili etanol in proteine posušili na zraku (5-10 min). Usedlino smo resuspendirali v 50 uL 1% SDS. Da bi proteine popolnoma raztopili, smo jih pustili nekaj časa v stresalniku na 50°C. Tako pripravljenim proteinom smo izmerili koncentracijo (optimalna koncentracija naj bi bila 1000 ug/mL). Za nanos smo pripravili 24 uL vzorca z 18 uL raztopine proteinov in 6 uL Laemmli pufra (4x) ter vzorce inkubirali 15 min na 65°C.

3.2.5.2 SDS-PAGE

Kaseti z geloma smo vstavili v elektroforezno celico, dolili koncentriran elektroforetski puffer in dodali 500 uL antioksidanta 2-merkaptetoanola v zgornji prekat (Slika 3-7). V vsako jamico gela smo nanесли 24 uL vzorca pripravljenih proteinov. V eno izmed jamic smo nanесли tudi velikostni standard. Začetna električna napetost elektroforeze je bila najprej 60 V, ko pa je elektroforetska fronta dosegla ločevalni gel, smo jo povečali na 120 V. Elektroforeza je bila končana, ko je elektroforetska fronta z barvilom dosegla dno gela.



Slika 3-7: Shematski prikaz sestavin elektroforetske celice (levo) (8) in dejanski fotografiji ene izmed naših elektroforez (desno).

3.2.5.3 Prenos na membrano in inkubacija v blokirni raztopini

Gel smo vzeli iz kasete in ga pomočili v posodo z ddH₂O. V aparat iBlot smo namestili anodni del in nanj položili gela tako, da je bil začetek fronte na levi. Geloma smo odrezali zbiralni gel (mesto glavnička) in spodnji odebeljen del. Na gela smo nato namestili v vodi omočen filter papir, izločili mehurčke zraka s pomočjo valjčka in namestili še katodni del ter suho spužvo. Program smo zagnali za 9 min pri 20 V. Po končanem prenosu smo membrano inkubirali v blokirni raztopini čez noč in naslednji dan nadaljevali z imunodetekcijo.

3.2.5.4 Imunodetekcija

Najprej smo pripravili vialo z naslednjo vsebino:

- 250 mL viala: 200 mL TBTS (za spiranje)
- 25 mL viala: 20 mL blokirne raztopine BSA
- 25 mL viala: 20 mL raztopine primarnih protiteles v 0.5-1% posnetem mleku v TBTS
- 25 mL viala: 20 mL raztopine sekundarnih protiteles
- 125 mL viala: 100 mL ddH₂O (za izplakovanje)

Pri tej stopnji smo uporabili aparaturo BENCH Pro 4100 Card Procession Station. Membrano smo vzeli iz blokirne raztopine in sprali dvakrat s TBST. V aparat smo vstavili predhodno pripravljene vialo in nastavili program (246 min). Nato smo vstavili kartico in plastični nosilec z membrano ter program zagnali.

3.2.5.5 Detekcija elektrokemiluminiscence

Najprej smo v razmerju 1:1 pripravili mešanico reagentov A in B in sicer skupaj 7 mL za 112 cm² membrane. Membrano smo sprali v ddH₂O in jo postavili na spodnji del prozorne plastične folije. Z 1 mL mešanico reagentov smo nakapljali membrano, počakali 2 min in pokrili z zgornjim delom folije. Sledilo je digitalno fotografiranje.

3.2.5.6 Barvanje gela

Da bi preverili uspešnost prenosa proteinov na membrano, smo gel pobarvali s barvilom Coomassie Blue R-250. Gel smo najprej pustili v fiksirni raztopini za 2 h na sobni temperaturi z rahlim mešanjem in vsako uro raztopino zamenjali. Nato smo gel 20 min barvali v raztopini za barvanje. V raztopini za razbarvanje smo gelu popolnoma razbarvali ozadje in posneli fotografijo.

3.2.5.7 Kvantifikacija proteinskih lis

Na membrano prenesene proteine s prenosom western smo kvantificirali s programom Quantity One (Bio-Rad, ZDA).

Z njim lahko analiziramo vse vrste fotografij gelov, vključno z kemiluminiscenčnimi. Prilagodljiva orodja tega računalniškega programa omogočajo hitro in kakovostno avtomatizirano analizo 1-D elektroforeznih gelov, analiz prenosa western, dot-blot analiz ipd.

3.2.6 Analiza morfoloških značilnosti PBMC s pretočno citometrijo

Pred kultiviranjem celičnih kultur smo z metodo pretočne citometrije preverili viabilnost in splošno morfologijo celic.

Pretočna citometrija je tehnika, ki nam z opazovanjem optičnih lastnosti omogoča merjenje in analizo lastnosti posameznih celic. Celice v suspenziji ena za drugo potujejo skozi pretočni citometer, kjer so izpostavljene ozkim snopom laserske svetlobe. Posamezna celica pri prehodu skozi izvor svetlobe odda svetlobne signale, ki so odvisni od njenih lastnosti. Tako lahko pridobimo informacije o morfoloških in funkcionalnih lastnosti celic. [68]

Viabilnost celic smo določili s 15 min inkubacijo celic s fluorescentnima barviloma kalcein (CALC) in 7-aminoaktinomicin D (7-AAD), ki se uporabljata kot fluorescentna markerja viabilnosti sesalskih celic. Celice s komprimirano membrano namreč prepuščajo 7-AAD, medtem, ko ga žive celice z nepoškodovano plazmalemo ne prepuščajo oz. učinkovito črpajo iz celice. 7-AAD oddaja svetlobo valovne dolžine 655 nm pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 543 nm samo ko je vezan na dvoverižno DNA, kar v praksi pomeni, da značilno obarva jedra mrtvih in šibko viabilnih celic. Nasprotno, CALC-AM prehaja plazmalemo vseh celic, vendar oddaja svetlobo valovne dolžine 509 nm pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 470 nm samo ko ga citosolne esterase razgradijo do CALC, kar v praksi pomeni, da značilno obarva jedra viabilnih oz. metabolno aktivnih celic. Fluorescenčni fotodetektorji v pretočnem citometru lovijo emitirano svetlobo določene valovne dolžine, ki jo oddaja barvilo in pretvorijo te svetlobne signale v električne, ki jih na računalniku obdelamo in grafično prikazemo.

3.2.1 Mikroskopija

Pri tej tehniki raziskovalnega dela smo s pomočjo svetlobnega mikroskopa opazovali 10× in 100× povečano sliko celic pred in med kultiviranjem celičnih kultur.

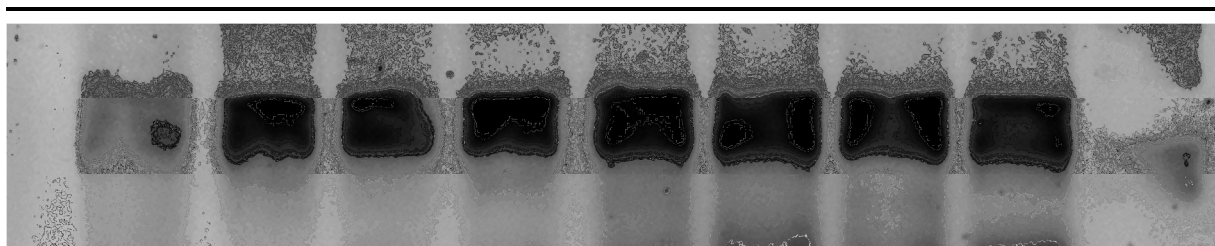
3.2.2 Obdelava podatkov

Za izračun statističnih atributov ter oblikovanje tabel in grafov smo uporabljali računalniški program Microsoft Office Excel 2010. Rezultati so podani na podlagi izračuna povprečja in standardnega odklona.

4 Rezultati in diskusija

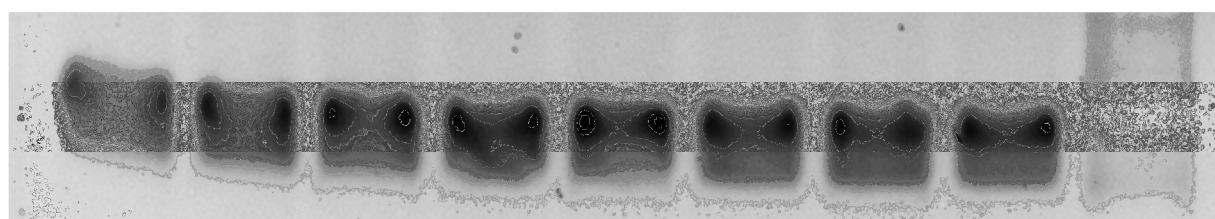
4.1 Optimizacija temperature qPCR

Optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov smo določili za gene *IL6*, *IL10* in *CSF2*. Za vse tri pare oligonukleotidov smo najbolj intenziven signal dobili pri temperaturi 59,8°C (Slika 4-1 - 4-3). Optimalne temperature prileganja ostalih v raziskavi uporabljenih začetnih oligonukleotidov so v laboratoriju že bile optimizirane.



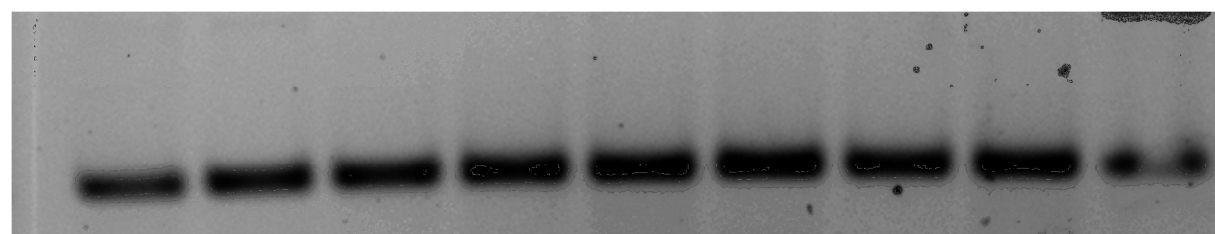
T [°C]	54,0	55,0	56,2	57,4	58,6	59,8	61,0	62,0	velikostni standard
--------	------	------	------	------	------	------	------	------	---------------------

Slika 4-1: Fotografija agaroznega gela optimizacije temperature za gen *IL6*.



T [°C]	54,0	55,0	56,2	57,4	58,6	59,8	61,0	62,0	velikostni standard
--------	------	------	------	------	------	------	------	------	---------------------

Slika 4-2: Fotografija agaroznega gela optimizacije temperature za gen *IL10*.



T [°C]	54,0	55,0	56,2	57,4	58,6	59,8	61,0	62,0	velikostni standard
--------	------	------	------	------	------	------	------	------	---------------------

Slika 4-3: Fotografija agaroznega gela optimizacije temperature za gen *CSF2*.

4.2 Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov

Optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov *IL6*, *IL10* in *CSF2* za qPCR reakcijo smo določili s pomočjo aparature QuantStudio™ 12K Flex. Koncentracijo smo določili na podlagi grafov z nizkim koeficientom variacije podatkov in sicer 300 nM za *IL6* in *IL10* ter 400 nM za *CSF2*. Optimalne koncentracije ostalih v raziskavi uporabljenih začetnih oligonukleotidov so v laboratoriju že bile optimizirane.

Optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov in njihove optimalne koncentracije so zbrane v Tabeli 4-1.

Tabela 4-1: Optimalne koncentracije in temperature prileganja začetnih oligonukleotidov.

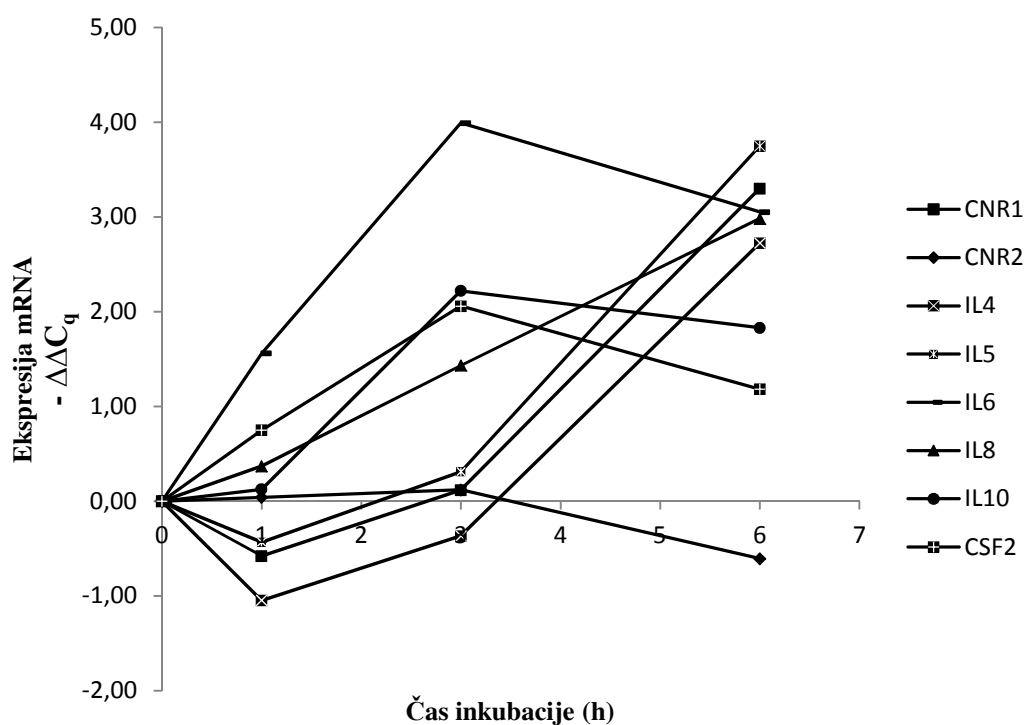
Gen	<i>CNR1</i>	<i>CNR2</i>	<i>IL4</i>	<i>IL5</i>	<i>IL6</i>	<i>IL8</i>	<i>IL10</i>	<i>CSF2</i>	<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>B2M</i>
koncentracija (nM)	350	250	400	200	300	200	300	400	400	200	500
temperatura (°C)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

4.3 Rezultati optimizacije bioaktivnih snovi za tretiranje gojenih PBMC

Različne študije potrjujejo okrepljeno provnetno dejavnost dejavnika tumorske nekroze- α (TNF) [9,11], zato smo PBMC tretirali z raztopino TNF, da bi simulirali *ex vivo* vnetno okolje. Za zagotovitev zadovoljive izvedbe končnega kultiviranja celičnih kultur iz vzorcev astmatičnih bolnikov smo najprej poiskali optimalni čas inkubacije PBMC s TNF in kanabinoidi ter tudi njihovo optimalno koncentracijo. Parametri, ki smo jih v končni raziskavi uporabili, ne pa tudi optimizirali, so bili povzeti iz ustrezne znanstvene literature. Optimalni čas inkubacije in koncentracijo TNF in kanabinoidov smo določili pri zadovoljivem nivoju ekspresije genov *CNR1*, *CNR2*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, in *CSF2*. Pri različnih poskusih iskanja optimalnih parametrov so se uporabljali vzorci periferne krvi zdravih odraslih prostovoljcev.

4.3.1 Optimizacija časa inkubacije PBMC s TNF

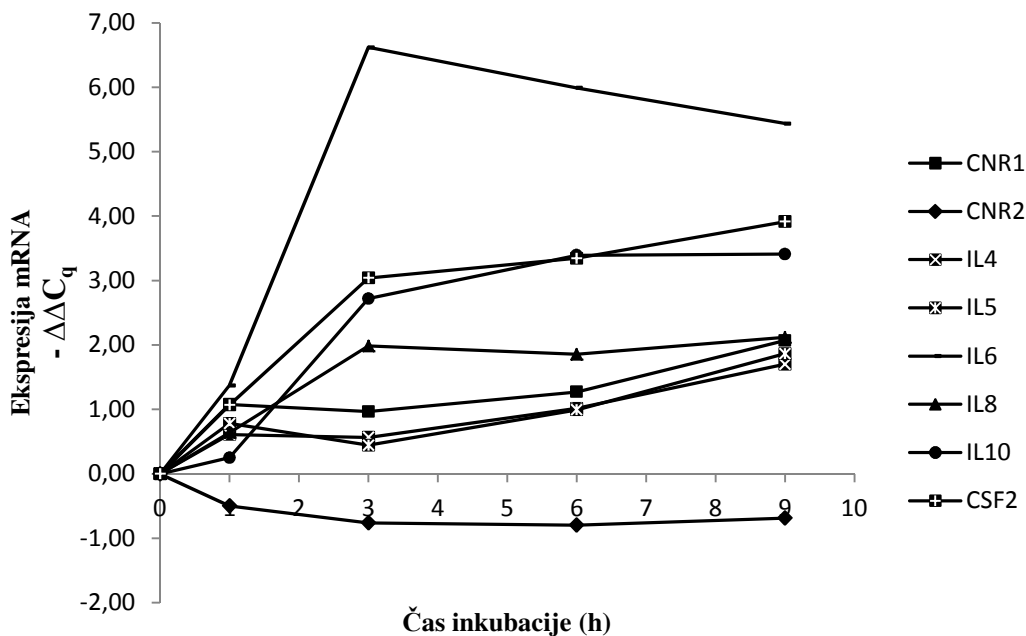
Izvedli smo tri zaporedne eksperimente iskanja optimalnega časa inkubacije PBMC s TNF. K suspenziji PBMC smo po enourni aklimatizaciji dodali 100 μ M raztopino TNF v DMEM. V prvem eksperimentu smo določili ekspresijo mRNA genov po 1, 3 in 6 h inkubacije PBMC s TNF in rezultate normalizirali na kontrolne vzorce v času 0 h (Slika 4-4).



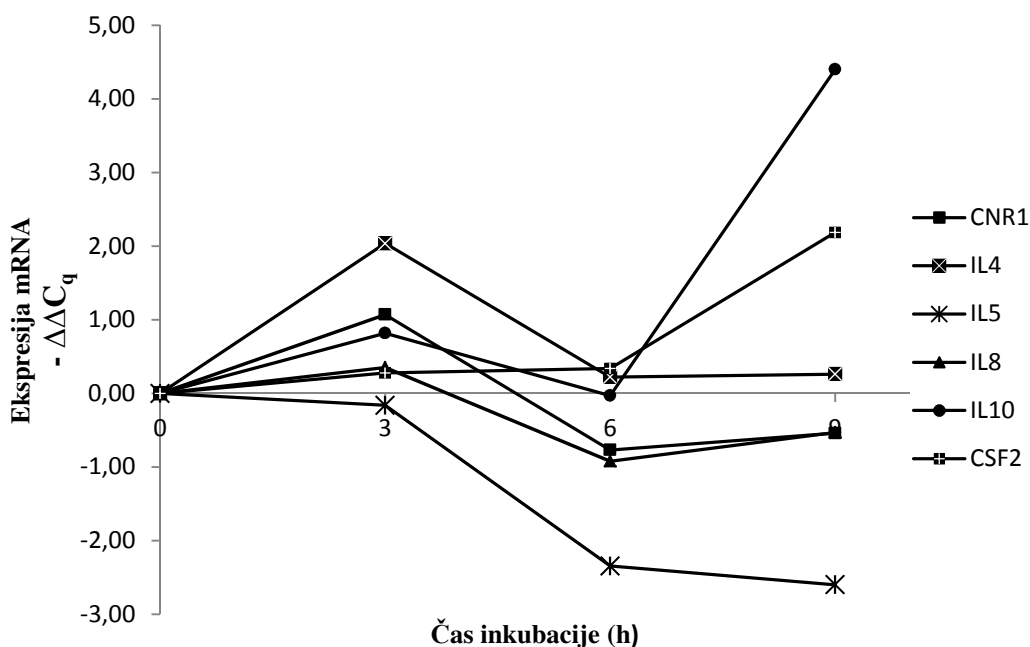
Slika 4-4: Izražanje tarčnih genov po 1, 3 in 6 h inkubacije PBMC s TNF (1.eksperiment).

6 h inkubacija ni pokazala upada izražanja pri večini izbranih genov, zato smo v naslednjih dveh eksperimentih določili ekspresijo mRNA genov tudi po 9 h inkubacije (Sliki 4-5, 4-6). 9 h inkubacija celic prav tako ni pokazala upada izražanja genov, zato smo nadaljevali z iskanjem optimalnega časa inkubiranja PBMC s TNF v naslednjih eksperimentih, vzporedno z iskanjem drugih optimalnih parametrov TNF. Ekspresija gena *CNR2* je bila v vseh treh

eksperimentih minimalna oz. negativna v primerjavi s kontrolo. Iz tega smo zaključili, da receptor CB2 ni bistveno udeležen pri učinkih TNF v zastavljenih eksperimentalnih pogojih, zato smo načrtovano tretiranje z njegovimi agonisti in antagonisti v nadaljevanju opustili.



Slika 4-5: Izražanje tarčnih genov po 1, 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF (2.eksperiment).

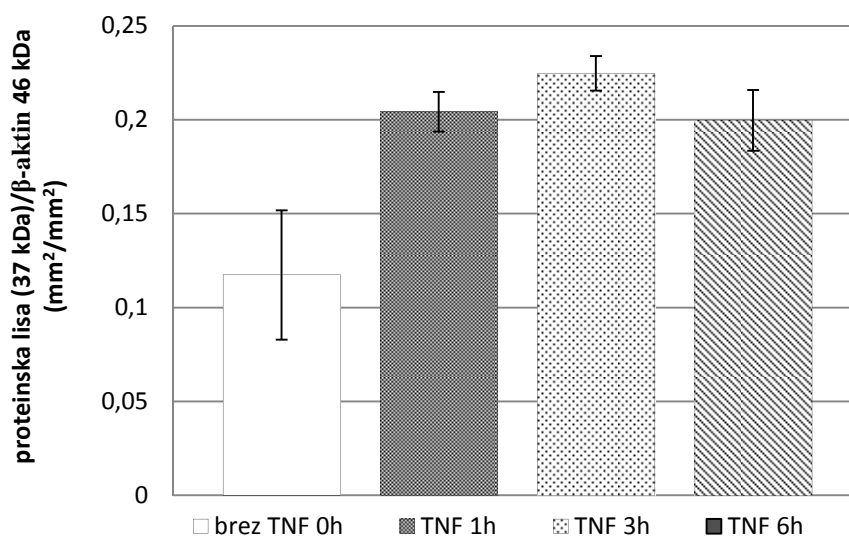


Slika 4-6: Izražanje tarčnih genov po 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF (3.eksperiment).

4.3.1.1 Analiza prenosa western pri optimizaciji časa inkubacije PBMC s TNF

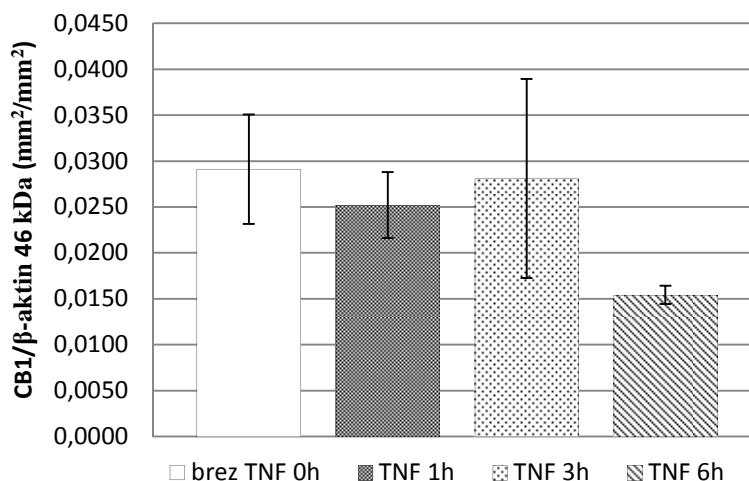
Po treh zaporednih eksperimentih iskanja optimalnega časa inkubacije PBMC s TNF smo s prenosom western analizirali prisotnost proteina CB1, katerega proteinsko liso je bilo pričakovati pri 55-59 kDa. Proteinske lise CB1 smo kvantificirali s programom Quantity One. Količino prisotnih CB1 proteinov smo podali relativno glede na izražanje β -aktina, ki smo ga zelo dobro zaznali kot proteinsko liso velikosti 46 kDa. Fotografije membran prenosa western so podane v Prilogi 1. Poleg pričakovane proteinske lise CB1 55-59 kDa smo jasno opazili tudi proteinske lise velikosti prib. 37 kDa. Kateri protein opažene proteinske lise predstavljajo, zgolj na osnovi teh rezultatov ne moremo reči, zato bi bile potrebne nadaljnje proteomske študije. Vsekakor pa lahko zaključimo, da gre bodisi za razgradni produkt CB1 bodisi za nek neznan protein z zelo podobnim epitopom, ki ga prepoznavajo uporabljena protitelesa proti CB1.

Analiza CB1 pri 1. eksperimentu po 1, 3 in 6 h inkubacije PBMC s TNF je pokazala bistveno povečano izraženost proteinske lise velikosti 37 kDa po 1, 3 in 6 h inkubacije s TNF, in sicer je bila za približno dvakrat večja v primerjavi z izraženostjo tega proteina v netretiranih celicah (Slika 4-7). Iz tega lahko zaključimo, da je izražanje tega proteina pod očitnim vplivom TNF, ki pa ni odvisen od časa inkubacije.



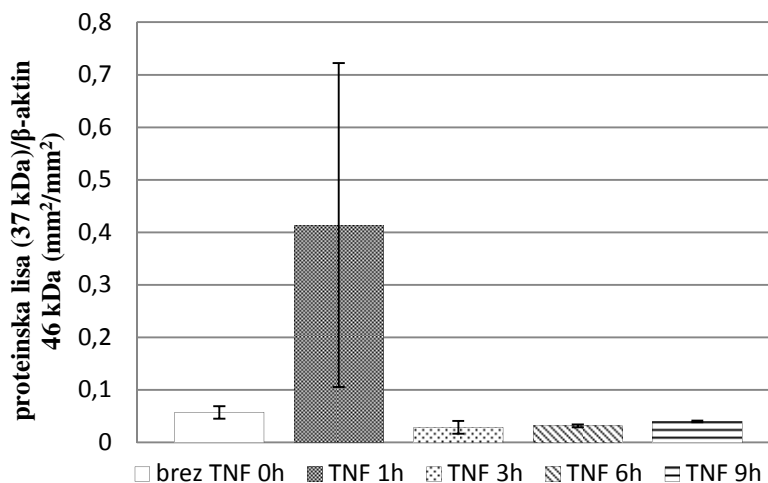
Slika 4-7: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (1. eksperiment).

Vpliv TNF na izraženost CB1 velikosti 58 kDa je bil na začetku minimalen, saj je kvantifikacija po 1 in 3 h inkubacije s TNF pokazala podobno izraženost tega proteina kot pri netretiranih PBMC v času 0 h. Smo pa opazili bistveno zmanjšanje količine CB1 po 6 h inkubaciji s TNF (Slika 4-8). Zaključimo lahko, da se učinki TNF na izražanje gena *CNR1* na proteinskem nivoju pokaže z zamikom prib. 6 h in sicer na način, da se izražanje proteina za približno dvakrat zmanjša.



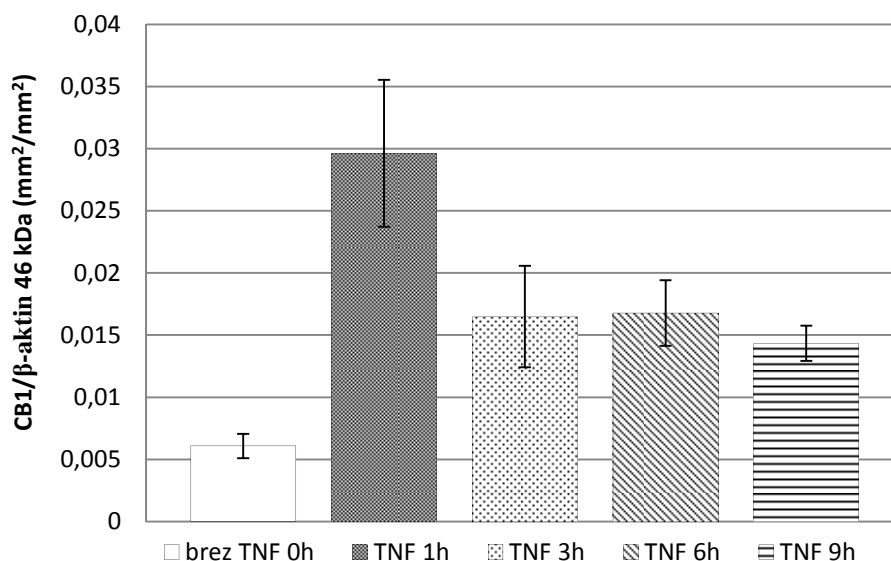
Slika 4-8: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (1. eksperiment).

Analiza CB1 pri 2. eksperimentu po 1, 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF je pokazala največjo izraženost proteinske lise velikosti 37 kDa po 1 h inkubacije s TNF, vendar zaradi velikega standardnega odklona ne moremo trditi na opazno povišano izraženost tega proteina v primerjavi z izraženostjo po času 0, 3, 6 in 9 h (Slika 4-9). Na osnovi podatkov zaključimo, da v 2. eksperimentu intenziteta proteinske lise velikosti 37 kDa ni bila odvisna od časa inkubacije s TNF.



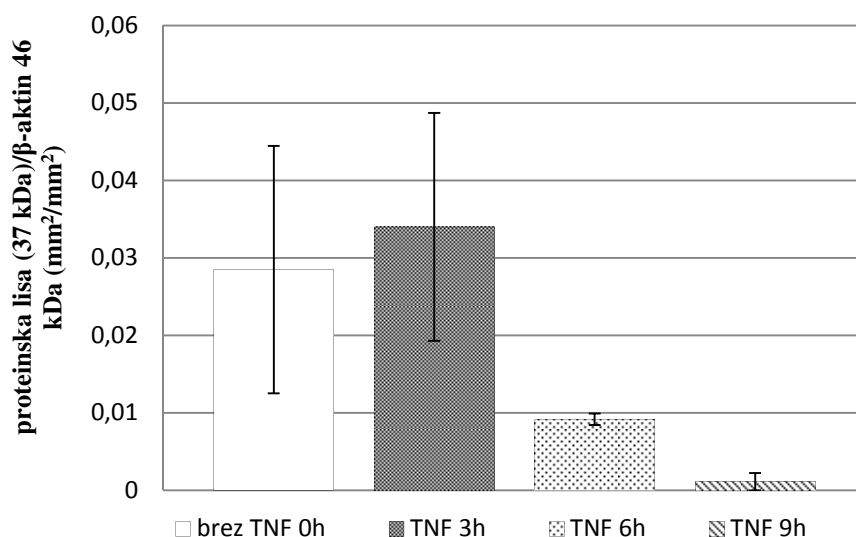
Slika 4-9: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (2. eksperiment).

Prav tako je po 1 h inkubacije bila največja izraženost CB1 velikosti 58 kDa, ki je bila opazno višja v primerjavi z izraženostjo tega proteina v netretiranih celicah s TNF, podobno pa velja tudi za 3, 6 in 9 h inkubacije s TNF (Slika 4-10).



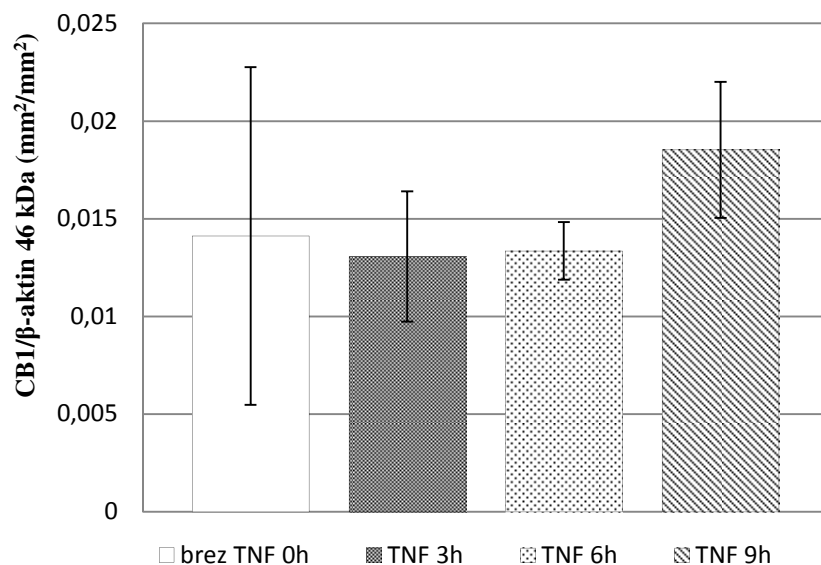
Slika 4-10: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (2. eksperiment).

Analiza CB1 pri 3. eksperimentu po 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF je pokazala največjo izraženost proteinske lise velikosti 37 kDa po 3 h inkubacije s TNF, vendar v primerjavi z izraženostjo ob času 0 h to povečanje ni bilo signifikantno. Nasprotno pa je bilo zmanjšanje te proteinske lise po 9 h inkubacije s TNF bistveno zmanjšanje glede na netretirane pogoje (Slika 4-11).



Slika 4-11: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (3. eksperiment).

Izraženost CB1 proteinske lise velikosti 58 kDa je bila po 3, 6 in 9 h inkubacije s TNF podobna izraženosti proteina netretiranih celic. Opazen, čeprav ne statistično značilen učinek TNF na izražanje gena *CNR1* na proteinskem nivoju se je pokazal z zamikom prib. 9 h, in sicer se je izražanje proteina nekoliko povečalo (Slika 4-12).



Slika 4-12: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) v odvisnosti od časa inkubacije s TNF (3. eksperiment).

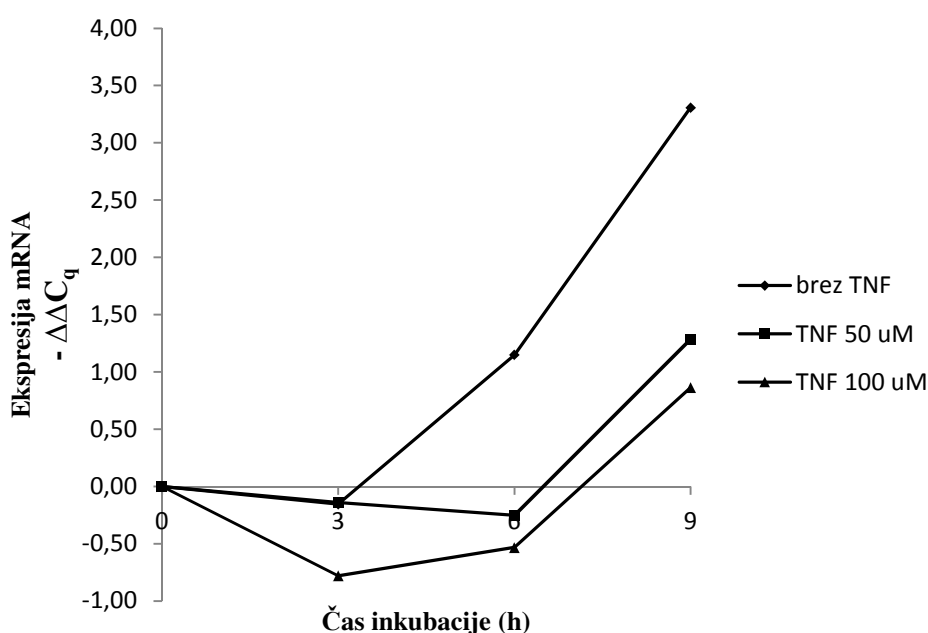
4.3.2 Optimizacija koncentracije TNF

Maksimalno izražanje mRNA genov smo določili tudi pri dveh poljubno izbranih koncentracijah TNF. K suspenziji PBMC smo po enourni aklimatizaciji dodali 50 in 100 μM raztopino TNF v DMEM. Poleg vpliva koncentracije TNF na ekspresijo tarčnih genov nas je zanimala tudi ekspresija tarčnih genov v netretiranih celicah ne samo ob času 0 h, ampak tudi v izbranih časih, ki so ustrezali časom tretiranja s TNF. V ta namen smo izmerili izražanje genov v enakih časovnih presledkih tako inkubiranim celicam s TNF in kot tudi njihovim netretiranim kontrolam (Slike 4-13 - 4-19).

Rezultati so pokazali, da 1 h aklimatizacija celic pred tretiranjem s TNF ni dovolj, saj je 9 h inkubacija s TNF pokazala naraščanje ekspresije genov tudi pri kontrolah. Ekspresija genov *CNR1*, *IL4*, *IL5*, *IL8* v kontrolah je bila celo višja v primerjavi z ekspresijo genov celic inkubiranih s TNF (Slike 4-13, 4-15, 4-16, 4-17).

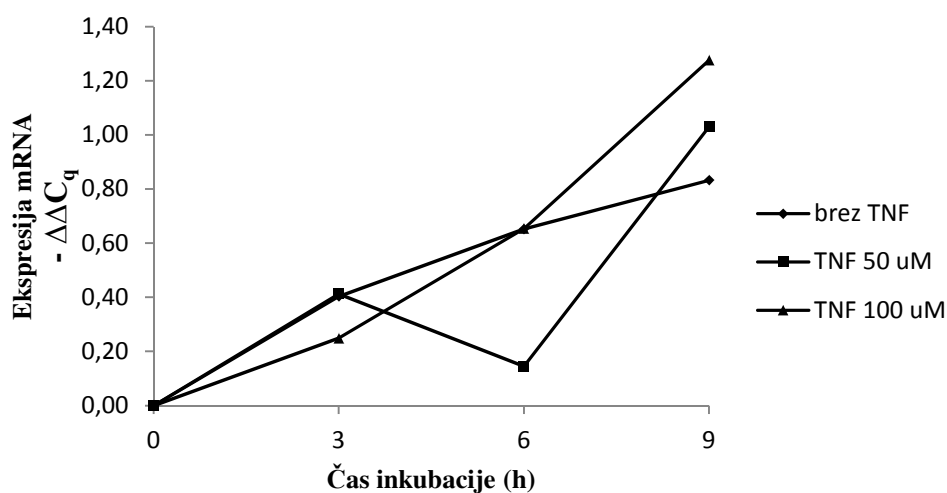
Tretiranje PBMC s 50 μM in 100 μM raztopino TNF ni pokazalo opaznih razlik v izražanju genov, zato smo v nadaljevanju uporabljali 100 μM koncentracijo TNF, ki je splošno uveljavljena v znanstveni literaturi.

Izraženost *IL6* ni podana v obliki grafa, ker ni bilo zaznavne značilne prazne fluorescence DNA produkta (C_q vrednosti večje od 35). Na podlagi tega smo merjenje ekspresije tega gena v naslednjih eksperimentih opustili.

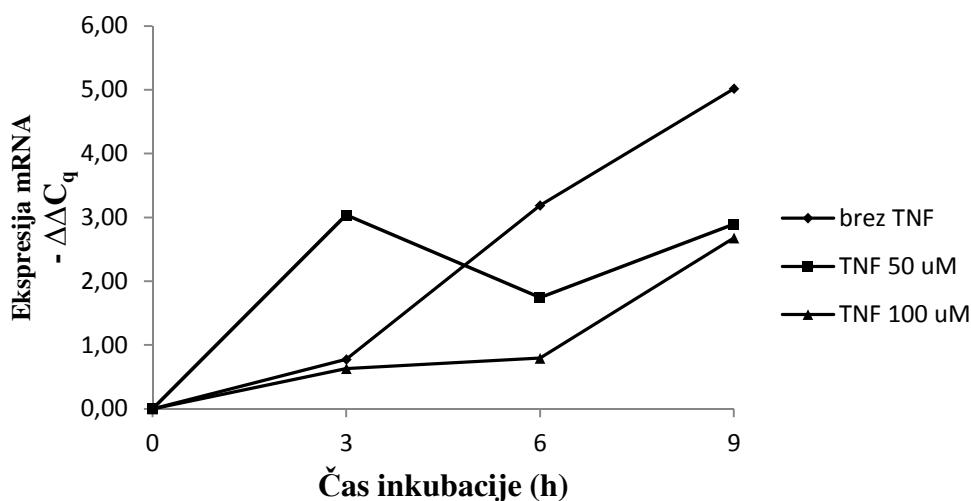


Slika 4-13: Stopnja izražanja *CNR1* v odvisnosti od koncentracije TNF.

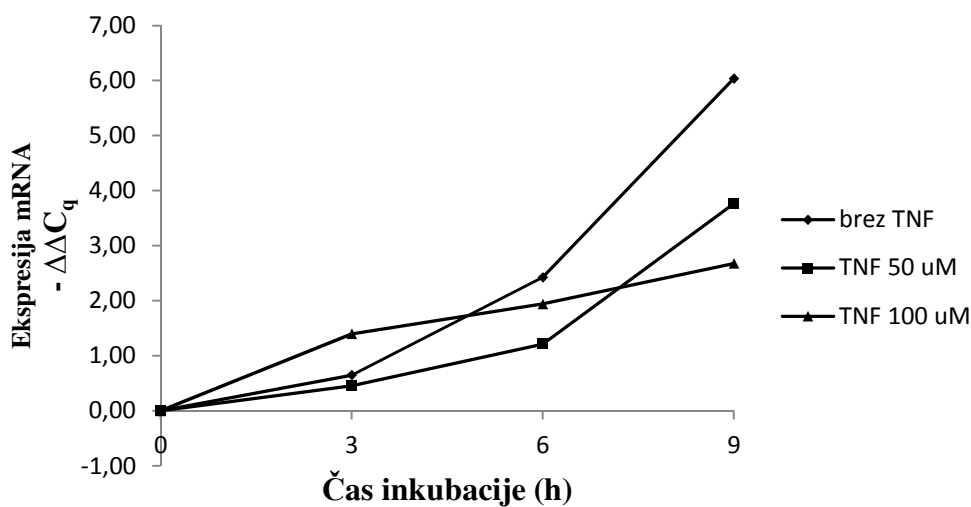
Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 4-14: Stopnja izražanja *CNR2* v odvisnosti od koncentracije TNF.

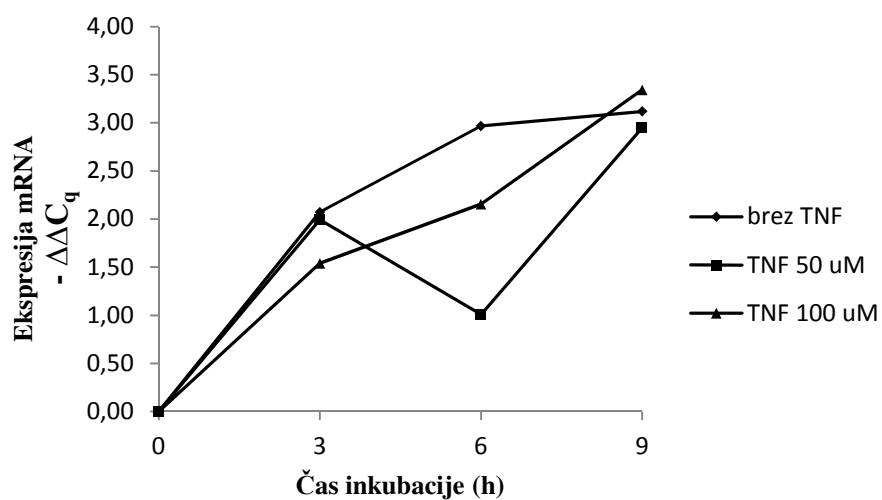


Slika 4-15: Stopnja izražanja *IL4* v odvisnosti od koncentracije TNF.

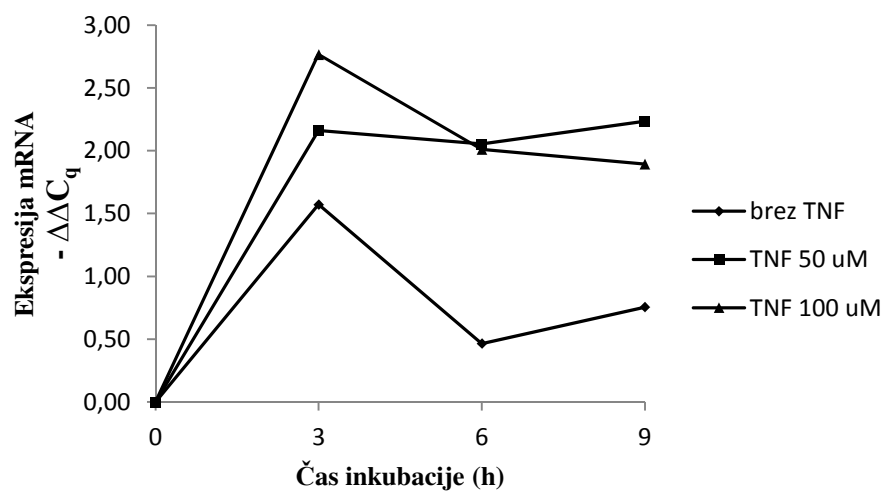


Slika 4-16: Stopnja izražanja *IL5* v odvisnosti od koncentracije TNF.

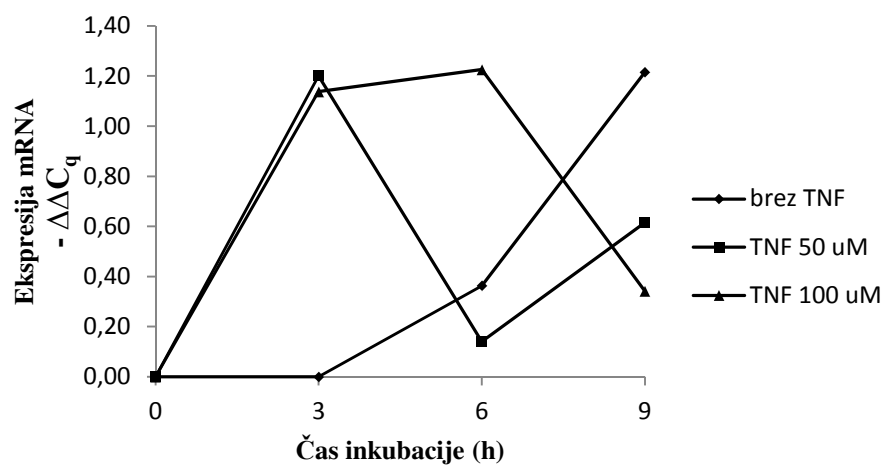
Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 4-17: Stopnja izražanja *IL8* v odvisnosti od koncentracije TNF.



Slika 4-18: Stopnja izražanja *IL10* v odvisnosti od koncentracije TNF.

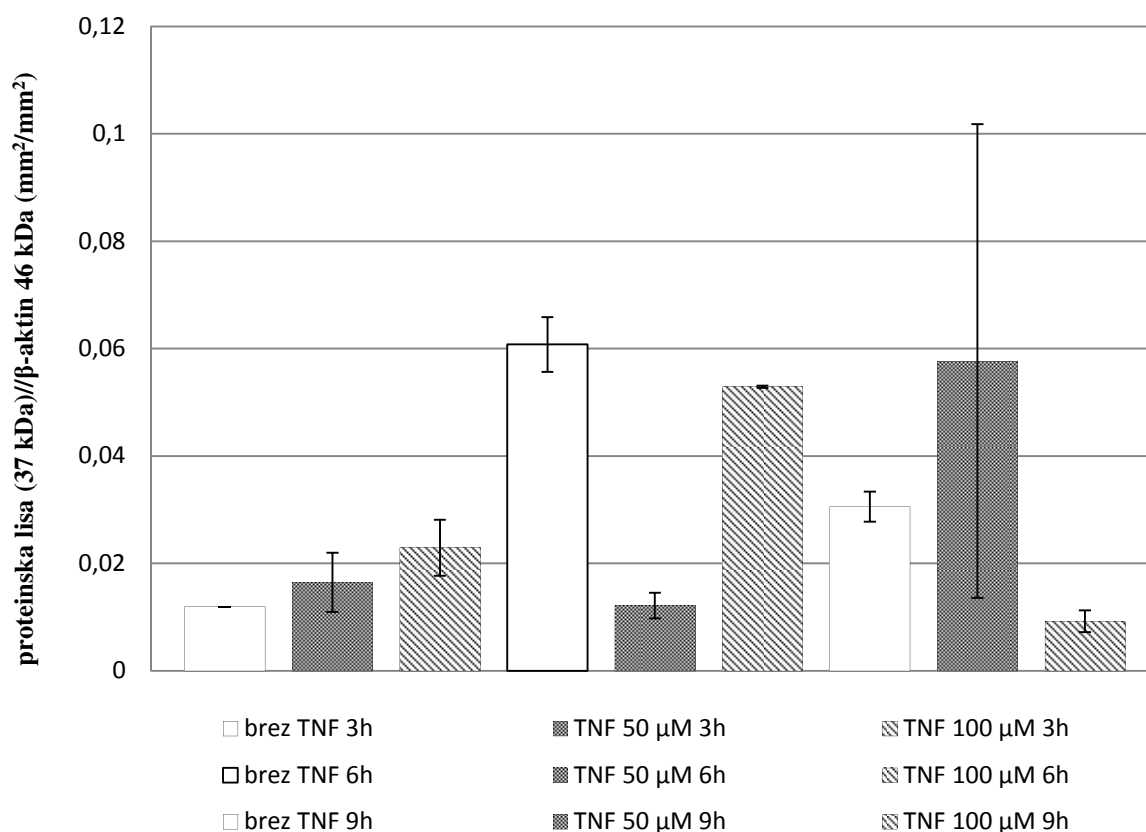


Slika 4-19: Stopnja izražanja *CSF2* v odvisnosti od koncentracije TNF.

4.3.2.1 Analiza prenosa western

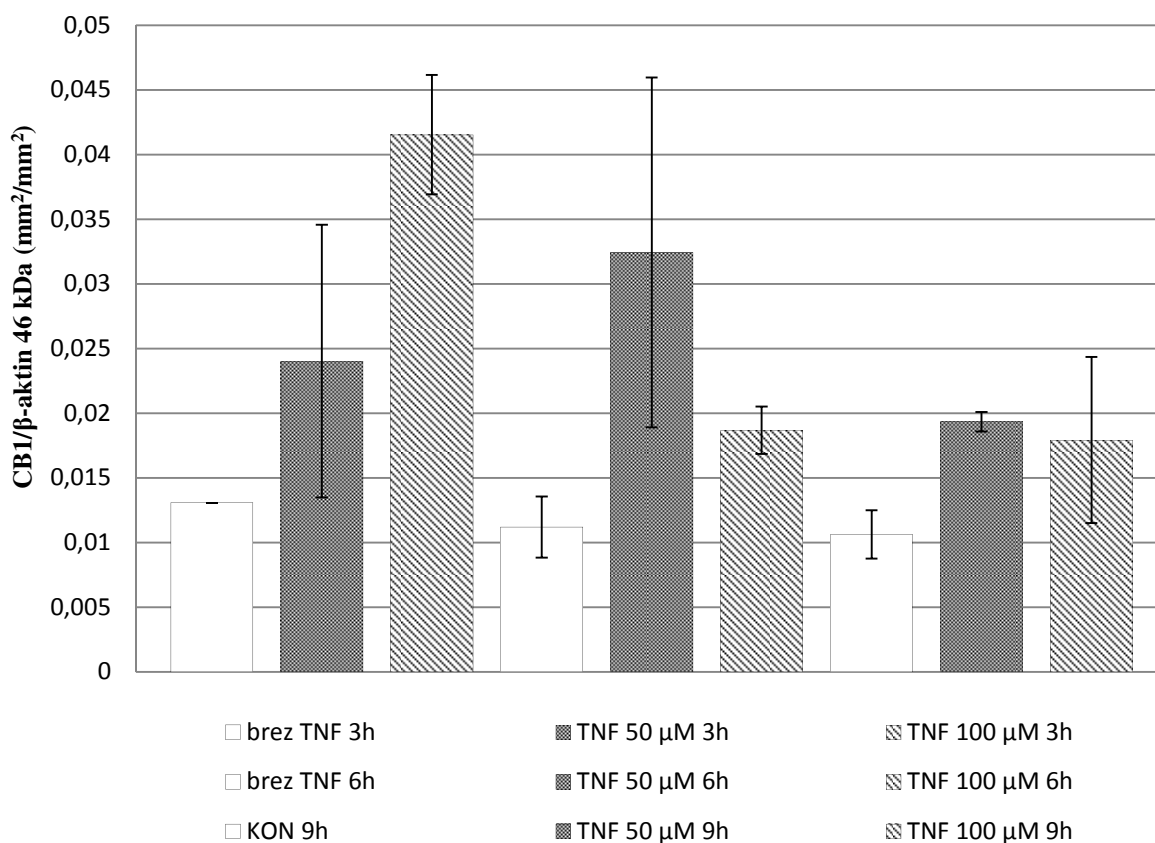
Prisotnost proteina CB1 smo s prenosom western analizirali tudi pri iskanju optimalne koncentracije TNF po 3, 6 in 9 h gojenja PBMC s 50 in 100 μM raztopino TNF. Količino zaznanega proteina velikosti 37 kDa in 58 kDa smo kot pri optimizaciji časa TNF podali glede na izražanje β -aktina velikosti 46 kDa, katerega kvantifikacijo proteinskih lis smo prav tako določili s pomočjo izvedbe prenosa western. Fotografije membran prenosa western so podane v Prilogi 1.

Analiza proteinske lise velikosti 37 kDa po 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF je pokazala največji učinek TNF na izraženost tega proteina po 3 h inkubacije celic in sicer večja izraženost je bila pri celicah tretiranih s 100 μM TNF v primerjavi z izraženostjo pri celicah tretiranih s 50 μM TNF in netretiranih celic. Izraženost proteinske lise velikosti 37 kDa je bila po 6h inkubacije s 100 μM TNF sicer višja kot po 3 h, vendar ne moremo sklepati o učinku TNF, ker je bila izraženost tega proteina višja pri netretiranih celicah po 6 h. Zaradi izračuna velikega standardnega odklona pri izraženosti proteinske lise velikosti 37 kDa po 9 h inkubacije s 50 μM TNF ne moremo oceniti učinka TNF (Slika 4-20).



Slika 4-20: Kvantifikacija proteinskih lis (37 kDa) pri optimizaciji koncentracije TNF.

Tudi analiza proteina CB1 velikosti 58 kDa po 3, 6 in 9 h inkubacije PBMC s TNF je pokazala največji učinek TNF na izraženost tega proteina po 3 h inkubacije celic in sicer opazno večja izraženost je bila pri celicah tretiranih s 100 μM TNF v primerjavi z izraženostjo pri celicah tretiranih s 50 μM TNF in netretiranih celic. Učinek TNF na izraženost tega proteina je bil tudi po 6 in 9 h, vendar ni bilo opaznih večjih razlik pri izraženosti proteina pri tretiranju s 50 ali 100 μM TNF (Slika 4-21).



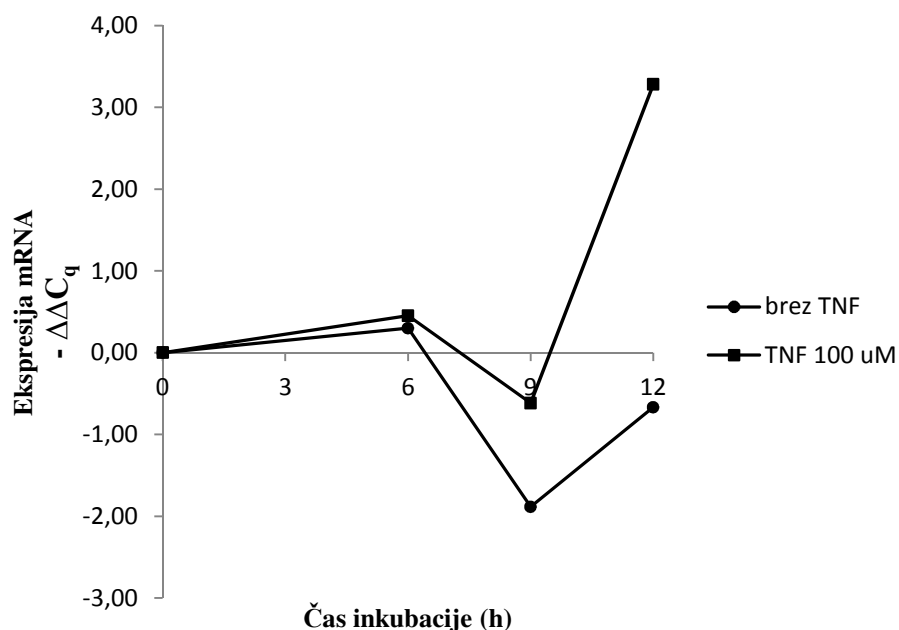
Slika 4-21: Kvantifikacija proteinskih lis CB1 (58 kDa) pri optimizaciji koncentracije TNF.

4.3.3 Optimizacija časa TNF po 18 urah aklimatizacije PBMC

Pri prejšnjem eksperimentu inkubacije PBMC smo ugotovili naraščanje ekspresije genov tudi pri kontrolah. Študija, ki je preverjala aktivnost odtaljenih PBMC med aklimatizacijo v mediju 1-18 h je ugotovila, da stres po odtalitvi celic inducira produkcijo različnih provnetnih citokinov in kemokinov. Aklimatizacija celic v mediju na 37°C zmanjša apoptozo po tretiranju z biološko aktivnimi snovmi in omogoči popolno funkcionalno okrevanje celic od odtalitve [69]. Na podlagi tega smo PBMC pred stimulacijo s TNF aklimatizirali 18 h in potem inkubirali PBMC 12 h z in brez (kontrola) 100 μ M raztopine TNF.

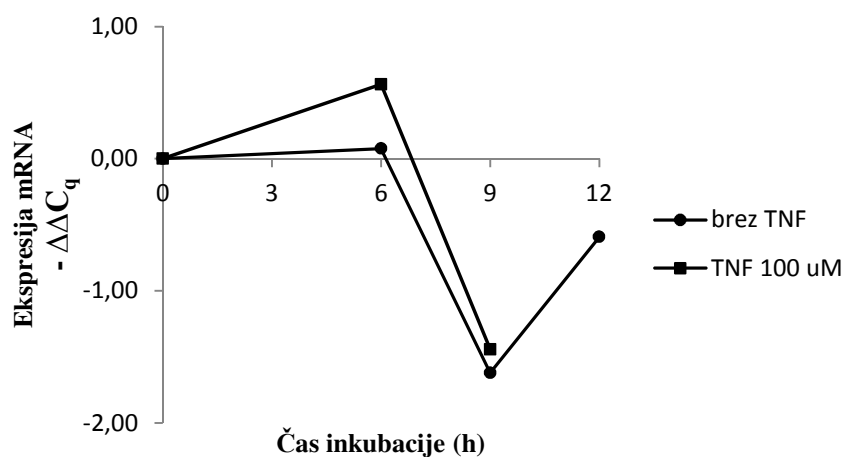
Rezultati so pokazali minimalno naraščanje oz. upadanje ekspresije genov pri kontrolah, kar pomeni, da aklimatizacija celic vsaj 18 h po odtalitvi zadostuje za ugotavljanje učinkov tretmajev z bioaktivnimi snovmi (Slike 4-22 - 4-27). Optimalni čas inkubiranja s TNF je bil 12 h, saj smo pri tem času izmerili zadovoljivo ekspresijo genov *CNR1*, *IL4* in *IL8*.

Kljub opaznemu naraščanju nekaterih genov po 12 h inkubacije s TNF smo se v eskperimentih, ki so sledili odločili za 12 h inkubacijo s TNF. Študija, ki je kultivirala celice s TNF 72 h je namreč potrdila, da predolga inkubacija s TNF inducira apoptozo celic, vendar ta v času gojenja 12 h še ni bila opazna [70].

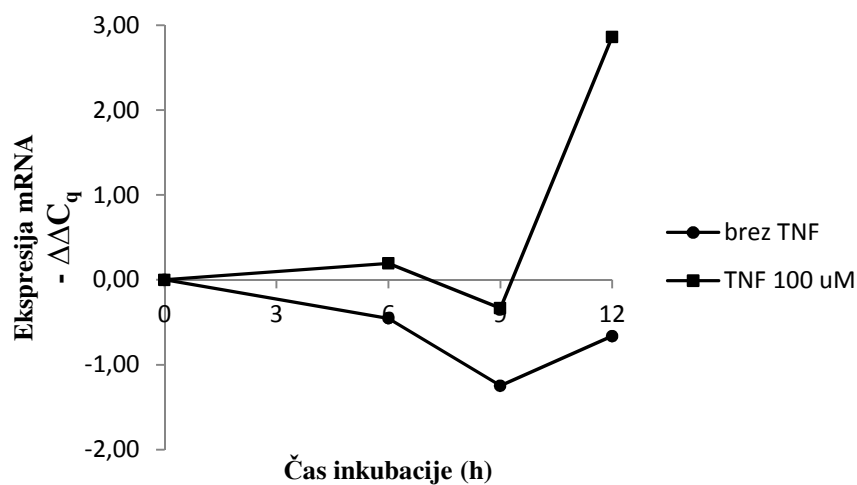


Slika 4-22: Stopnja izražanja *CNR1* po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.

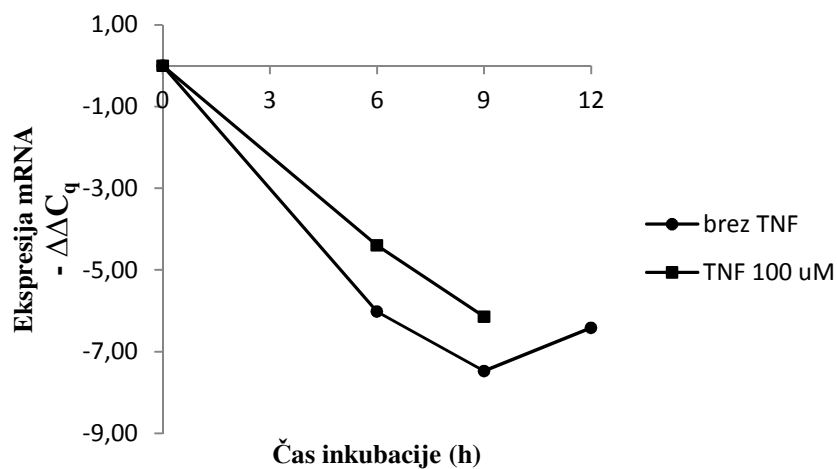
Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 4-23: Stopnja izražanja *CNR2* po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.

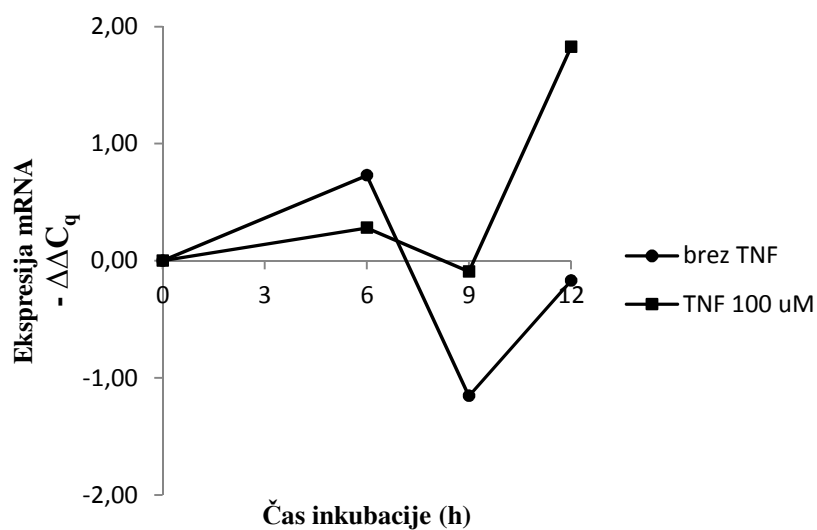


Slika 4-24: Stopnja izražanja *IL4* po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.

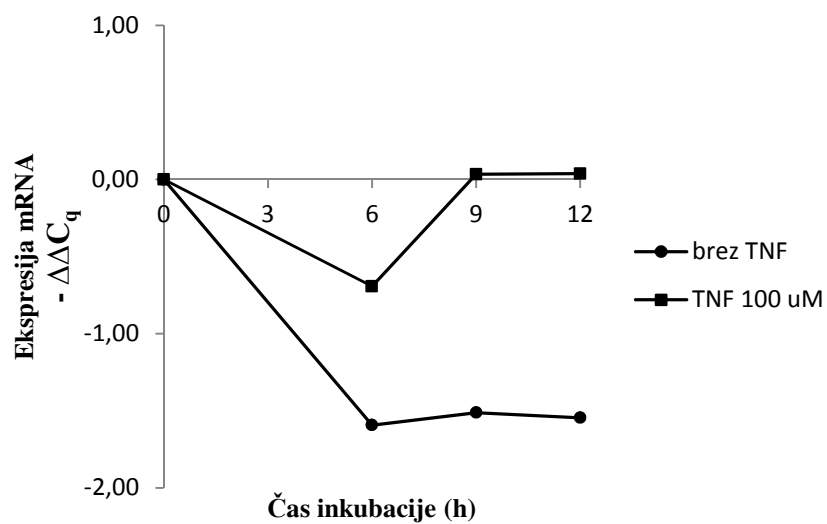


Slika 4-25: Stopnja izražanja *IL5* po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 4-26: Stopnja izražanja *IL8* po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.



Slika 4-27: Stopnja izražanja *IL10* po 18 h aklimatizacije in 3, 6 ter 9 h inkubacije PBMC s TNF.

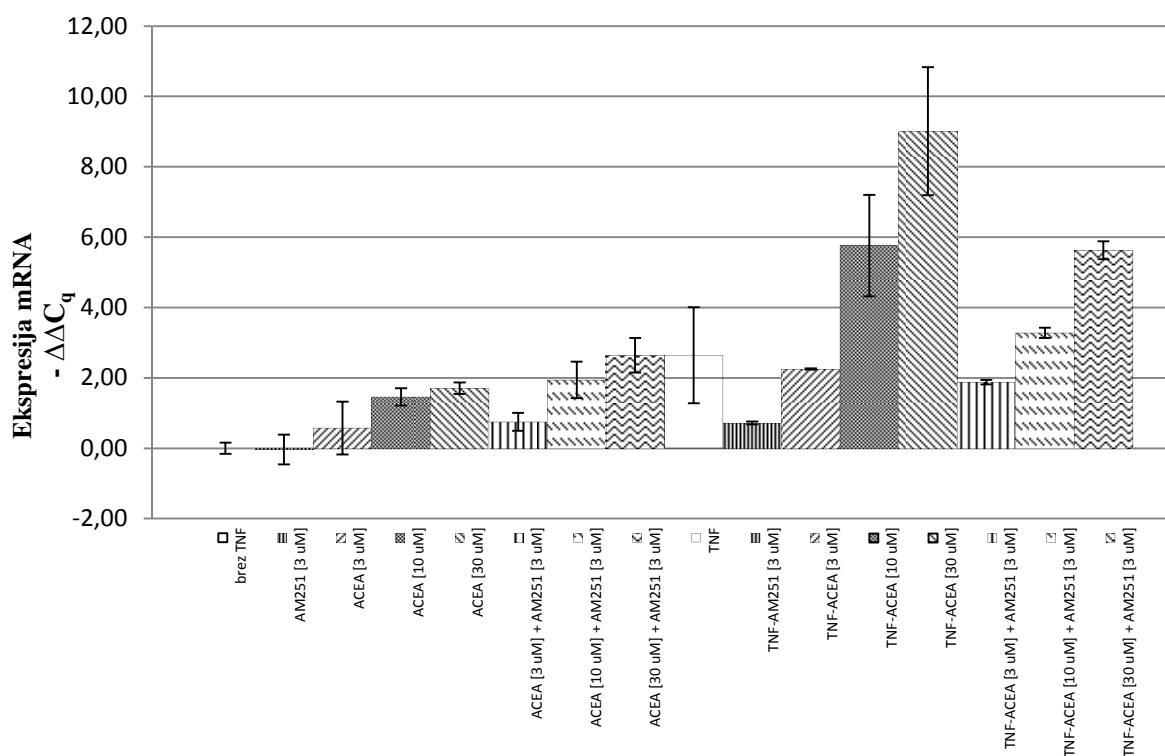
4.3.4 Optimizacija koncentracije agonista ACEA

Optimalno koncentracijo ACEA smo določili na osnovi maksimalne ekspresije tarčnih genov po inkubaciji PBMC z ACEA, ki je agonist receptorja CB1, in sicer s koncentracijami 3, 10 in 30 μM . Ugotavljali smo tudi vpliv ACEA na ekspresijo genov po 1 h predinkubaciji PBMC z AM251 s koncentracijo 3 μM . S tem smo želeli preveriti, ali učinki ACEA dejansko potekajo preko CB1 receptorja. Vezava antagonista AM251 namreč prepreči vezavo agonistu ACEA in s tem zmanjša prenos signala preko receptorja.

PBMC smo po 18 h aklimatizacije inkubirali 12 h z ali brez (kontrola) TNF. Potem smo celicam dodali 3 μM raztopino AM251. Po 1 h inkubaciji smo tretiranim celicam dodali 3, 10 in 30 μM ACEA. Po 3 h smo tako pri kontrolah kot pri tretiranih celicah analizirali ekspresijo tarčnih genov.

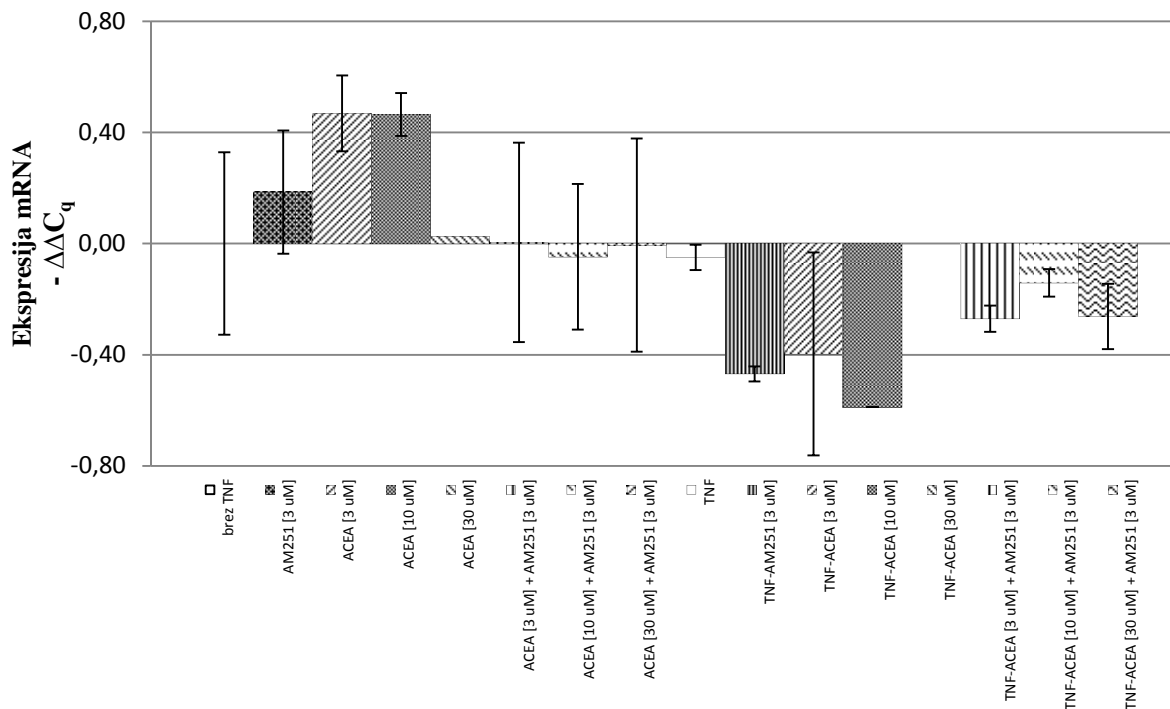
Analiza po inkubaciji na podlagi izračuna povprečja in standardnega odklona je pokazala opazno povišanje ekspresije genov *CNR1* ($9,01 \pm 1,82$), *IL4* ($10,18 \pm 1,05$) in *IL8* ($7,59 \pm 1,67$) pri PBMC inkubiranih s 30 μM ACEA glede na kontrole brez tretiranja s TNF (Slike 4-28, 4-30, 4-31). Pragtako je tretiranje v raztopini TNF z ACEA in AM251 pokazalo zmanjšanje ekspresije genov *CNR1*, *IL4* in *IL8* glede na izražanje teh genov z ACEA, kar nedvoumno pomeni, da biološki učinki ACEA potekajo s signalizacijo preko receptorja CB1. Ker je bil največji učinek ACEA opažen ravno pri koncentraciji 30 μM , smo v nadaljnjih eksperimentih uporabili to koncentracijo.

Izražanje genov *CNR2* in *IL10* je bilo minimalno oz. negativno glede na kontrolo (KON) (Slike 4-29, 4-32).

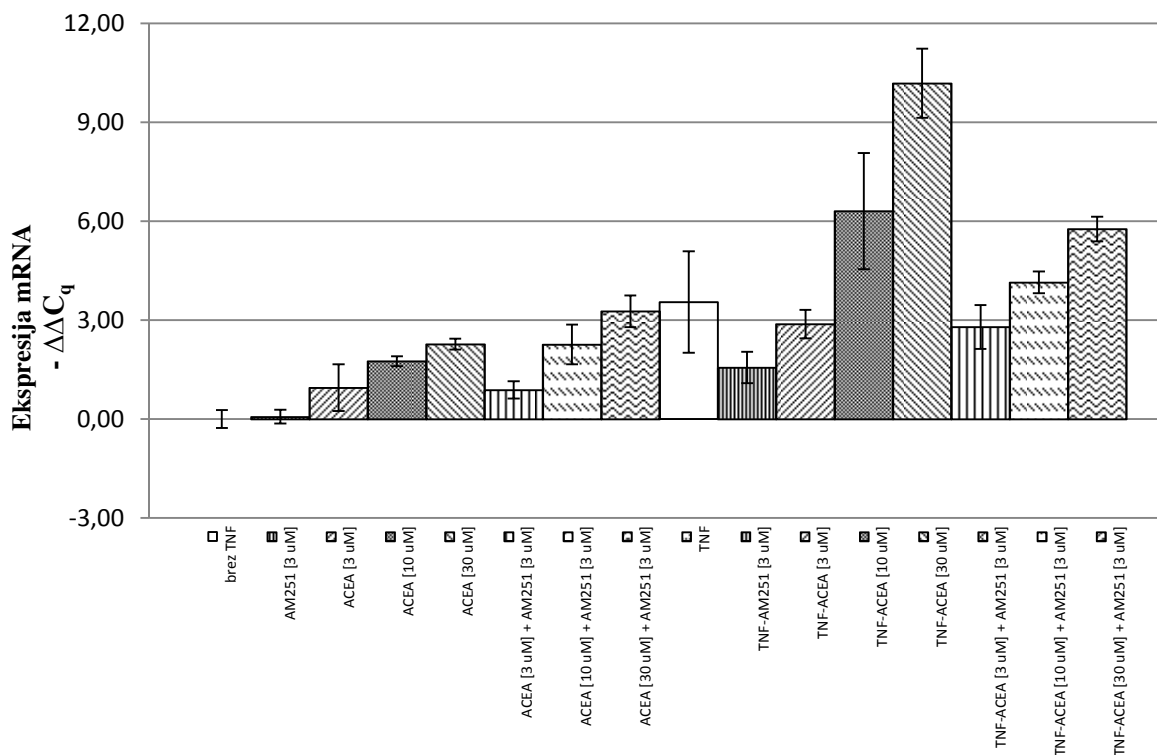


Slika 4-28: Stopnja izražanja gena *CNR1* po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

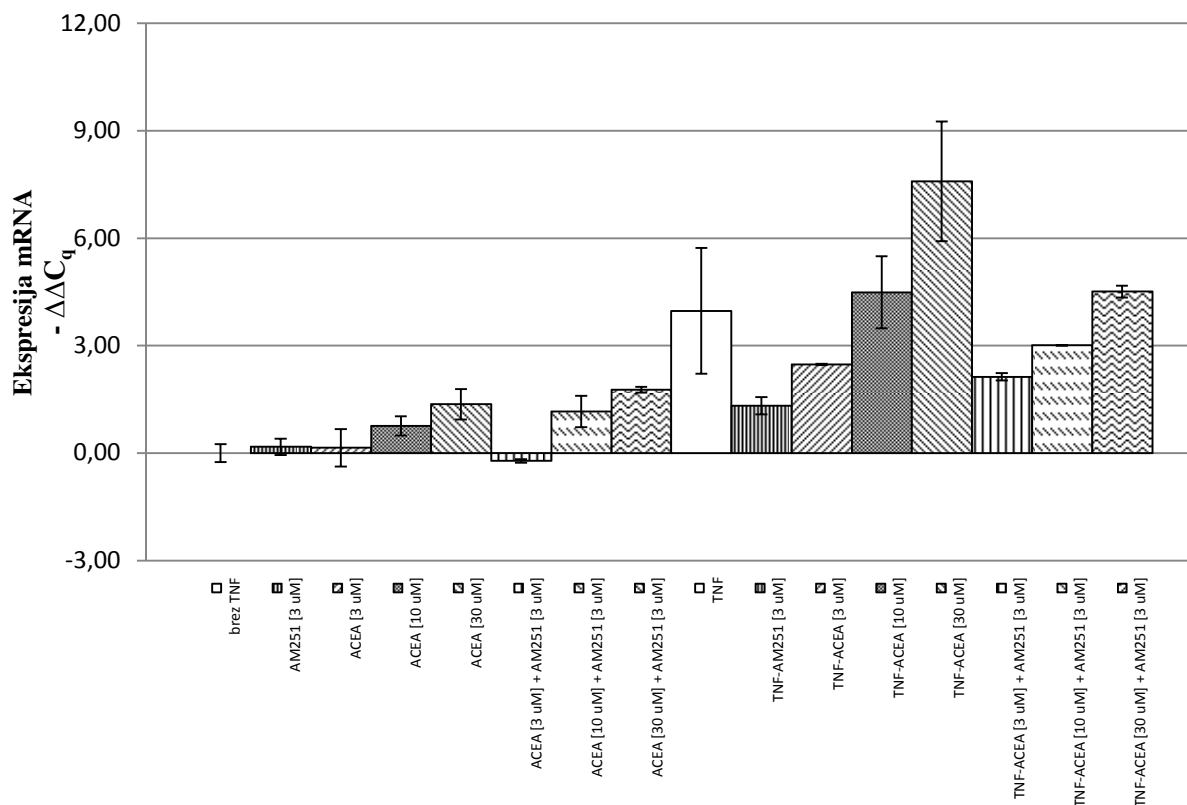


Slika 4-29: Stopnja izražanja gena *CNR2* po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.

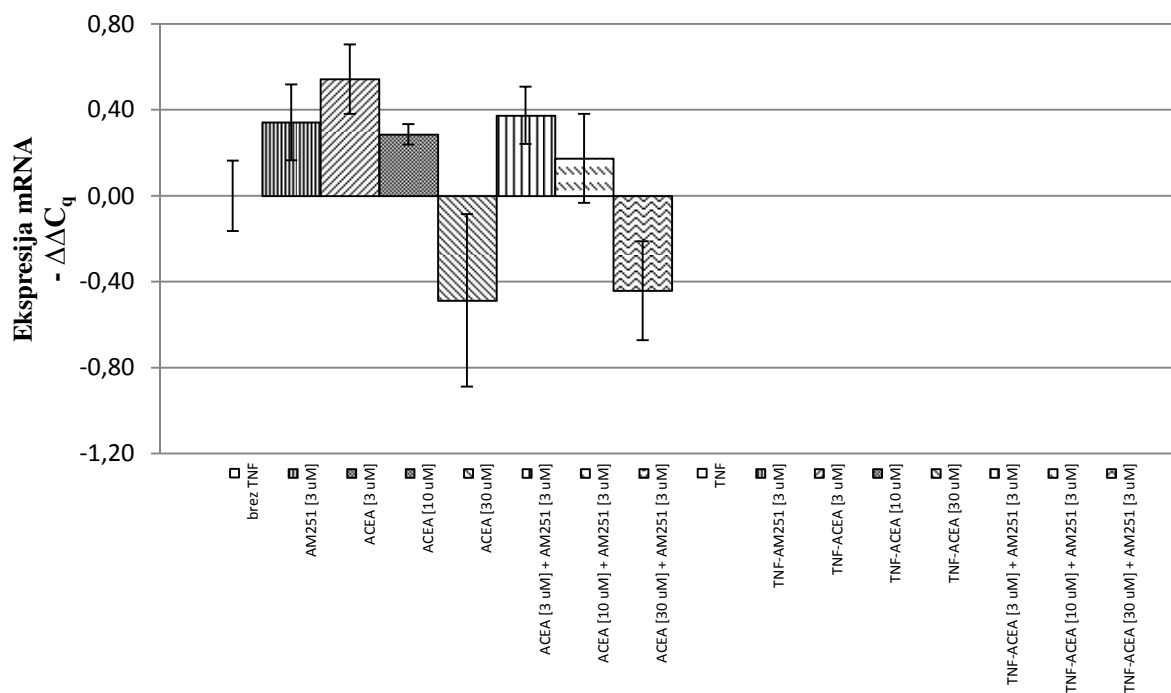


Slika 4-30: Stopnja izražanja gena *IL4* po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 4-31: Stopnja izražanje gena *IL8* po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.



Slika 4-32: Stopnja izražanje gena *IL10* po inkubaciji z različnimi koncentracijami raztopine ACEA, z ali brez predinkubacije z AM251.

4.4 Tretiranje PBMC astmatičnih in zdravih posameznikov s sintetičnimi kanabinoidi

Gensko ekspresijo *CNR1*, *CNR2*, *IL4*, *IL5*, *IL8*, *IL10*, in *CSF2* smo izmerili vzorcem PBMC dveh otrok obolelih za astmo in dveh zdravih posameznikov. PBMC smo gojili in tretirali na podlagi zgoraj opisanih predhodno določenih optimalnih parametrov. Po 18 h aklimatizacije PBMC smo dodali 100 μ M raztopine TNF, inkubirali 12 h in dodali (ali pa ne) raztopino 3 μ M AM251. Po 1 h inkubacije smo dodali raztopino 30 μ M ACEA in inkubirali še 3 h.

Pred gojenjem smo z metodo pretočne citometrije preverili viabilnost in morfologijo uporabljenih PBMC (Tabela 4-2). Fotografije rezultatov iz pretočnega citometra so podane v Prilogi 2.

Tabela 4-2: Rezultati analize viabilnosti PBMC pretočne citometrije.

Populacija	AST1	AST2	KON1	KON2
PBMC [% vsi objekti]	74,9	58,9	53,5	55,5
Visoka intenziteta CALC, nizka intenziteta 7-AAD [% PBMC]	68,5	37,9	91,4	90,4
Nizka intenziteta CALC, visoka intenziteta 7-AAD [% PBMC]	14,5	19,6	3,43	4,11
Srednja intenziteta CALC, srednja intenziteta 7-AAD [% PBMC]	3,54	32	3,56	2
Visoka intenziteta CALC, visoka intenziteta 7-AAD [% PBMC]	11,5	2,74	n/a	n/a

CALC – kalcein. 7-AAD – 7-aminoaktinomycin D.

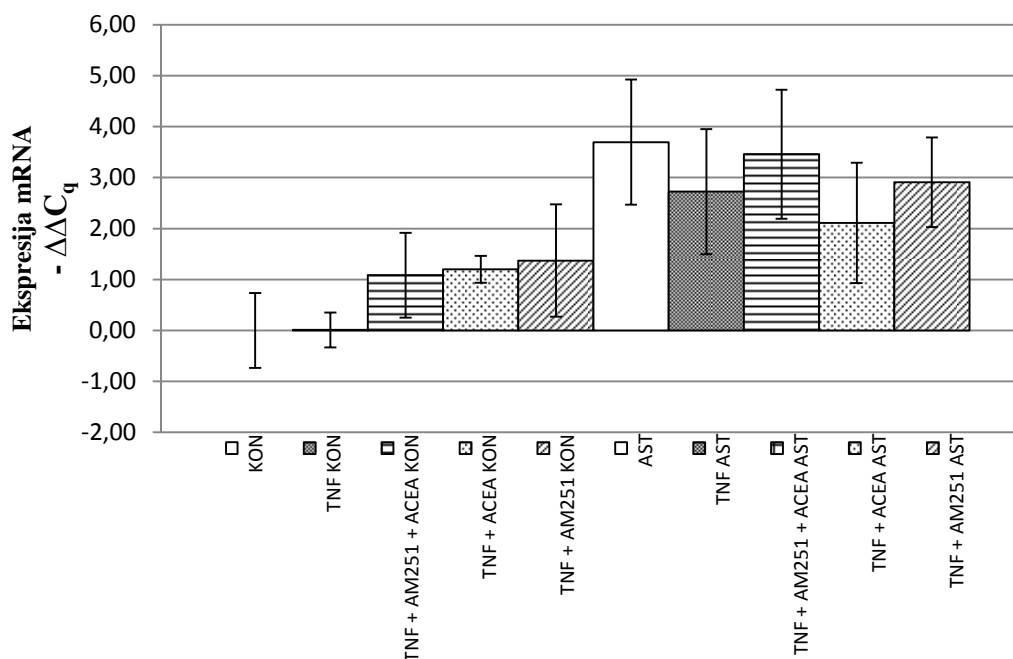
Viabilnost in vitalnost celic pred gojenjem smo ugotavljali s pomočjo dveh komplementarnih pristopov, in sicer s hkratno inkubacijo celic s CALC in 7-AAD. Višje kot so intenzitete fluorescence CALC (kanal 2 pretočnega citometra) in nižje kot so intenzitete fluorescence 7-AAD (kanal 4 pretočnega citometra), bolj je celica vitalna in viabilna, in obratno. Na osnovi podatkov v Tabela 4-2 lahko zaključimo, da je bilo približno 80% celic astmatikov ustrezno viabilnih in vitalnih, medtem ko je bila ta vrednost pri zdravih posameznikih > 90%.

Prav tako smo z mikroskopiranjem preverili obnašanje celic v raztopini DMEM pred in med inkubiranjem celičnih kultur. Obnašanje in stanje celic smo preverili vizualno in po mnenju dveh izkušenih raziskovalcev v laboratoriju bistvenih odstopanj od običajnega stanja ni bilo. Fotografije celic iz mikroskopa so podane v Prilogi 3.

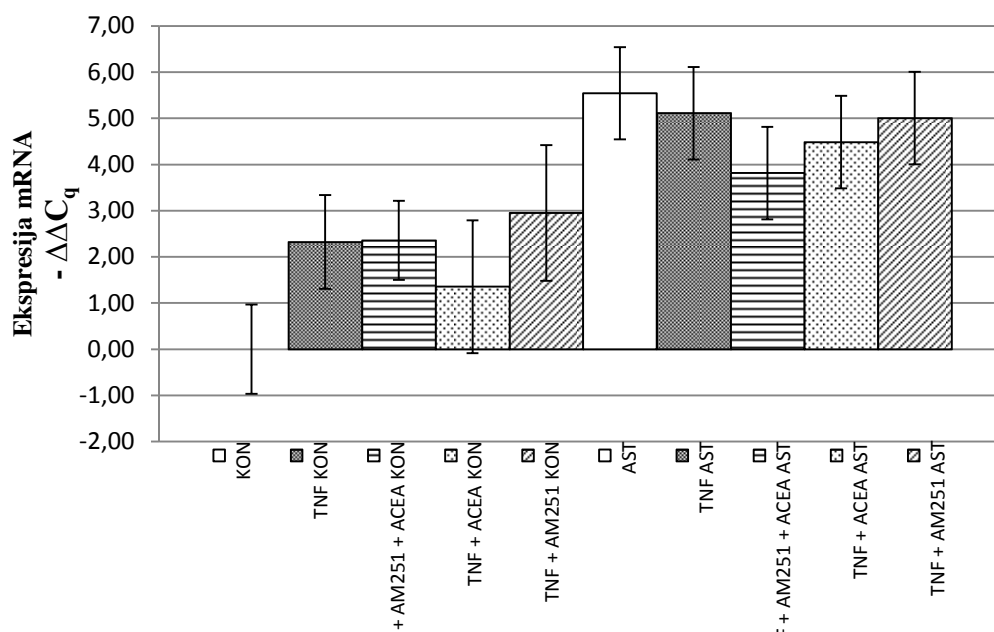
Pri tem eksperimentu smo s prenosom western izvedli tudi analizo prisotnosti proteina CB1, vendar zaradi majhne celokupne koncentracije proteinov kvantifikacija tega proteina ni bila mogoča. Fotografije membran prenosa western so podane v Prilogi 4.

Analiza po inkubaciji na podlagi izračuna povprečja in standardnega odklona je pokazala opazno povišanje ekspresije genov *CNR1* (TNF: $2,72 \pm 1,23$) in *IL4* (TNF: $5,11 \pm 1,49$) pri tretiranih in netretiranih celicah astmatičnih vzorcev v primerjavi s kontrolno zdravo skupino, vendar ni bilo učinka ACEA ($2,11 \pm 1,18$ za *CNR1* in $4,49 \pm 2,48$ za *IL4*) (Sliki 4-33, 4-34).

Čeprav nismo opazili vpliva ACEA na višje izražanje gena *CNR1*, smo na podlagi rezultatov z višjo izraženostjo tega gena pri vzorcih astmatikov v primerjavi z vzorci zdravih posameznikov potrdili rezultate nedavne raziskave [71].



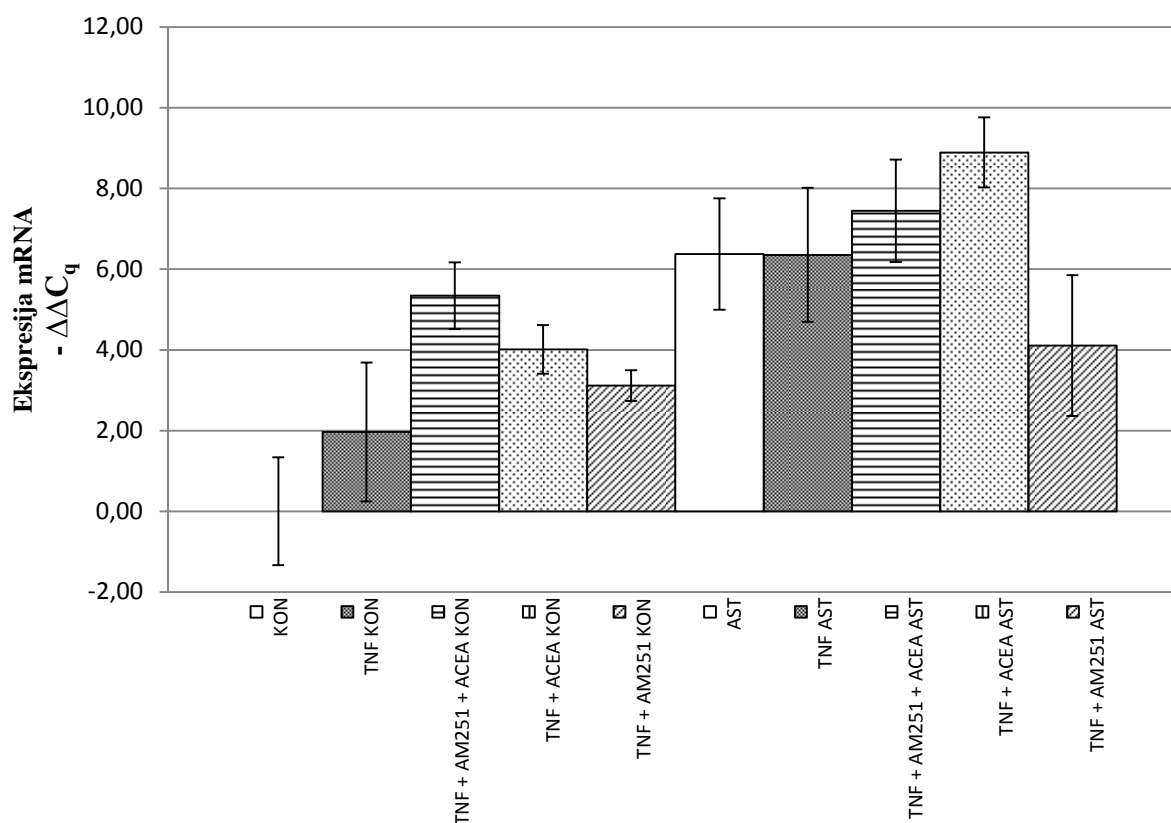
Slika 4-33: Stopnja izražanja gena *CNR1* po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).



Slika 4-34: Stopnja izražanja gena *IL4* po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).

Opazno višje izražanje gena *IL5* ($8,89 \pm 0,87$) je bilo pri celicah vzorcev astmatikov tretiranih s $30 \mu\text{M}$ ACEA (Slika 4-35) v primerjavi z vzorci astmatikov brez tretiranja s TNF ($6,38 \pm 1,38$) in s TNF ($6,35 \pm 1,66$). Iz tega lahko zaključimo, da je izražanje tega gena pod očitnim vplivom ACEA. Prav tako je zmanjšan nivo ekspresije *IL5* pri tretiranju v raztopini TNF z ACEA in AM251 glede na izražanje tega gena z ACEA potrdil biološki učinek ACEA preko signalizacije receptorja CB1. Ekspresija tega gena je bila tudi pri vseh tretiranih in ne tretiranih celicah astmatičnih vzorcev opazno višja glede na kontrolne zdrave skupine.

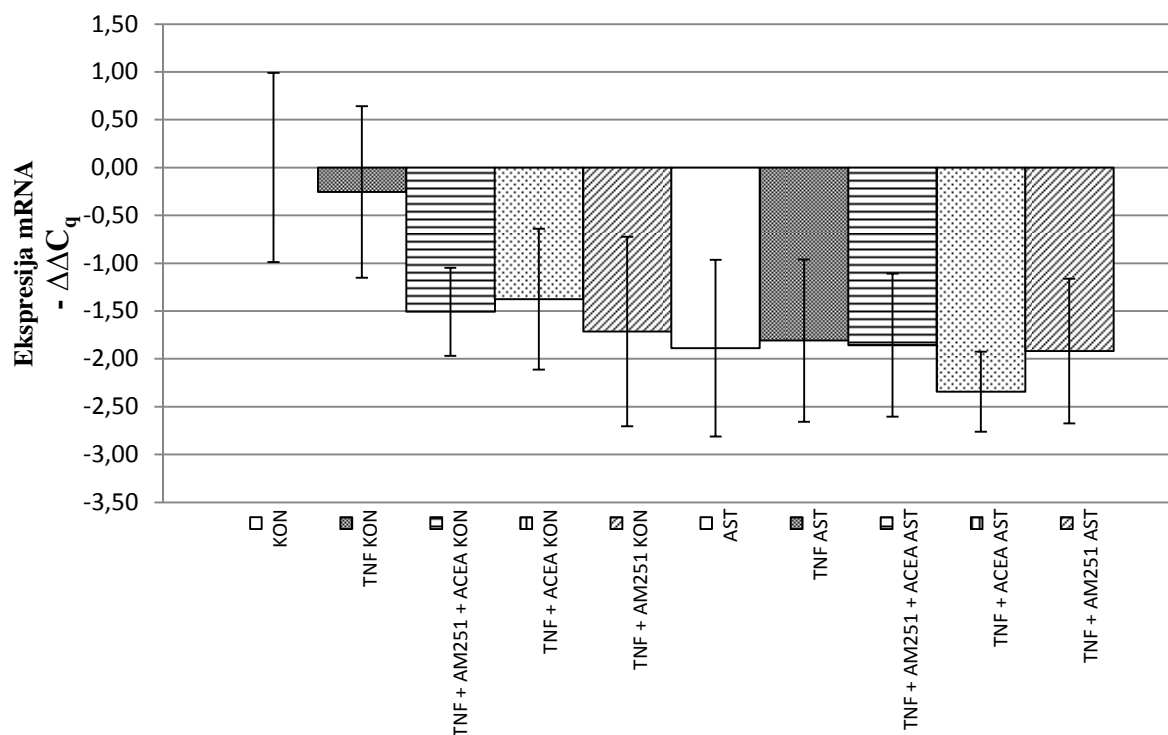
Številne študije, ki so raziskovale vpliv kanabinoidov na izražanje citokinov so poročale, da ti vplivajo na povišano izražanje genov *IL5* in *IL4* [57], spet druge so poročale o negativnem vplivu na izražanje *IL4* [72,73]. Tako lahko na podlagi rezultatov v naši raziskavi s vplivom ACEA na višje izražanje *IL5* in negativne opaženosti tega vpliva na *IL4* delno potrdimo ene in druge študije in se pridružujemo sklepu o kontradiktornosti vpliva na Th2 izražanje citokinov.



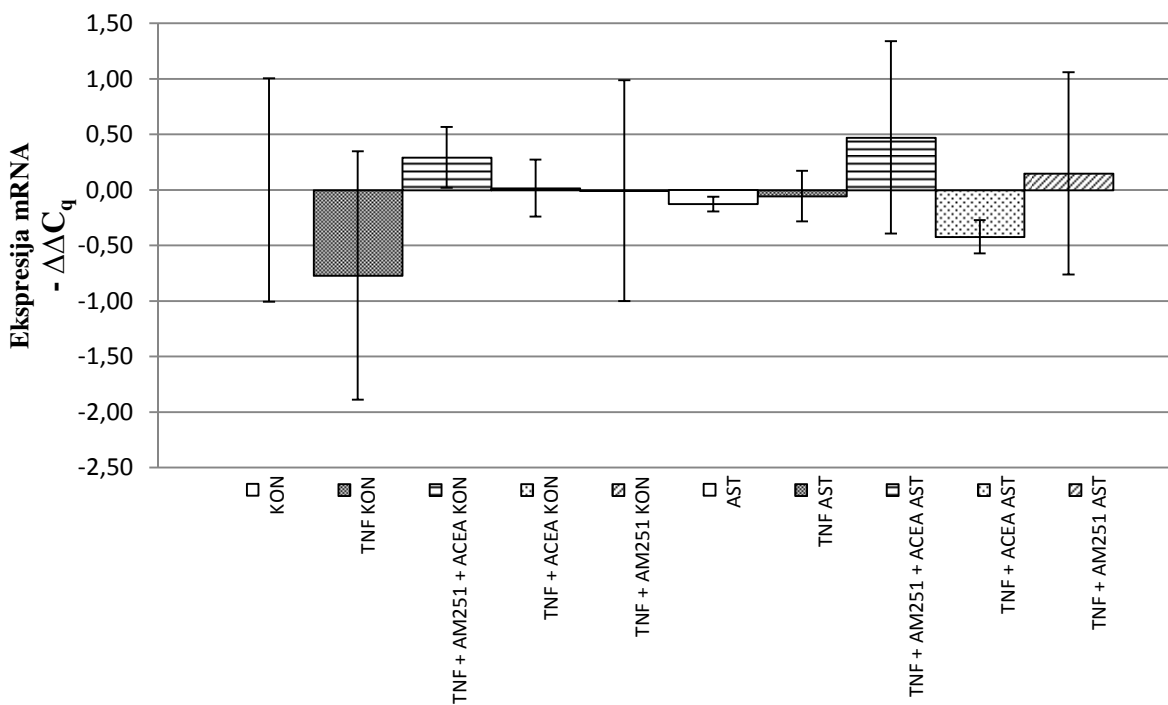
Slika 4-35: Stopnja izražanja gena *IL5* po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

Izražanje genov *CNR2*, *IL8*, *IL10* in *CSF2* je bilo minimalno oz. negativno glede na kontrolo (KON) (Slike 4-36 - 4-39).

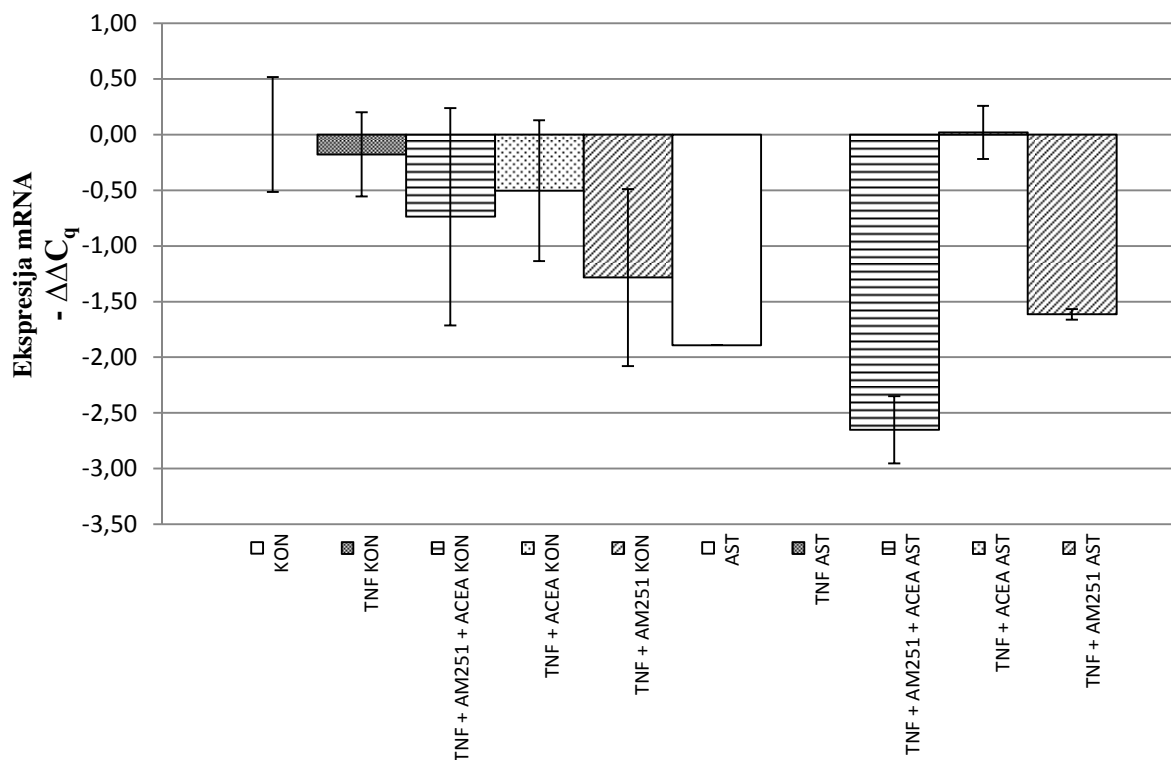


Slika 4-36: Stopnja izražanja gena *CNR2* po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).

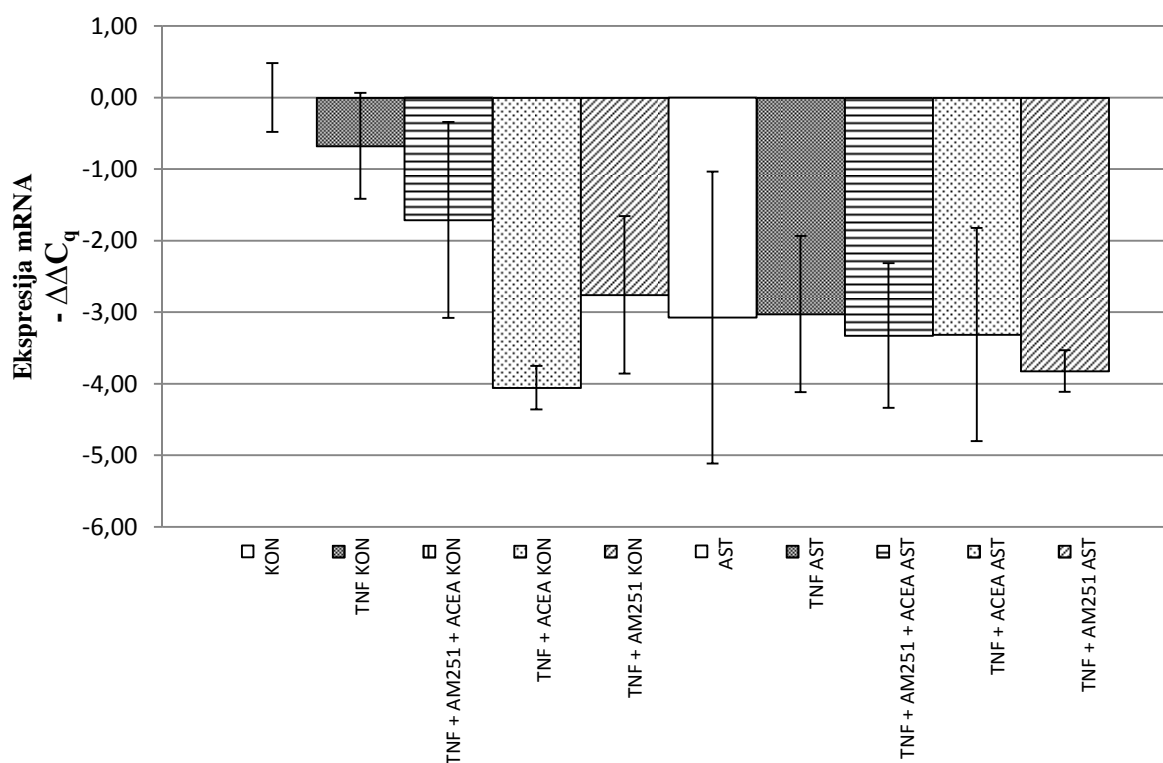


Slika 4-37: Stopnja izražanja gena *IL8* po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 4-38: Stopnja izražanja gena *IL10* po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).



Slika 4-39: Stopnja izražanja gena *CSF2* po inkubaciji z ACEA ob predhodni inkubaciji z AM251 (KON-zdravi vzorci, AST-vzorci astmatikov).

5 Zaključek

Zaključimo lahko, da postaja vse bolj jasno, da endokanabinoidni sistem igra ključno vlogo pri regulaciji imunskega sistema in da različne raziskave, vključno z našo ki ugotavljajo terapevtske učinke kanabinoidov tako sintetičnih, kot naravnih rastlinskih, napovedujejo novo priložnost za zdravljenje vnetnih bolezni kot je astma.

Naša raziskava je potrdila našo hipotezo, da agonisti in antagonisti kanabinoidnega receptorja CB1 vplivajo na izločanje vnetnih citokinov tako pri zdravih posameznikih kot pri bolnikih obolelih za astmo. Analize so pokazale tudi vpliv sintetičnih kanabinoidov na izražanje *CNRI*, gena kanabinoidnega receptorja CB1 pri zdravih posameznikih. Tega pri bolnikih obolelih za astmo sicer nismo potrdili, vendar na podlagi raziskave dveh vzorcev astmatičnih bolnikov tega ne moremo dokončno ovreči in bo za potrditev povezav kanabinoidov z izražanjem gena *CNRI* pri astmatičnih bolnikih potrebno večje število preiskovancev in dodatne analize.

Naša obsežna raziskava je sicer podala odgovore na veliko znanstvenih vprašanj, vendar kot je značilno za znanstveno raziskovanje, so nekatere zadeve ostale nepojasnjene, nekaj pa se jih je pokazalo na novo. Najbolj opazen in nepojasnen rezultat je proteinska lisa velikosti približno 37 kDa, ki se je pojavila na membrani prenosa western po inkubaciji z anti-CB1 protitelesi. Potrebne so nadaljne bazične raziskave na podlagi večjega števila bolnikov in širše izbire kanabinoidov za tretiranje celic. Prav tako pa so potrebne predklinične in klinične raziskave, če bi želeli ugotoviti dejansko terapevtsko uporabnost kanabinoidov pri bolnikih z astmo.

Čeprav take raziskave še ne pomenijo nujno običajne uporabe kanabinoidov kot del klinične farmakologije v prihodnosti, so lahko učinkovito orodje za odkrivanje kompleksnosti in mehanizma delovanja kanabinoidov in endokanabinoidnega sistema. Problem klinične uporabe kanabinoidov so še vedno njihovi potencialno psihotropni učinki. Zato prihodnji izzivi za uporabo kanabinoidov kot protivnetnih zdravil vključujejo tudi sintezo agonistov in antagonistov kanabinoidnih receptorjev s protivnetno aktivnostjo in brez nezaželenih učinkov na centralni živčni sistem.

6 Literatura

- [1] International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998; 351: 1225-32
- [2] McGrath KW, Icitovic N, Boushey HA, Lazarus SC, Sutherland ER, Chinchilli VM, Fahy JV. A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2012; 185(6): 612-9
- [3] Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. *Interna medicina*. 4. izdaja, Ljubljana : Littera picta : Slovensko medicinsko društvo, 2011
- [4] King TE. A new look at the pathophysiology of asthma. *Journal of the National Medical Association* 1999; 91(8):9S-15S.
- [5] Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73
- [6] Lemanske RF. Inflammation in Childhood Asthma and Other Wheezing Disorders. *Pediatrics* 2002; 109: 388 – 72.
- [7] Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol* 2002; 38:881-5.
- [8] Madore A, Laprise C. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy* 2010; 3: 107-121
- [9] Barbara JA, Van ostade X, Lopez A. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunology and Cell Biology* 1996; 74(5): 434-443
- [10] Ruuls SR, Sedgwick JD. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 294-301
- [11] Bharat B. Aggarwal, Subash C. Gupta, Ji Hye Kim. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012; 119:651-665
- [12] Dale MM, Rang HP, Ritter JM, Flower RJ. *Rang and Dale's pharmacology*. 6th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2007.
- [13] Wikipedia, Astma. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Astma> (dostop 13.6.2016)
- [14] Agudo J, Martin M, Roca C, Molas M, Bura AS, Zimmer A, et al. Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia* 2010; 53(12): 2629-2640
- [15] Batkail S, Pacher P, Kunos G. Endocannabinoids are potent modulators of cardiovascular function in hypertension. *Faseb Journal* 2005; 19(5): A1616-A1616
- [16] Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine Reviews* 2006; 27(1): 73-100
- [17] Calignano A, Katona I, Desarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, et. Al. Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* 2000; 408(6808): 96-101
- [18] Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: An overview. *Immunobiology* 2010; 215(8): 588-597

- [19] Ferjan I, Kržan M, Lipnik Štangelj M, Žiberna L, Stanovnik L, Černe K. Farmakologija kanabinoidov. Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani. Ljubljana: Zdrav Vestn 2015; 84: 456–71
- [20] Achiron A, Miron S, Lavie V, Margalit R, Biegon A. Dexanabinol (HU-211) effect on experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 102(1): 26-31.
- [21] Jan TR, Farraj AK, Harkema JR, Kaminski NE. Attenuation of the ovalbumin-induced allergic airway response by cannabinoid treatment in A/J mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 188(1): 24-35
- [22] Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(17): 9561-9566
- [23] Sumariwalla PF, Gallily R, Tchilibon S, Fride E, Mechoulam R, Feldman M. A novel synthetic, nonpsychoactive cannabinoid acid (HU-320) with antiinflammatory properties in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2004; 50(3): 985-98
- [24] Fine PG, Rosenfeld MJ. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides medical journal* 2013; 4(4): eo22
- [25] Zogopoulos P, Vasieiou I, Patsouris E, Theocharis SE. The role of endocannabinoids in pain modulation. *Fundamental and clinical pharmacology* 2013; 27(1): 64-80
- [26] Fonseca BM, Costa MA, Almada M, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective. *Prostaglandins and other lipid mediators* 2013; 102-103: 13-30
- [27] Alger BE, Kim J. Supply and demand for endocannabinoids. *Trends in neuroscience* 2011; 34(6): 304-315
- [28] Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today* 2010; 15(11-12): 474-483
- [29] Di Marzo V, Melck D, Biosogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences* 1998; 21(12): 521-528.
- [30] Fine PG, Rosenfeld MJ. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides medical journal* 2013; 4(4): e00022
- [31] Štampelj M, Ferjan I. Kanabinoidi-njihovo delovanje in učinki. *Cannabinoids - their action and effects. Farm Vestn* 2006; 57(1): 30-33
- [32] Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* 2006; 58(3): 389-462.
- [33] Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-564
- [34] Galiegue S, Mary S, Marchand J. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry/FEBS* 1995; 232(1): 54-61
- [35] McPartland JM, Glass M. Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates. *Gene* 2003; 312: 297-303

- [36] Munro S, Thomas KL, Abushaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365(6441): 61-65
- [37] Sugiura T, Waku K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *Journal of Biochemistry* 2002; 132(1): 7-12
- [38] Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153(2): 240-251
- [39] Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74(2): 129-80
- [40] Andres-Mach M, Haratym-Maj A, Zagaja M, Rola R, Maj M, Chrościńska-Krawczyk M, Luszczki JJ. ACEA (a highly selective cannabinoid CB1 receptor agonist) stimulates hippocampal neurogenesis in mice treated with antiepileptic drugs. *Brain Research* 2015; 1624: 86-94
- [41] Lan R1, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem.* 1999; 42(4):769-76
- [42] Seely KA, Brents LK, Franks LN, Rajasekaran M, Zimmerman SM, Fantegrossi WE, Prather PL. AM-251 and rimonabant act as direct antagonists at mu-opioid receptors: implications for opioid/cannabinoid interaction studies. *Neuropharmacology* 2012; 63(5): 905-15
- [43] Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ. Cannabinoids, eating behavior, end energy homeostasis. *Drug testing and analysis* 2014; 6(1-2): 52-58
- [44] Ulugol A, Karadag HC, Ipci Y, Tamer M, Dokmeci I. The effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on tactile allodynia in diabetic rats. *Neurosci. Lett.* 2004; 371, 167-170
- [45] Woodhams SG, Sagar DR, Burston JJ, Champhan V. The role of the endocannabinoid system in pain. *Handbook of experimental pharmacology* 2015; 227: 119-143
- [46] Arevalo-Martin A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2003; 23(7): 2511-2516
- [47] Fraga D, Zanoni CI, Rae GA, Parada CA, Souza GE. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(8): 1494-501
- [48] Pourkhalili N, Ghahremani MH, Farsandaj N, et al. Evaluation of anti-invasion effect of cannabinoidson human hepatocarcinoma cells. *Toxicology mechanisms and methods* 2013; 23(2): 120-126
- [49] Krishnan S, Cairns R, Howard R. Cannabinoids for the treatment of the dementia. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2009(2): CD007204
- [50] Clinical Trials. <https://clinicaltrials.gov/> (dostop 14.8.2016)
- [51] Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 2010; 215(8): 588-97
- [52] Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* 2010; 215(8): 598-605.
- [53] Klein TW, Cabral GA. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1(1): 50-64

- [54] Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol* 2005; 166(1-2): 3-18
- [55] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 2007; 87(1): 315-424
- [56] Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res.* 1999; 839(1):173-9.
- [57] Massi P, Vaccani A, Parolaro D. Cannabinoids, immune system and cytokine network. *Curr Pharm Des* 2006; 12(24): 3135-3146
- [58] Jan TR, Farraj AK, Harkema JR, Kaminski NE. Attenuation of the ovalbumin-induced allergic airway response by cannabinoid treatment in A/J mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 188(1): 24-35
- [59] Abboud RT, Sanders HD. Effect of oral-administration of delta-9tetrahydrocannabinol on airway mechanics in normal and asthmatic subjects. *Chest* 1976; 70(4): 480-485
- [60] Calignano A, Katona I, Desarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, et al. Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* 2000; 408(6808): 96-101
- [61] Sancho R, Calzado MA, Di Marzo V, Appendino G, Munoz E. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol Pharmacol* 2003; 63(2): 429-438
- [62] Zoerner AA, Stichtenoth DO, Engeli S, Batkai S, Winkler C, Schaumann F, et al. Allergen challenge increases anandamide in bronchoalveolar fluid of patients with allergic asthma. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90(3): 388-391
- [63] Borner C, Smida M, Holt V, Schraven B, Kraus J. Cannabinoid receptor type 1-and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cells receptor-triggered signaling. *J Biol Chem* 2009; 284(51): 35450-35460
- [64] Klein TW, Newton CA, Nakachi N, Friedman H. delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to Legionella pneumophila infection. *J Immunol* 2000; 164(12): 6461-6466
- [65] Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Genska informacija in kako do nje. PCR in njegove izpeljanke. Slovensko farmacevtsko društvo; 2007: 55-58
- [66] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25; 2001: 402-408
- [67] Pečar Fonovič U, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirkovič B, Rojnik M, Pišlar A, Kos J. Vaje iz farmacevtske biokemije. Hibridizacija: prenos western. 1. Popravljen izdaja. Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo, katedra za farmacevtsko biologijo, Ljubljana 2014: 90-92
- [68] Wikipedija, Pretočna citometrija. https://sl.wikipedia.org/wiki/Preto%C4%8Dna_citometrija (dostop 17.8.2016)
- [69] Kutscher S, Dembek CJ, Deckert S, Russo C, Körber N, Bogner JR, Geisler F, Umgelter A, Neuenhahn M, Albrecht J, Cosma A, Protzer U, Bauer T. Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T- cell responses: impact for immune monitoring within clinical trials. *PLoS One.* 2013 Oct 11;8(10):e76215

- [70] Bour ES, Ward LK, Cornman GA, Isom HC. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in hepatocytes in long-term culture. *The American Journal of Pathology* 1996 Feb;148(2):485-95.
- [71] Tjaša Brenčič. Genotipizacija in ekspresija kanabinoidnih receptorjev CNR1 in CNR2 pri bolnikih z astmo. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, diplomska naloga 2015
- [72] Greineisen WE, Turner H. Immunoactive effects of cannabinoids: considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(5): 547-555
- [73] Berdyshev EV. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids* 2000; 108(1-2): 169-190

6.1 Viri slikovnega materiala

- (1) The Harvard Medical School. Guide to Taking Control of Asthma: Chapter 1: What is Asthma?, 2010.
<http://www.asthma.partners.org/NewFiles/HMSTakingControlOfAsthmaChapter1.html> (dostop 21.7.2016)
- (2) Sang Yeub Lee, M.D., and Kwang Ho In, M.D. Immunopathogenesis of Asthma. Division of Respiratory and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Korea University, Anam Hospital, Seoul, Korea *Tuberc Respir Dis.* 2006;60(4):379-390
- (3) KEGG. Asthma - Homo sapiens (human).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/83120> (dostop 2.8.2016)
- (4) Kruger L, Light AR, Translational Pain Research: From Mouse to Man. Chapter 5: Therapeutic Targeting of Peripheral Cannabinoid Receptors in Inflammatory and Neuropathic Pain States. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis; 2010
- (5) Ivan Yong. PBMC Isolation using Lymphoprep.
<https://www.linkedin.com/pulse/pbmc-isolation-using-lymphoprep-ivan-yong> (dostop 25.7.2016)
- (6) Gentaaur. EzWay RI Reagent (RNA Isolation).
http://apoptosed.com/new_page_167.htm (dostop 17.8.2016)
- (7) Jo Vandesompele professor, Ghent University co-founder and CEO, Biogazelle Bioinformatics for the Medical Molecular Laboratory HOWEST. Bioinformatics and PCR, 18 oktober 2011. <http://slideplayer.com/slide/5941926/> (dostop 18.8.2016)
- (8) Wikipedia, Western blot. https://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot (dostop 21.8.2016)

7 Priloge

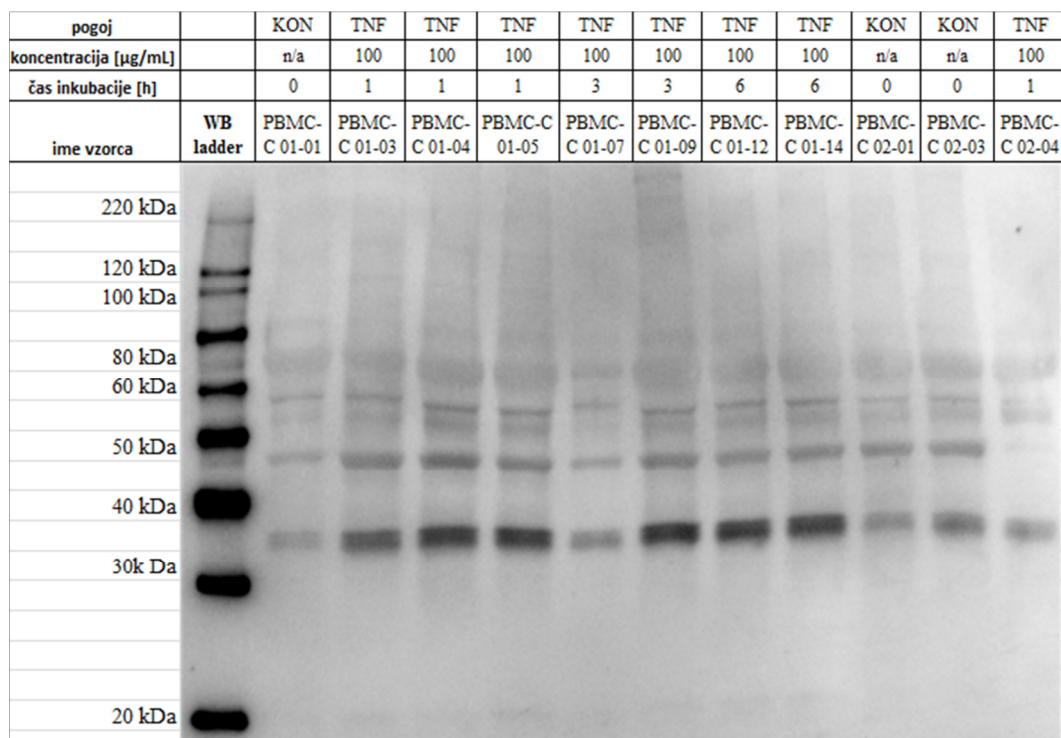
7.1 Priloga 1

Fotografije membran prenosa western pri iskanju optimalnih parametrov za inkubacijo.

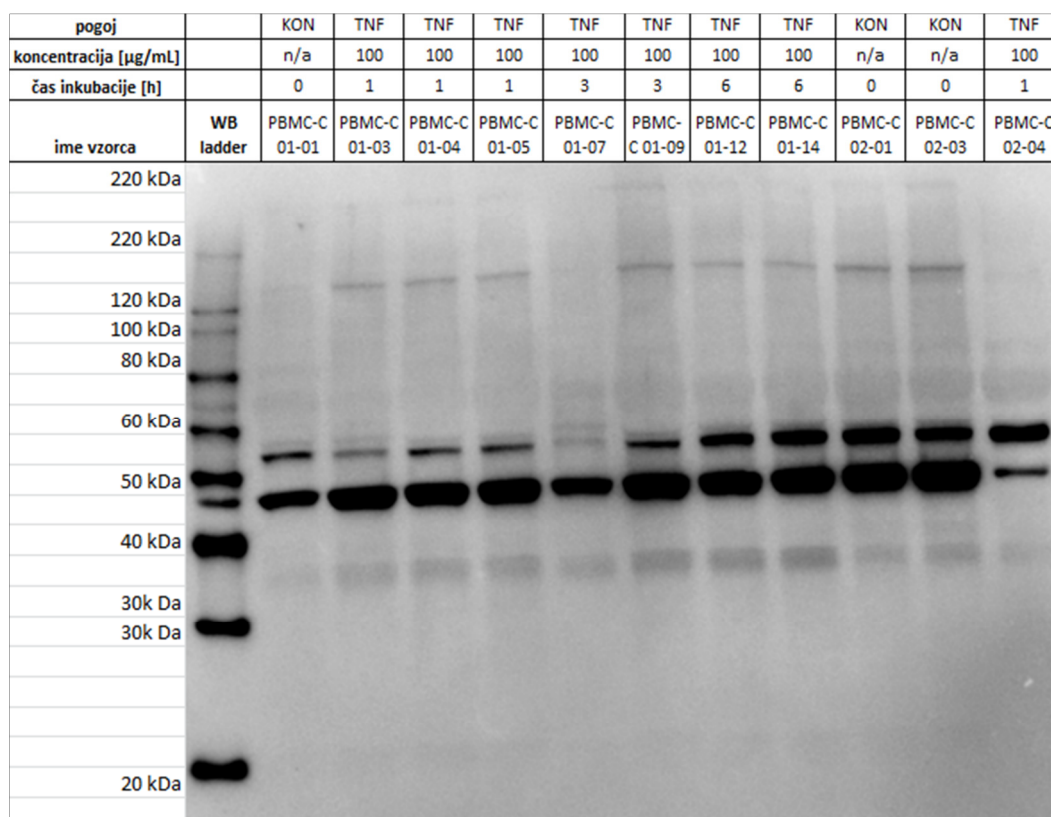
Tabela 7-1: Seznam informacij o vzorcih proteinov prenosa western pri optimizaciji parametrov.

vzorec	celice	pogoj	koncentracija	Čas inkubacije
Optimizacija časa inkubacije PBMC s TNF (1.eksperiment)				
PBMC-C 01-01	PBMC	KON	n/a	0
PBMC-C 01-03	PBMC	TNF	100 µg/mL	1
PBMC-C 01-04	PBMC	TNF	100 µg/mL	1
PBMC-C 01-05	PBMC	TNF	100 µg/mL	1
PBMC-C 01-07	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-C 01-09	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-C 01-12	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
PBMC-C 01-14	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
Optimizacija časa inkubacije PBMC s TNF (2. Eksperiment)				
PBMC-C 02-01	PBMC	KON	n/a	0
PBMC-C 02-03	PBMC	KON	n/a	0
PBMC-C 02-04	PBMC	TNF	100 µg/mL	1
PBMC-C 02-05	PBMC	TNF	100 µg/mL	1
PBMC-C 02-07	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-C 02-09	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-C 02-11	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
PBMC-C 02-12	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
PBMC-C 02-14	PBMC	TNF	100 µg/mL	9
PBMC-C 02-15	PBMC	TNF	100 µg/mL	9
Optimizacija časa inkubacije PBMC s TNF (3. Eksperiment)				
PBMC-01	PBMC	KON	n/a	3
PBMC-02	PBMC	KON	n/a	3
PBMC-05	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-07	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-11	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
PBMC-12	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
PBMC-15	PBMC	TNF	100 µg/mL	9
PBMC-16	PBMC	TNF	100 µg/mL	9
Optimizacija koncentracije TNF				
PBMC-C R.P.2-01	PBMC	KON	n/a	0
PBMC-C R.P.2-02	PBMC	KON	n/a	0
PBMC-C R.P.2-10	PBMC	TNF	50 µg/mL	3
PBMC-C R.P.2-12	PBMC	TNF	50 µg/mL	3
PBMC-C R.P.2-13	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-C R.P.2-15	PBMC	TNF	100 µg/mL	3
PBMC-C R.P.2-18	PBMC	KON	n/a	6
PBMC-C R.P.2-20	PBMC	KON	n/a	6
PBMC-C R.P.2-21	PBMC	TNF	50 µg/mL	6
PBMC-C R.P.2-22	PBMC	TNF	50 µg/mL	6
PBMC-C R.P.2-26	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
PBMC-C R.P.2-28	PBMC	TNF	100 µg/mL	6
PBMC-C R.P.2-29	PBMC	KON	n/a	9
PBMC-C R.P.2-31	PBMC	KON	n/a	9
PBMC-C R.P.2-34	PBMC	TNF	50 µg/mL	9
PBMC-C R.P.2-36	PBMC	TNF	50 µg/mL	9
PBMC-C R.P.2-39	PBMC	TNF	100 µg/mL	9
PBMC-C R.P.2-40	PBMC	TNF	100 µg/mL	9

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

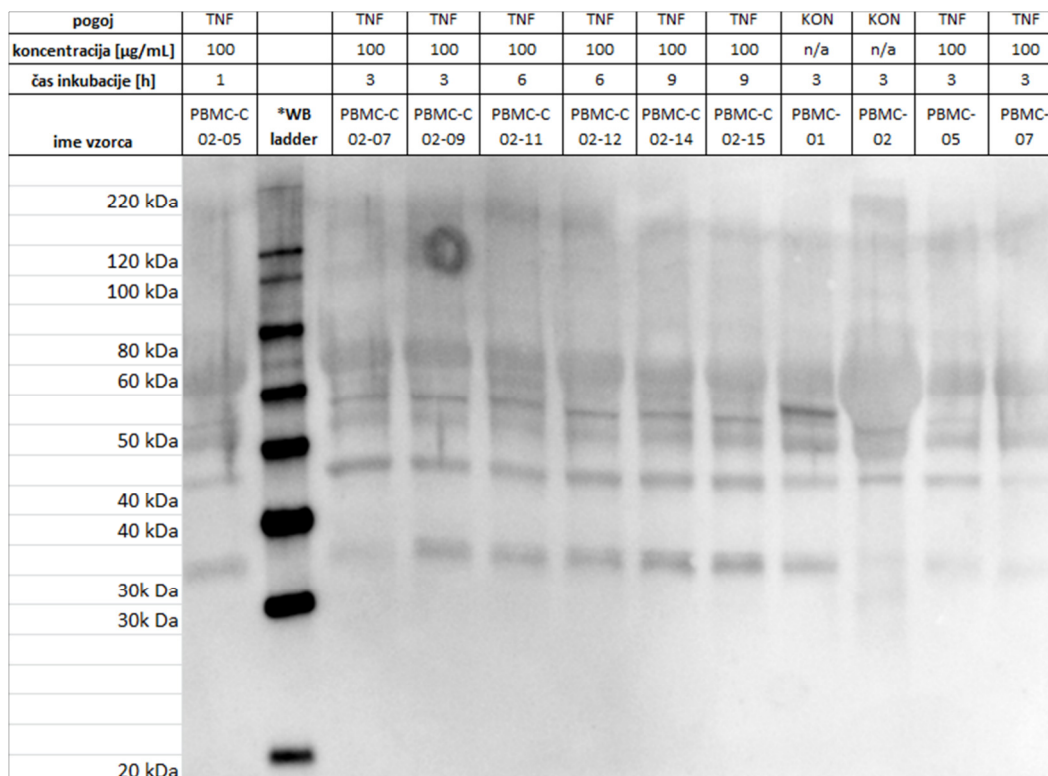


Slika 7-1: Fotografija 1. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.

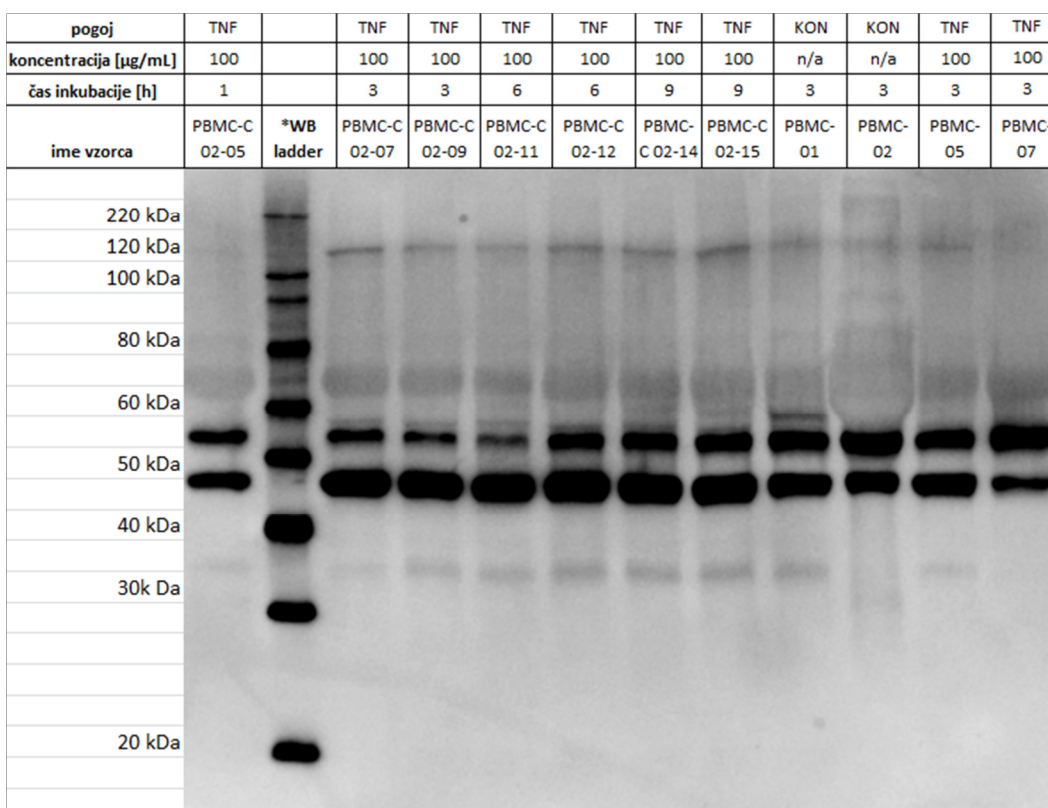


Slika 7-2: Fotografija 1. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

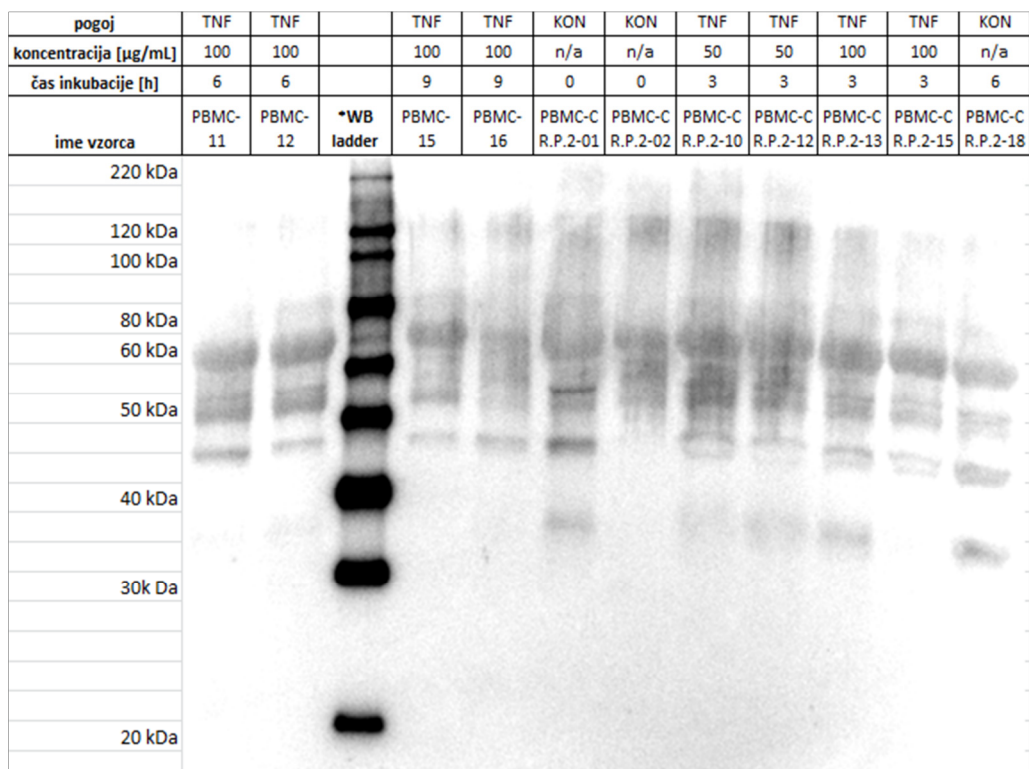


Slika 7-3: Fotografija 2. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.

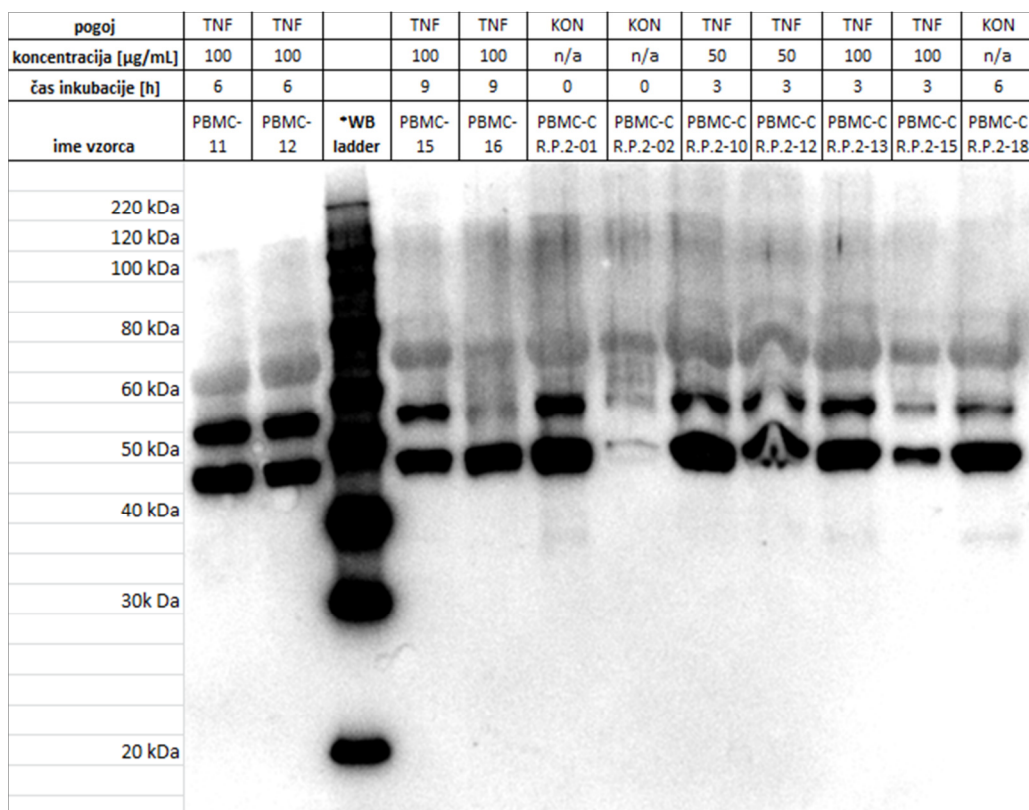


Slika 7-4: Fotografija 2. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

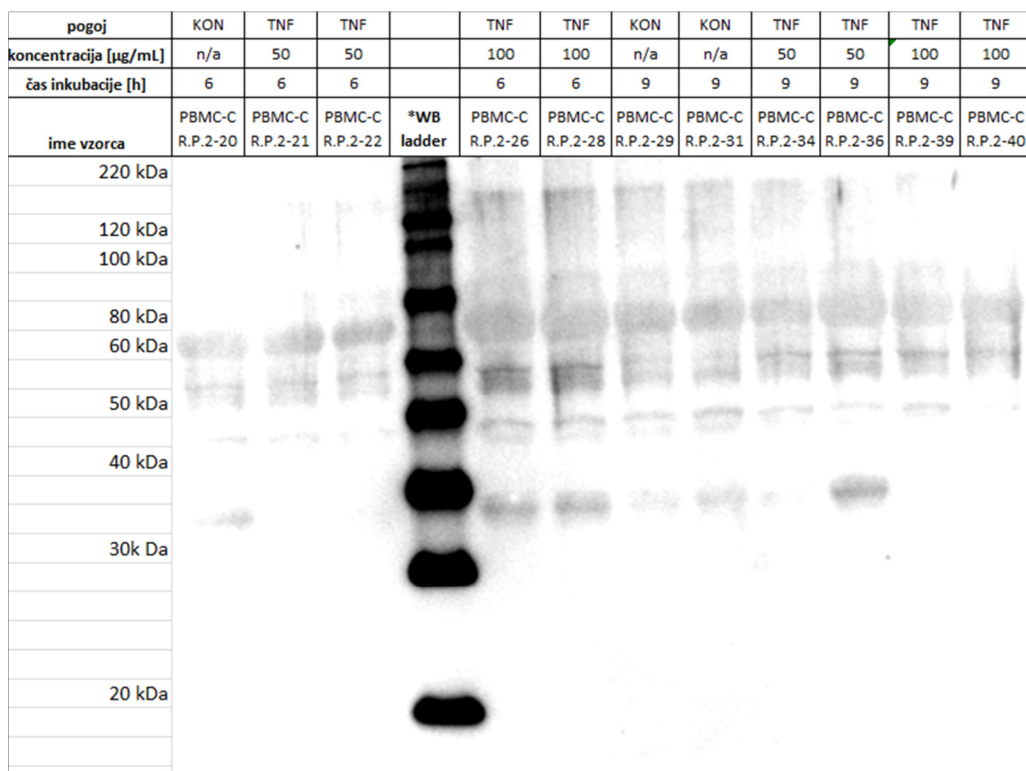


Slika 7-5: Fotografija 3. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.

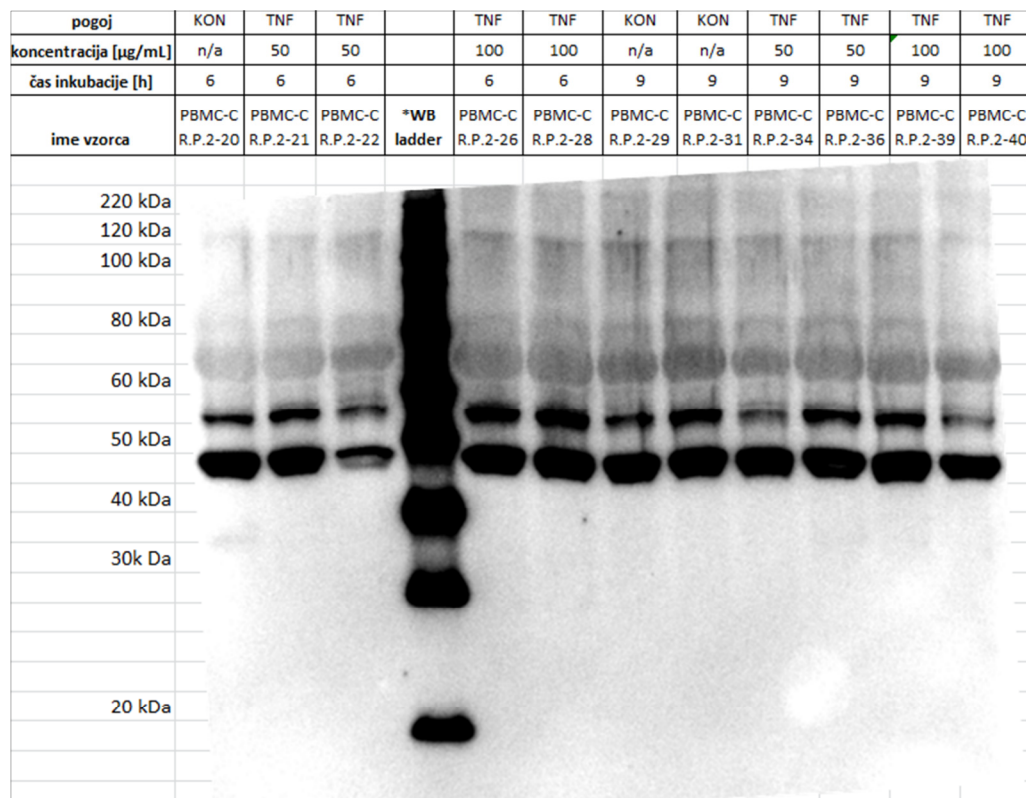


Slika 7-6: Fotografija 3. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



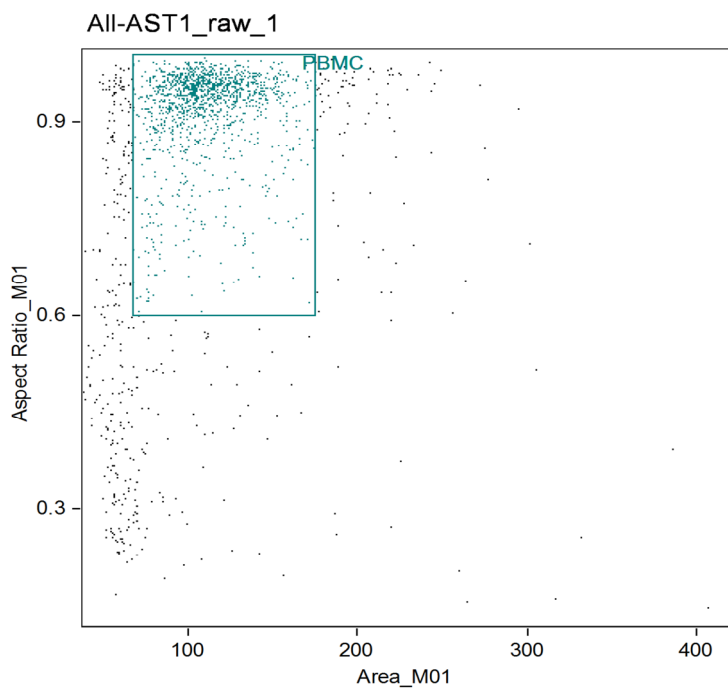
Slika 7-7: Fotografija 4. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.



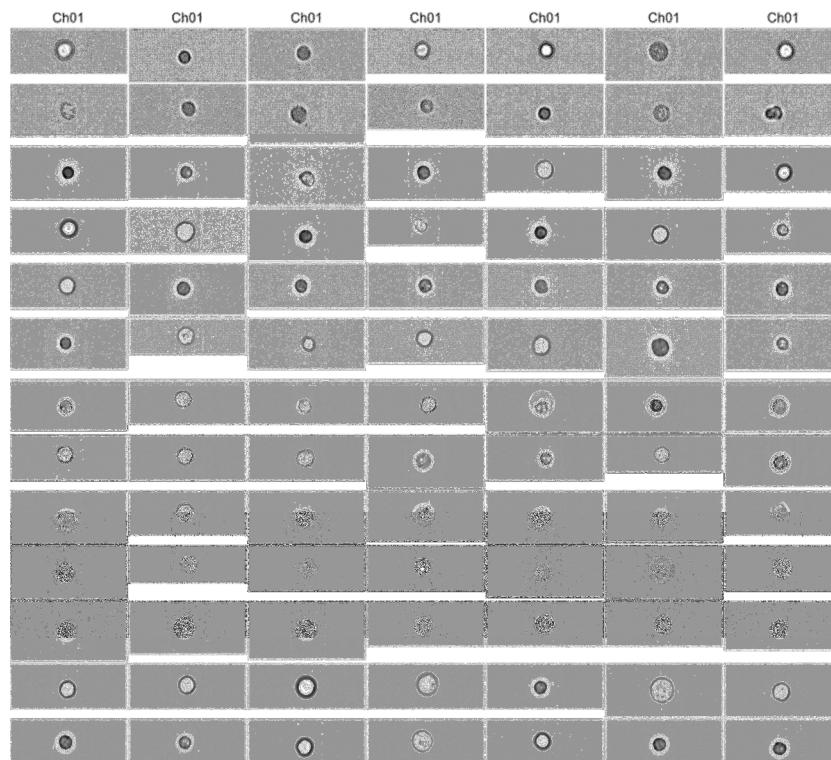
Slika 7-8: Fotografija 4. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

7.2 Priloga 2

Fotografije in grafi rezultatov pretočne citometrije.

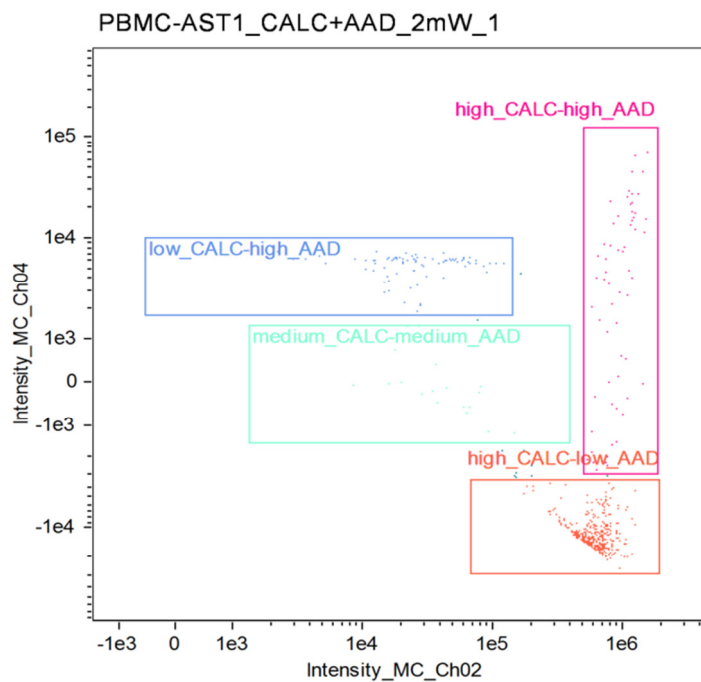


Slika 7-9: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu AST1.

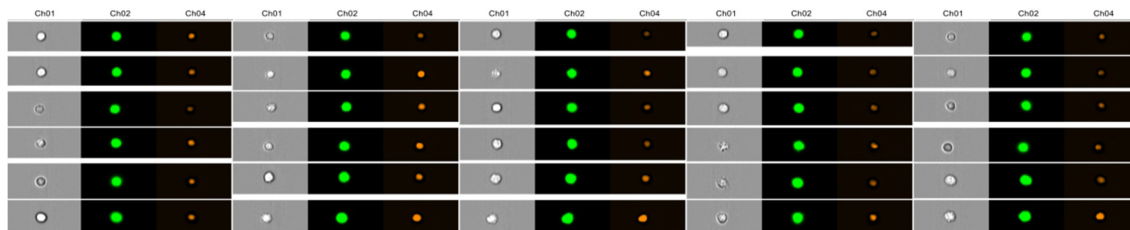


Slika 7-10: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400× povečavi v vzorcu AST1.

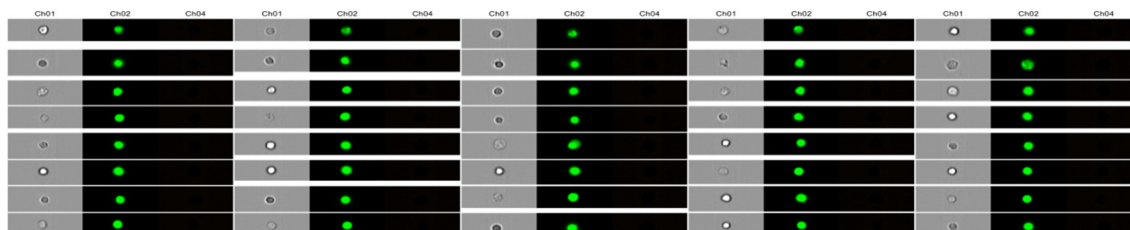
Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



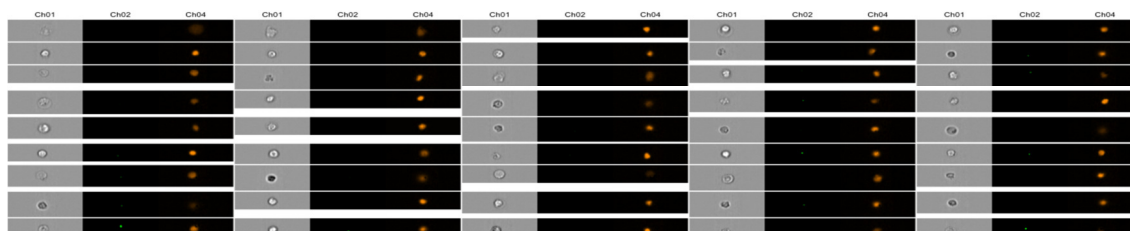
Slika 7-11: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu AST1.



Slika 7-12: Visok signal CALC in 7-AAD v vzorcu AST1.

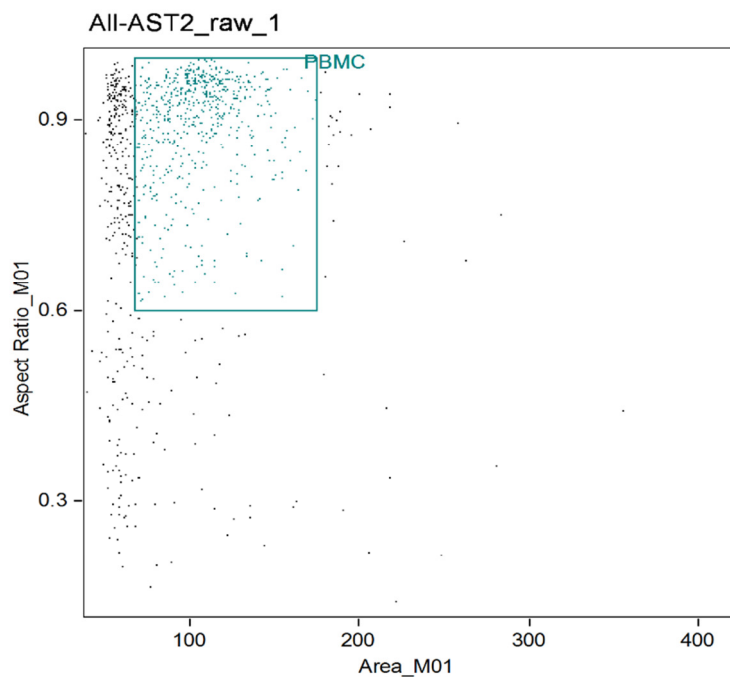


Slika 7-13: Visok signal CALC in nizek signal 7-AAD v vzorcu AST1.

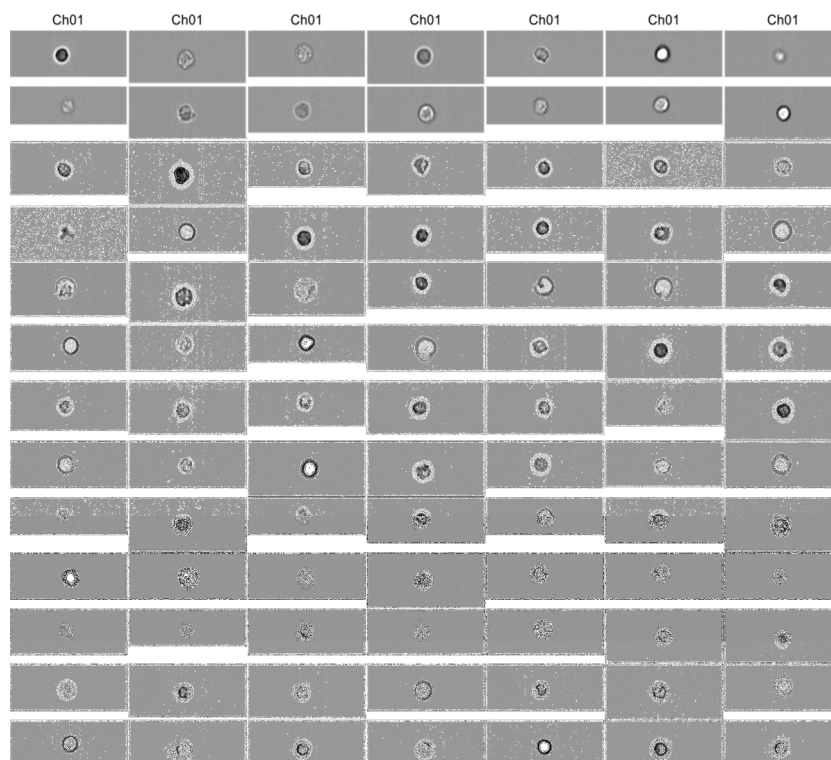


Slika 7-14: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu AST1.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

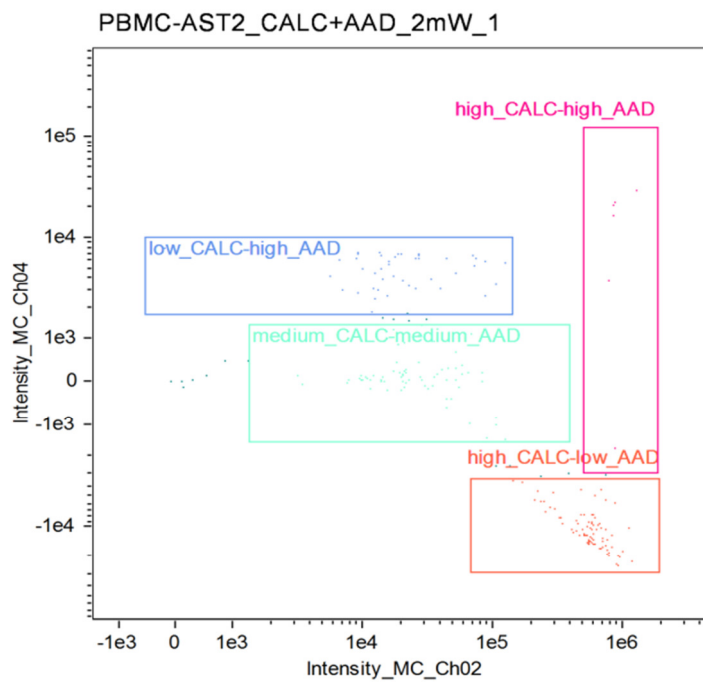


Slika 7-15: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu AST2.

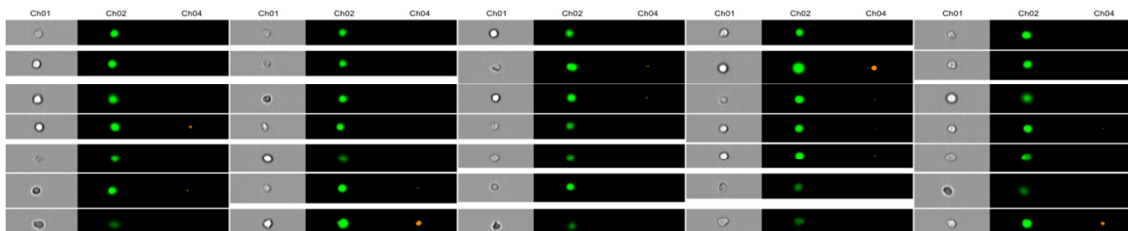


Slika 7-16: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400× povečavi v vzorcu AST1.

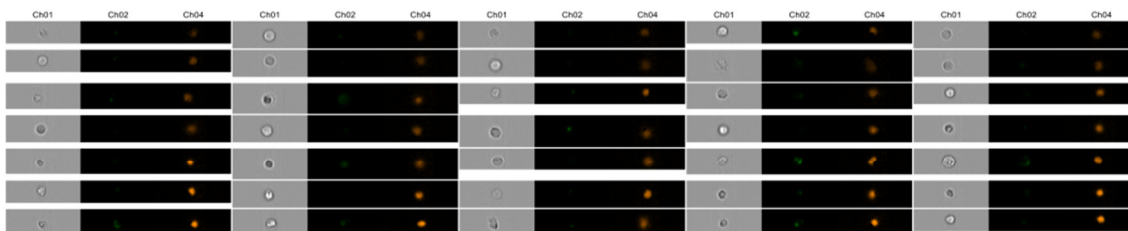
Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



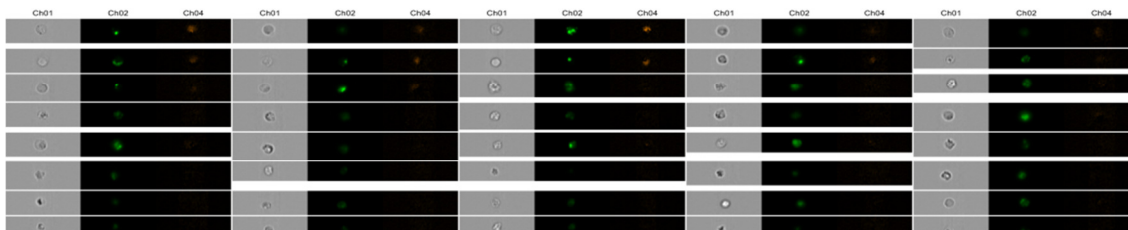
Slika 7-17: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu AST1.



Slika 7-18: Visok signal CALC in 7-AAD v vzorcu AST2.

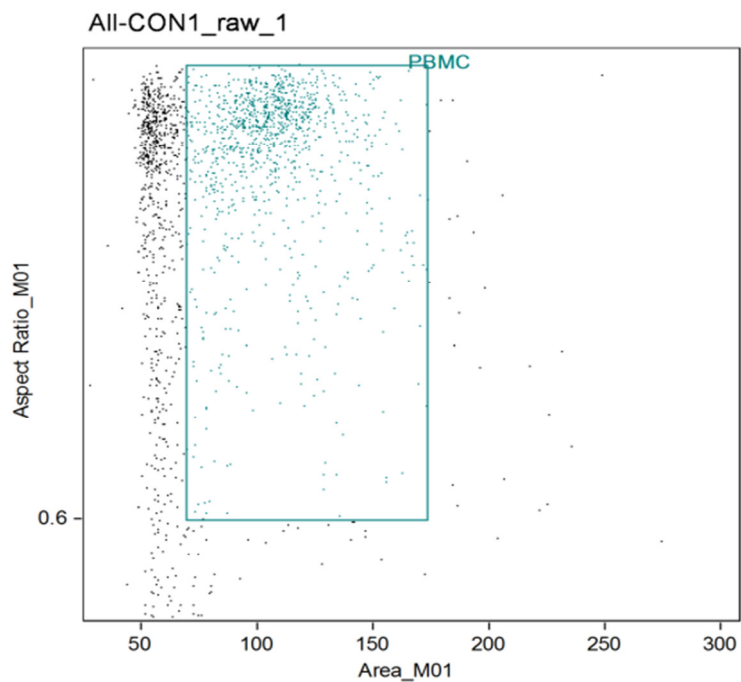


Slika 7-19: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu AST2.

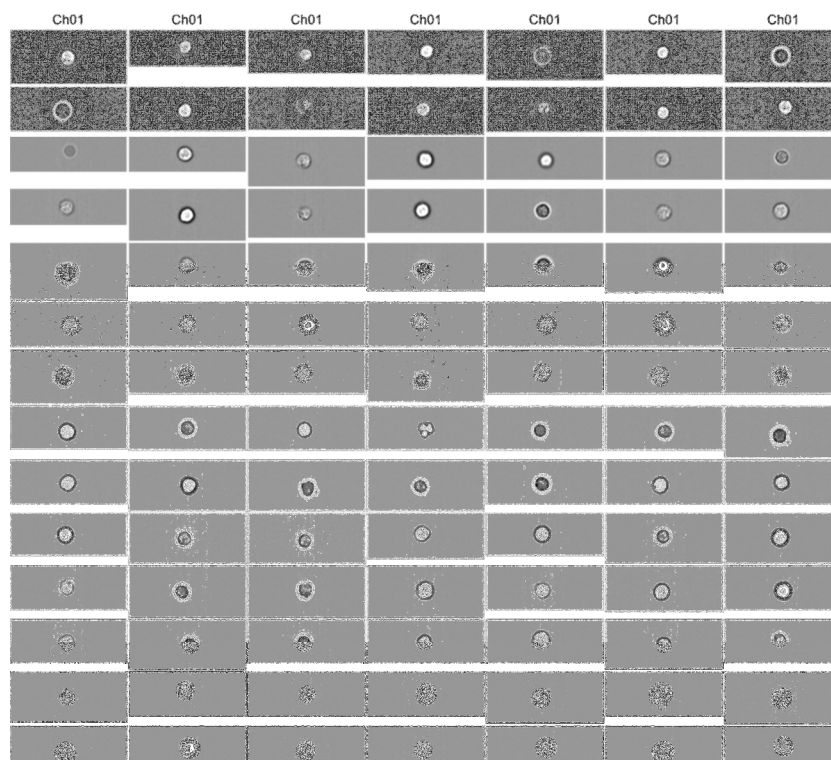


Slika 7-20: Srednji signal CALC in 7-AAD v vzorcu AST2.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

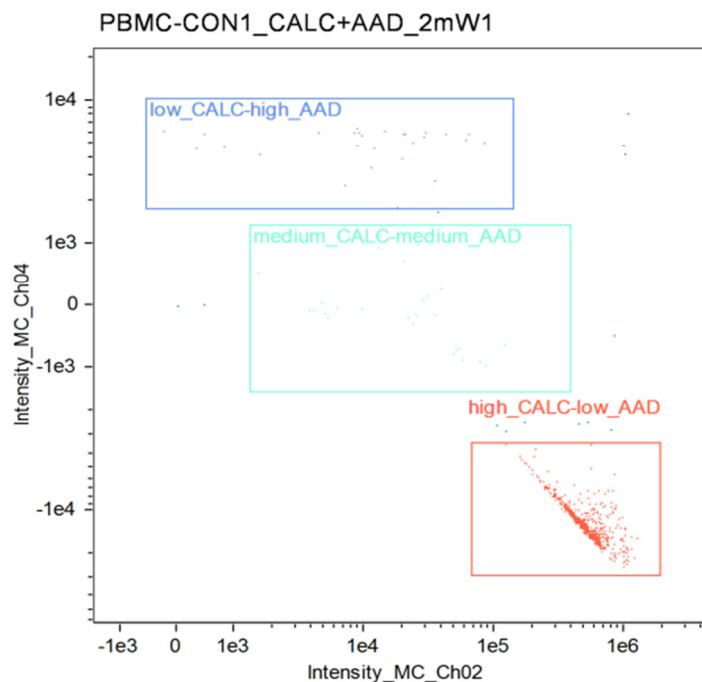


Slika 7-21: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu CON1.

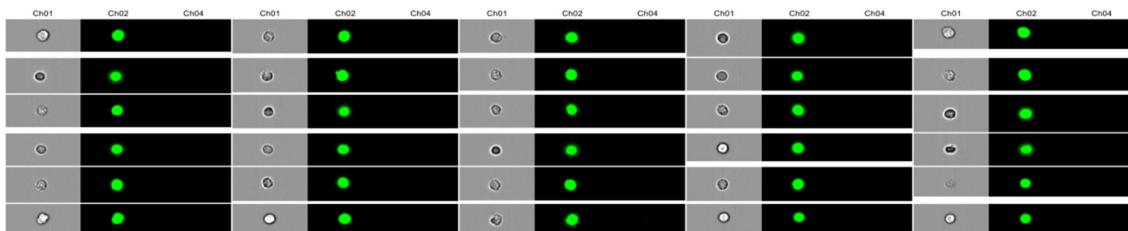


Slika 7-22: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400× povečavi v vzorcu CON1.

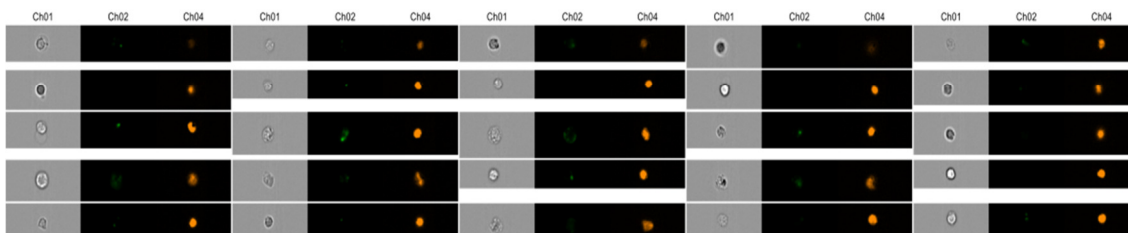
Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



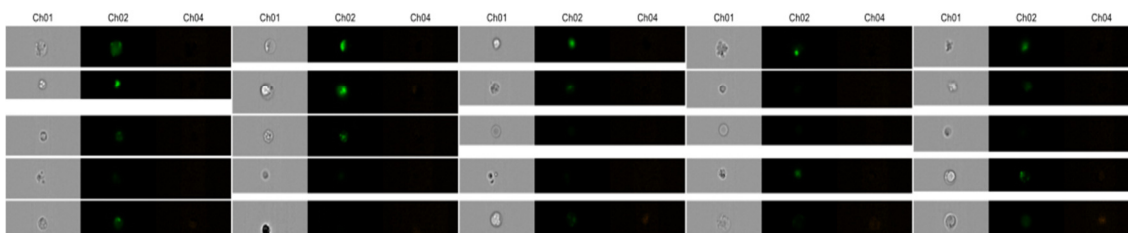
Slika 7-23: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu CON1.



Slika 7-24: Visok signal CALC in nizek signal 7-AAD v vzorcu CON1.

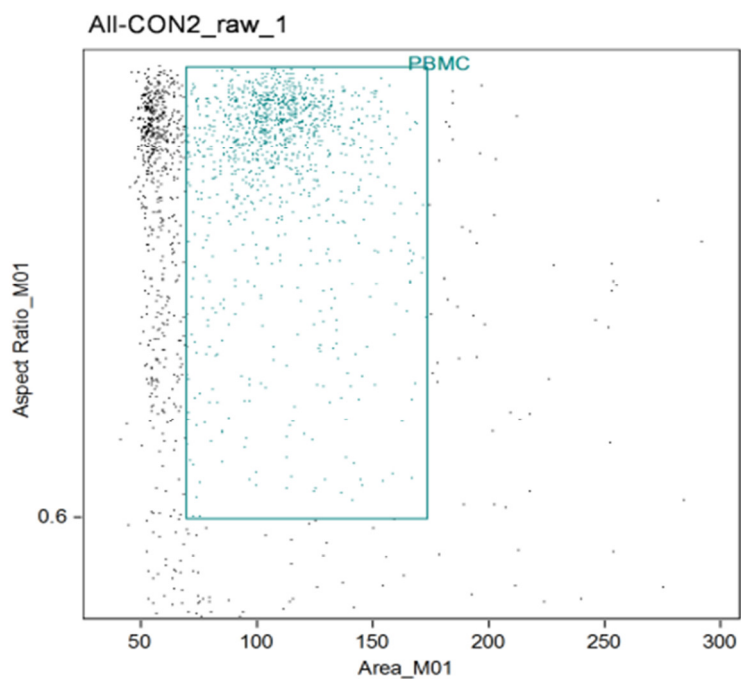


Slika 7-25: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu CON1.

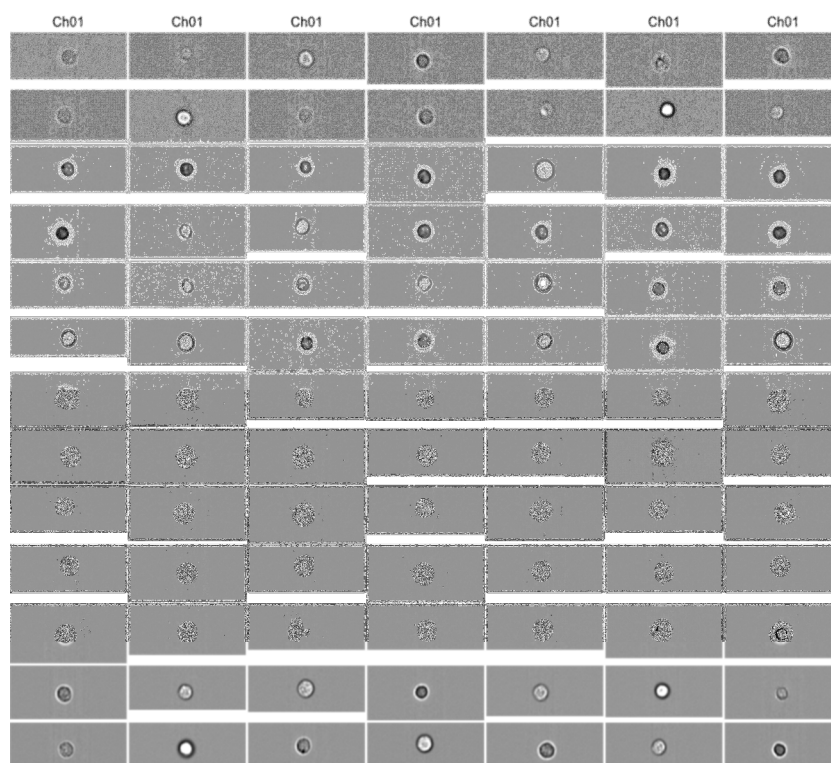


Slika 7-26: Srednji signal CALC in 7-AAD v vzorcu CON2.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

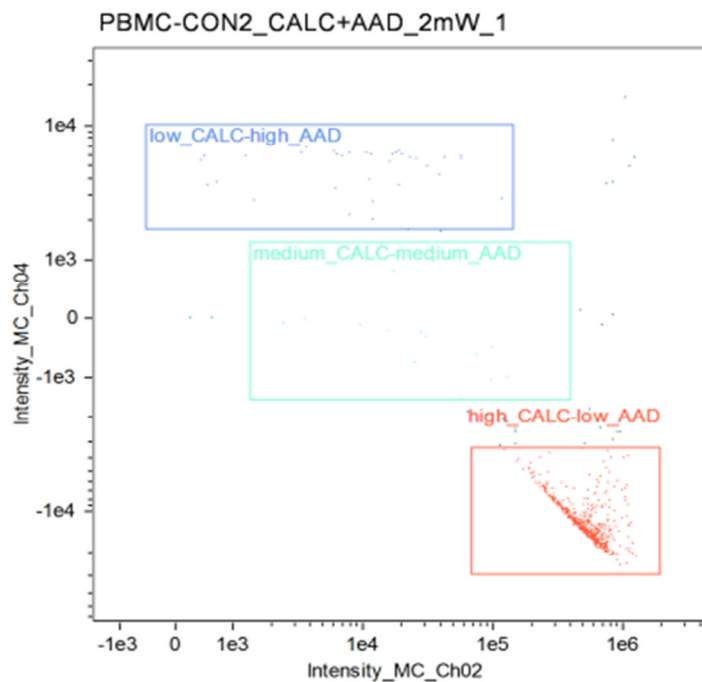


Slika 7-27: Območje PBMC glede na velikost celic in njihovo razmerje aspektov v vzorcu CON2.

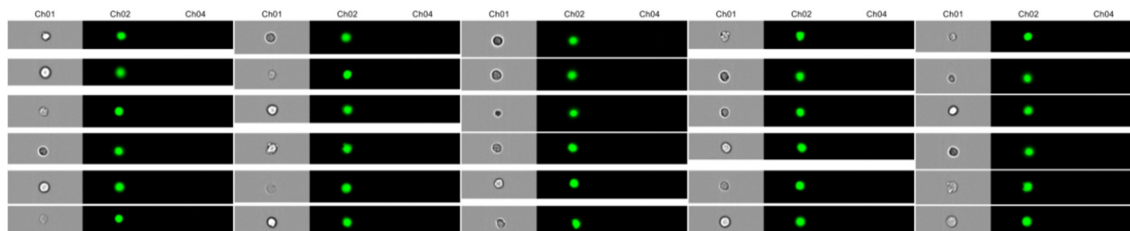


Slika 7-28: Mikroskopske fotografije celic območja PBMC pri 400x povečavi v vzorcu CON2.

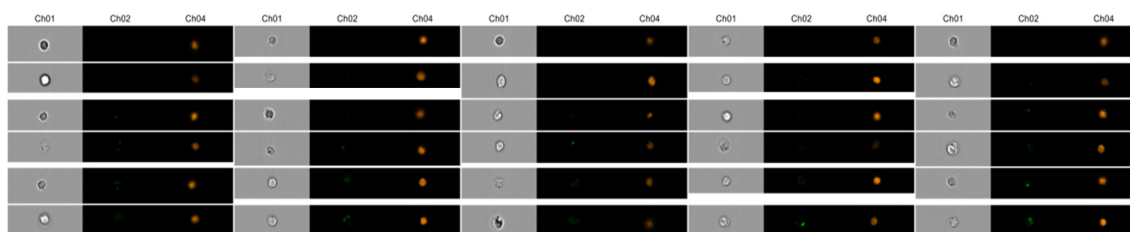
Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



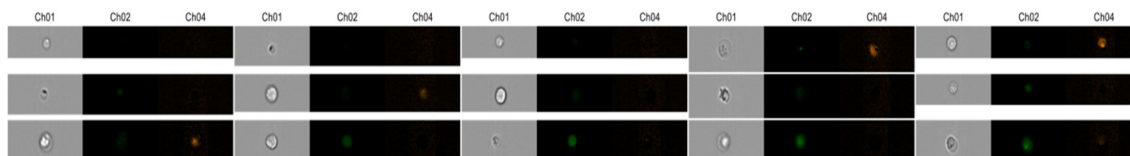
Slika 7-29: Območje različnih signalov PBMC v vzorcu CON2.



Slika 7-30: Slika 7 24: Visok signal CALC in nizek signal 7-AAD v vzorcu CON2.



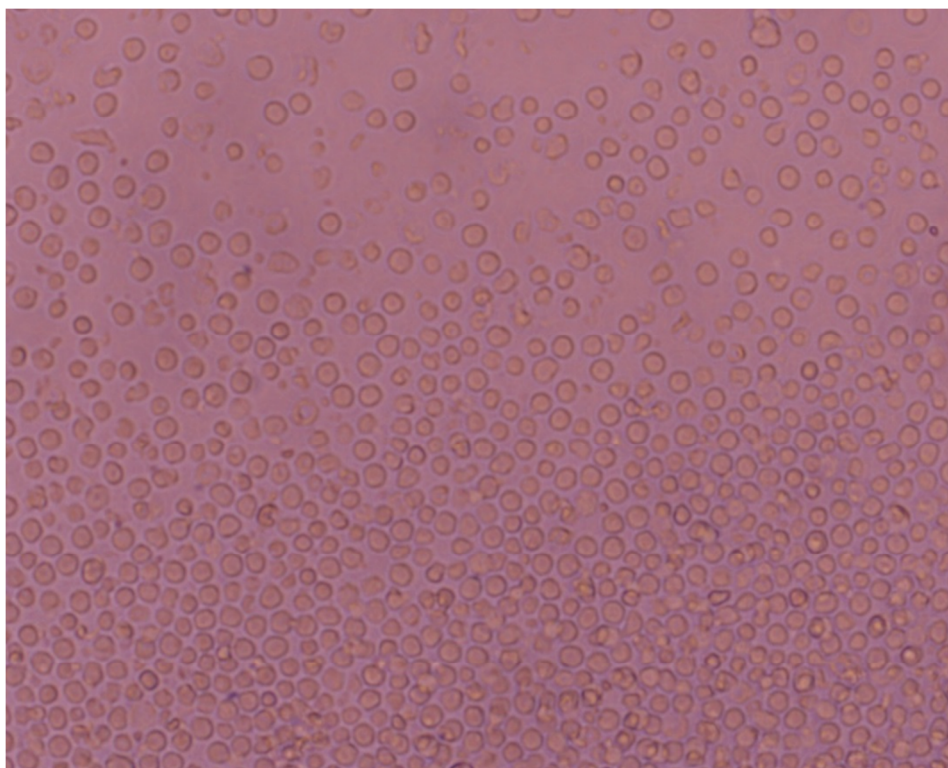
Slika 7-31: Nizek signal CALC in visok signal 7-AAD v vzorcu CON2.



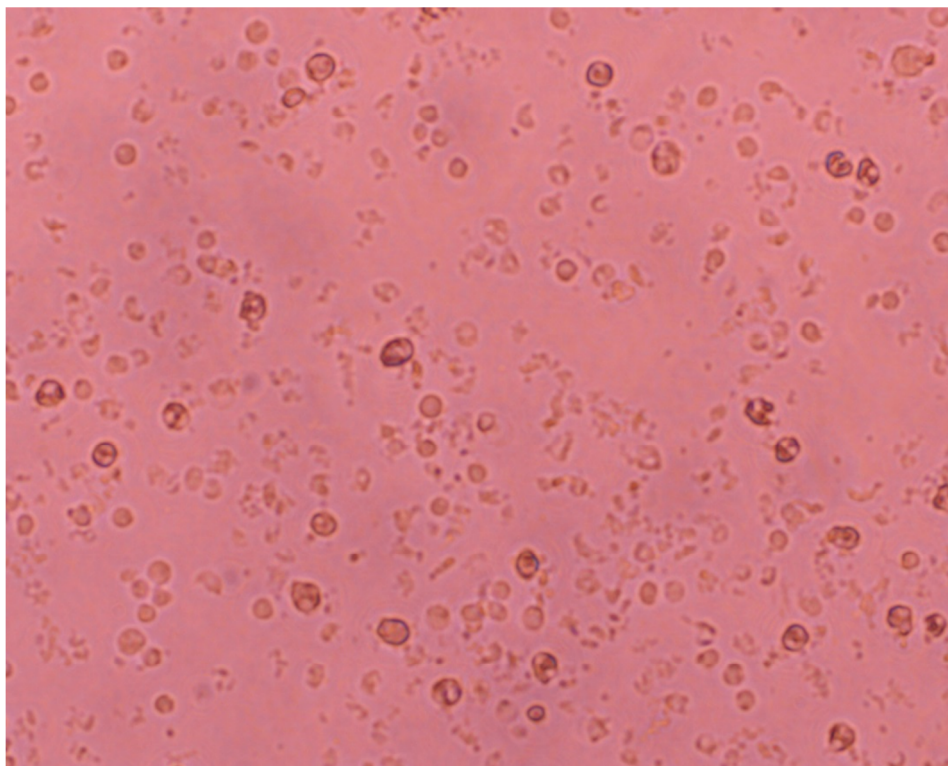
Slika 7-32: Srednji signal CALC in 7-AAD v vzorcu CON2.

7.3 Priloga 3

Fotografije celic pod mikroskopom pred gojenjem.

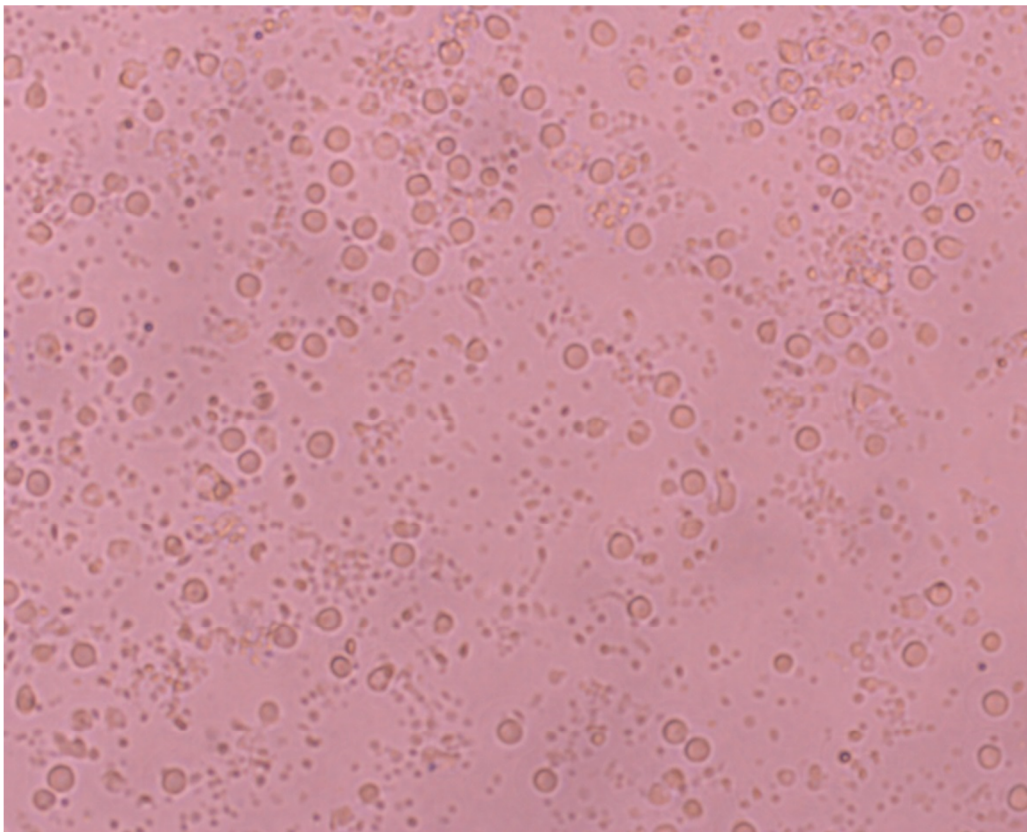


Slika 7-33: Mikroskopska fotografija vzorca AST1 pred gojenjem celic.

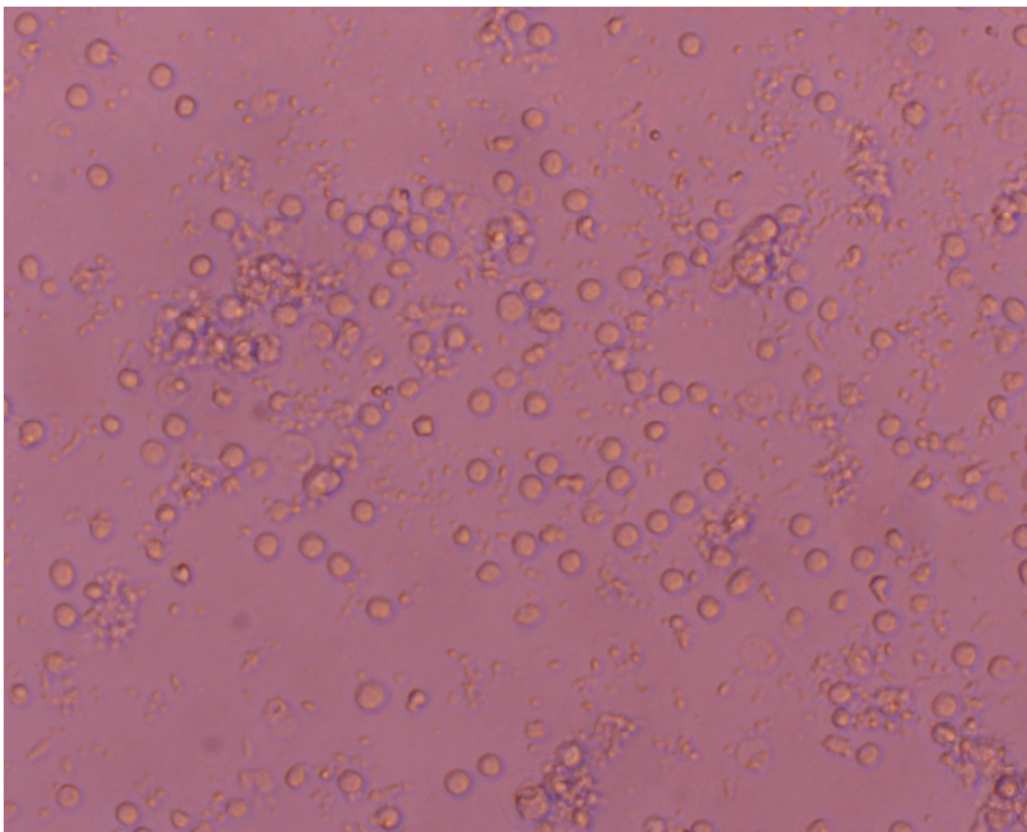


Slika 7-34: Mikroskopska fotografija vzorca AST2 pred gojenjem celic.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

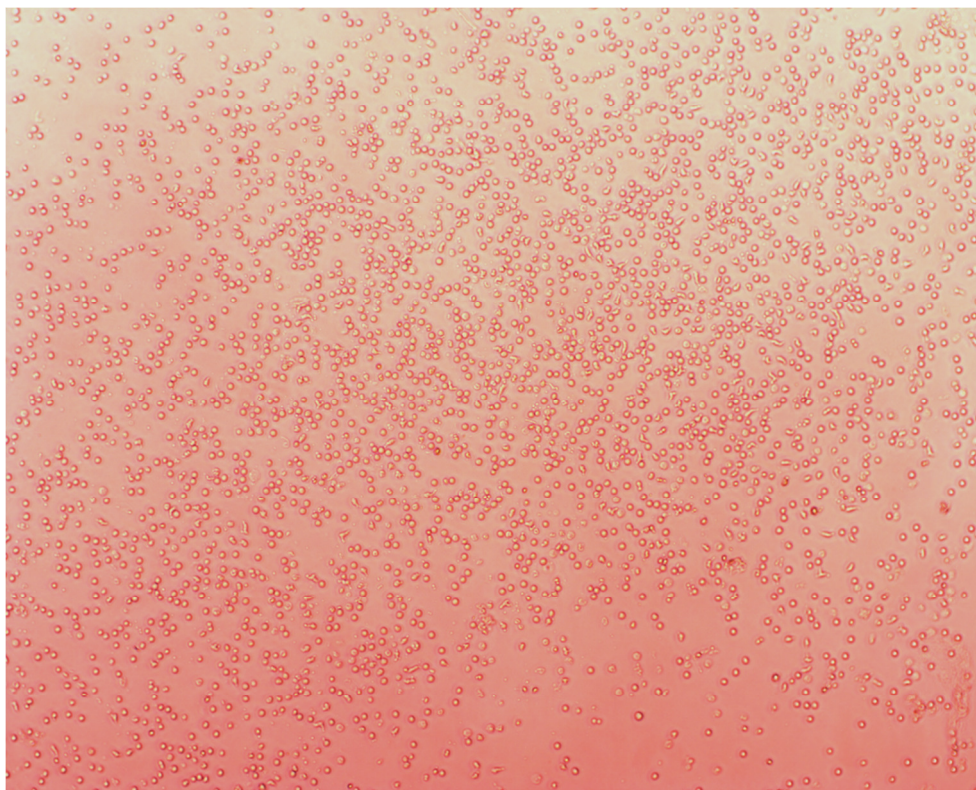


Slika 7-35: Mikroskopska fotografija vzorca KON1 pred gojenjem celic.



Slika 7-36: Mikroskopska fotografija vzorca KON2 pred gojenjem celic.

Fotografije celic pod mikroskopom med gojenjem celic.

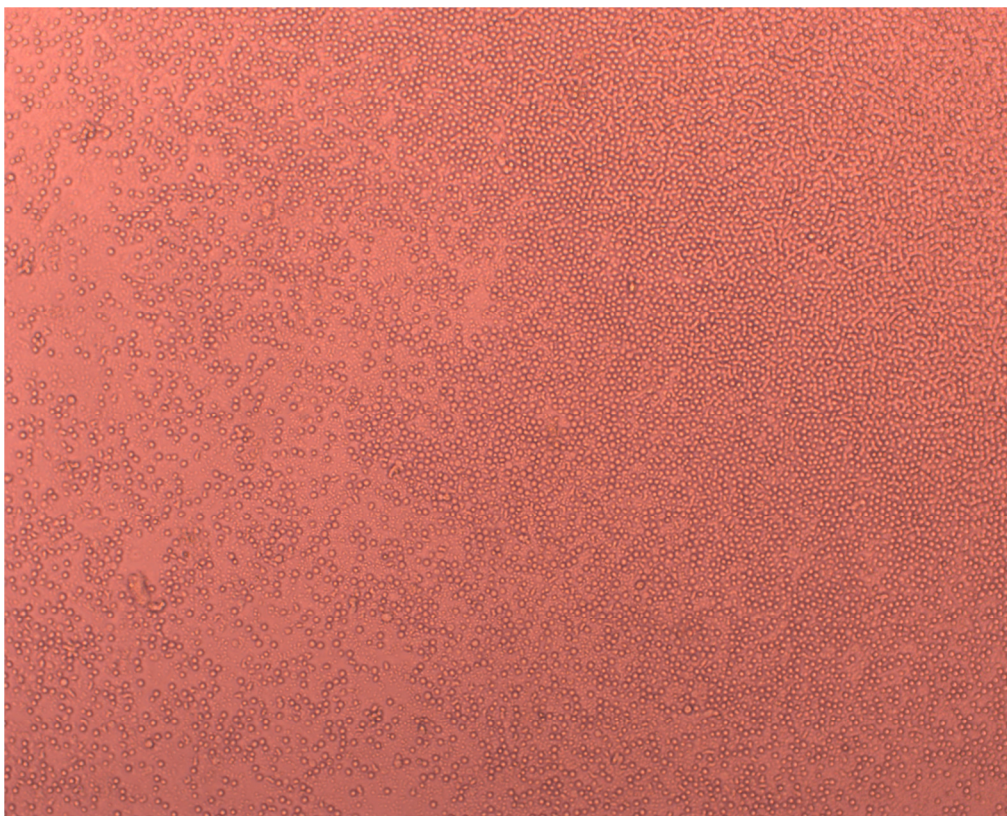


Slika 7-37: Mikroskopska fotografija vzorca AST1 med gojenjem celic.

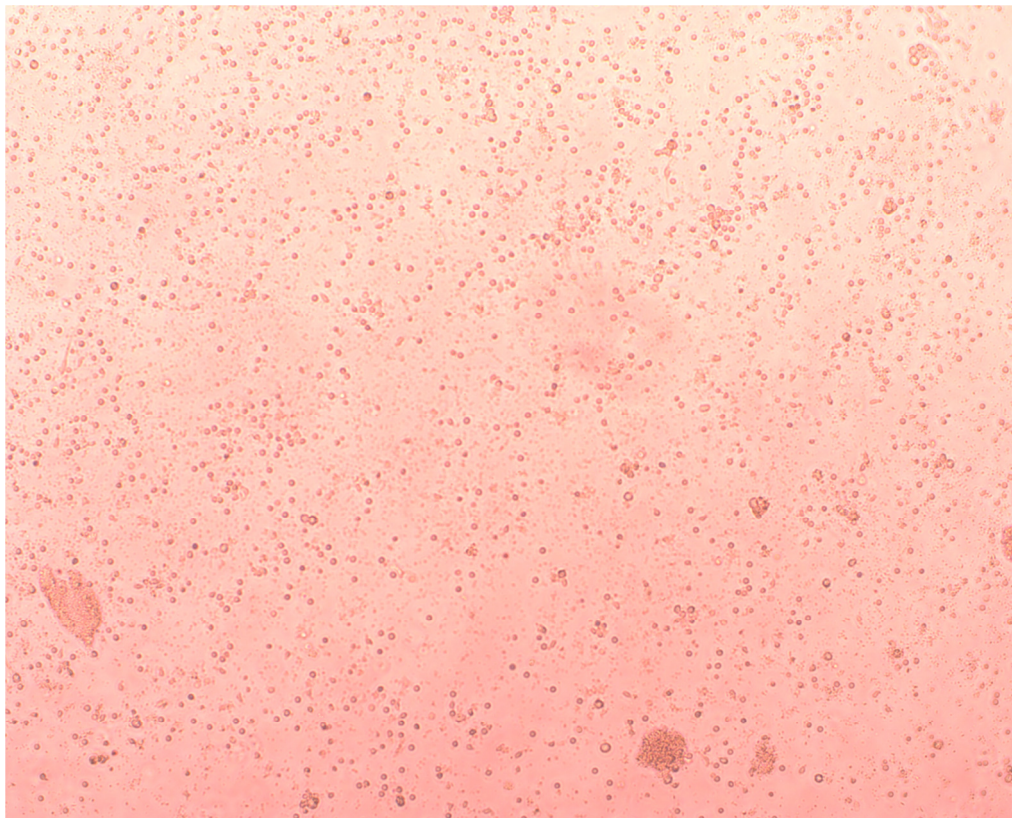


Slika 7-38: Mikroskopska fotografija vzorca AST2 med gojenjem celic

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 7-39: Mikroskopska fotografija vzorca KON1 med gojenjem celic



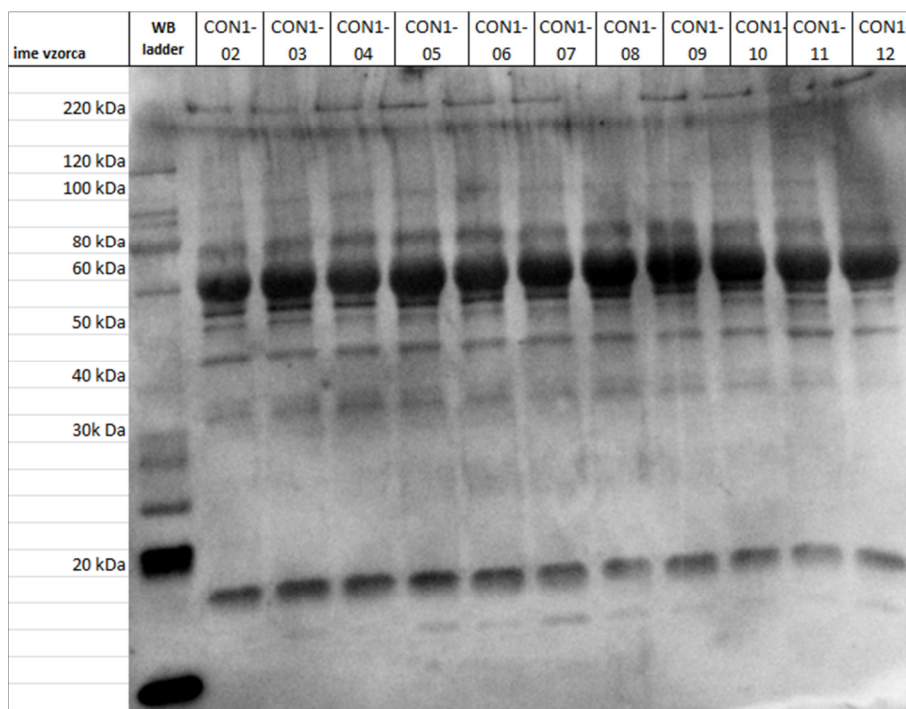
Slika 7-40: Mikroskopska fotografija vzorca KON2 med gojenjem celic

7.4 Priloga 4

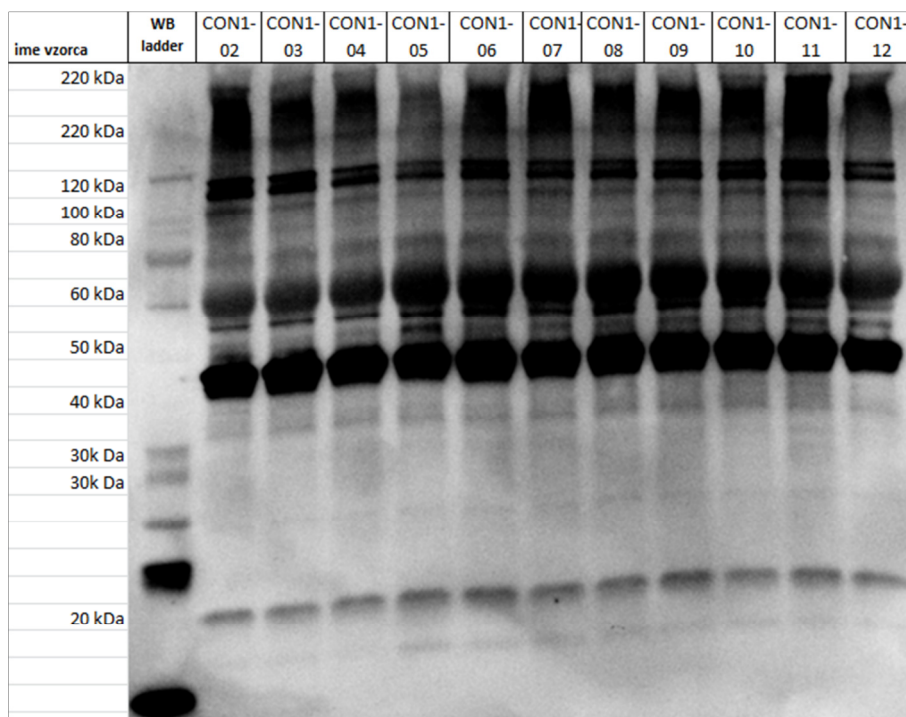
Tabela 7-2: Seznam informacij o vzorcih proteinov prenosa western pri inkubaciji PBMC astmatičnih in zdravih posameznikov s sintetičnimi kanabinoidi.

Vzorec	koncentracija	Čas	koncentracija	Čas inkubacije	koncentracija	Čas inkubacije
PBMC-CON1-02	/	/	/	/	/	/
PBMC-CON1-03	/	/	/	/	/	/
PBMC-CON1-04	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-CON1-05	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-CON1-06	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-CON1-07	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-CON1-08	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-CON1-09	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-CON1-10	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-CON1-11	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-CON1-12	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-CON1-13	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-CON1-14	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-CON1-15	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-CON2-01	/	/	/	/	/	/
PBMC-CON2-02	/	/	/	/	/	/
PBMC-CON2-03	/	/	/	/	/	/
PBMC-CON2-04	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-CON2-05	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-CON2-06	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-CON2-07	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-CON2-08	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-CON2-09	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-CON2-10	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-CON2-11	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-CON2-12	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-CON2-13	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-CON2-14	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-CON2-15	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-AST1-01	/	/	/	/	/	/
PBMC-AST1-02	/	/	/	/	/	/
PBMC-AST1-03	/	/	/	/	/	/
PBMC-AST1-04	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-AST1-07	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-AST1-08	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-AST1-09	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-AST1-10	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-AST1-11	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-AST1-14	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-AST1-15	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-AST2-01	/	/	/	/	/	/
PBMC-AST2-02	/	/	/	/	/	/
PBMC-AST2-03	/	/	/	/	/	/
PBMC-AST2-04	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-AST2-05	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-AST2-06	100 ng/mL	12	/	/	/	/
PBMC-AST2-07	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-AST2-08	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-AST2-09	100 ng/mL	12	3 μM	1	30 μM	4
PBMC-AST2-10	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-AST2-11	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-AST2-12	100 ng/mL	12	/	/	30 μM	4
PBMC-AST2-13	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-AST2-14	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/
PBMC-AST2-15	100 ng/mL	12	3 μM	1	/	/

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

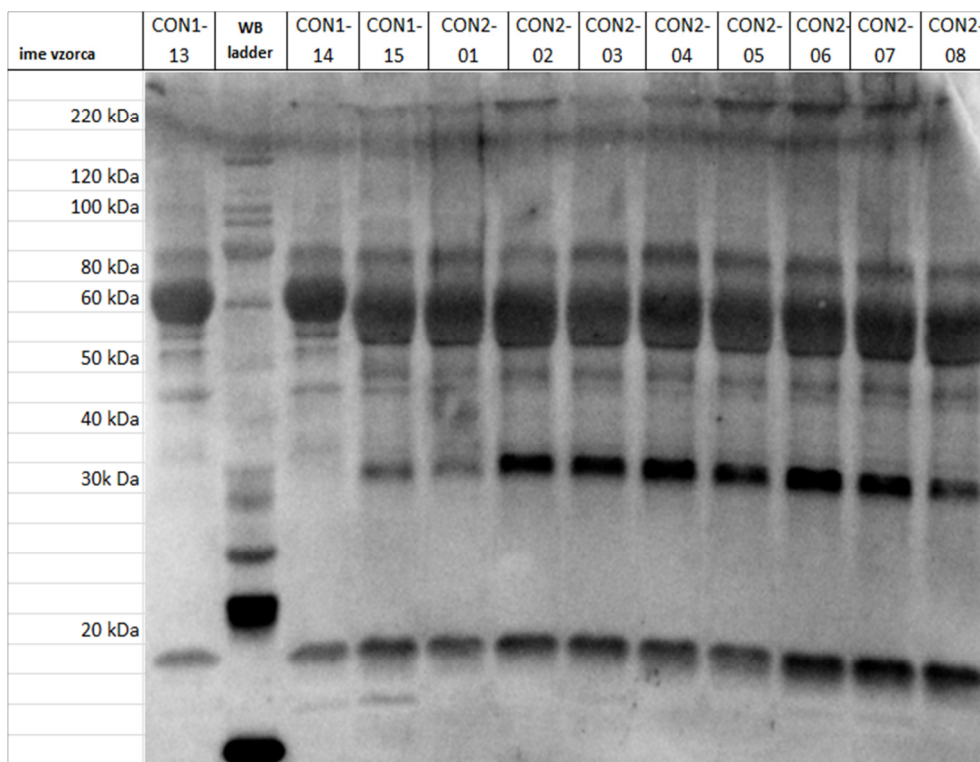


Slika 7-41: Fotografija 5. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.

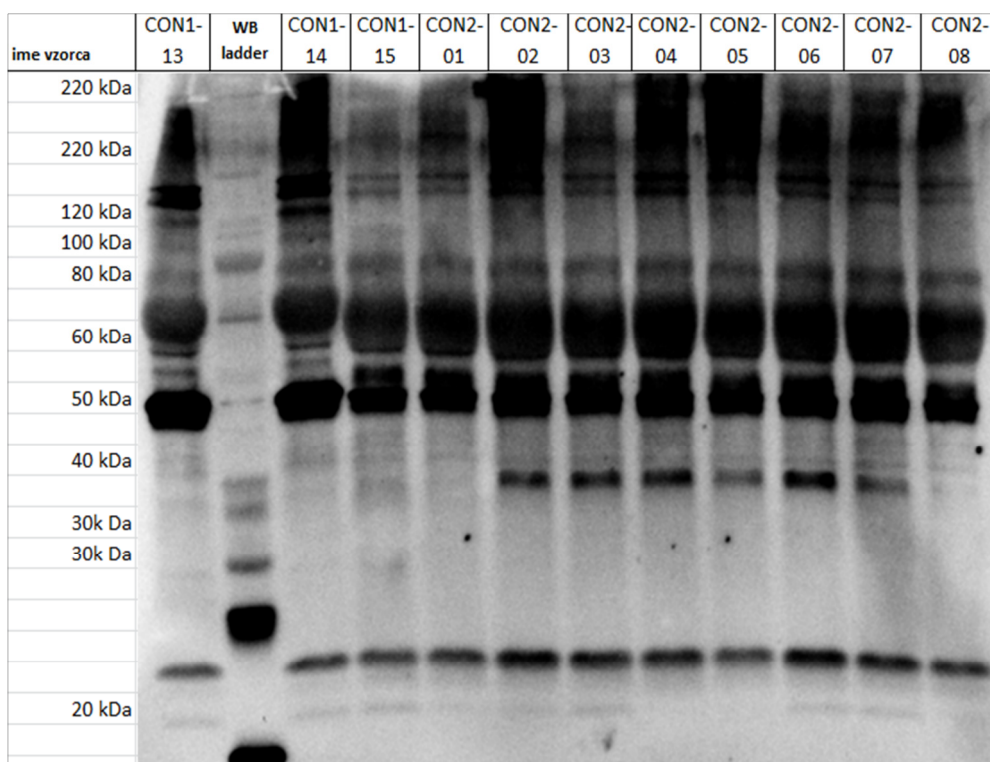


Slika 7-42: Fotografija 5. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

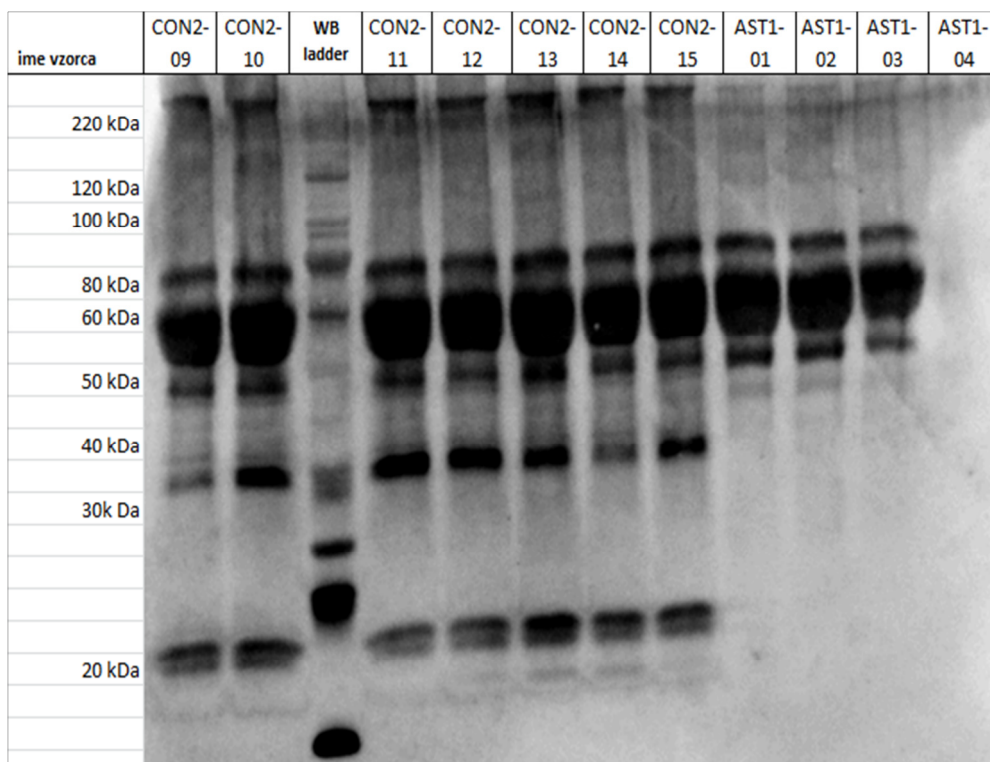


Slika 7-43: Fotografija 6. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.

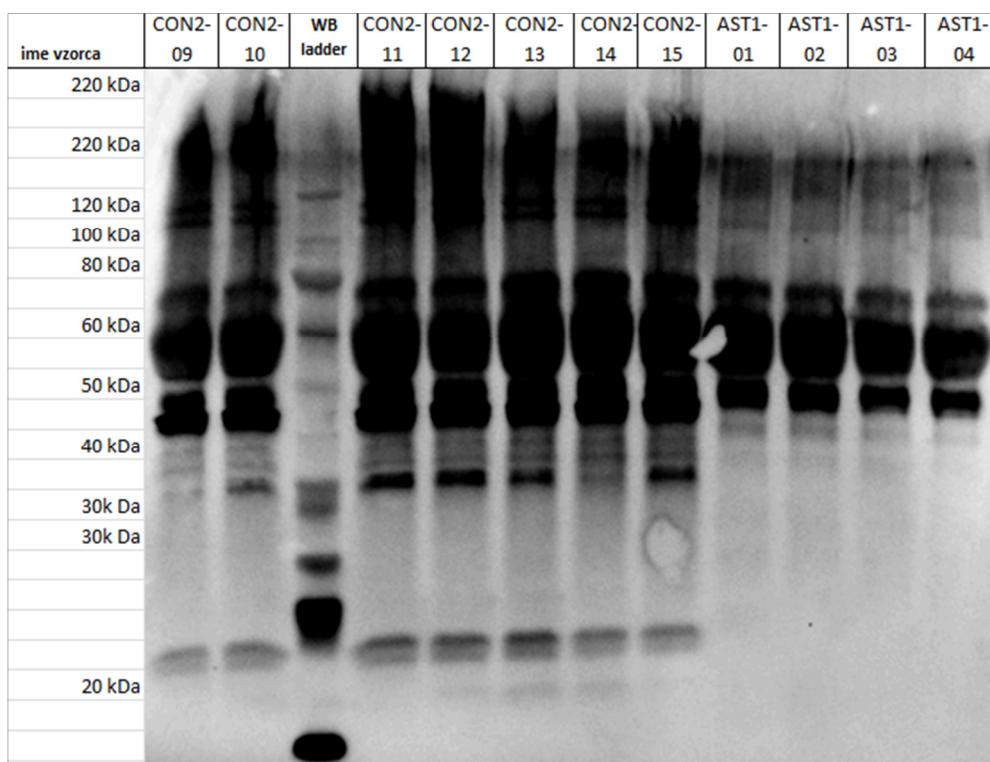


Slika 7-44: Fotografija 6. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

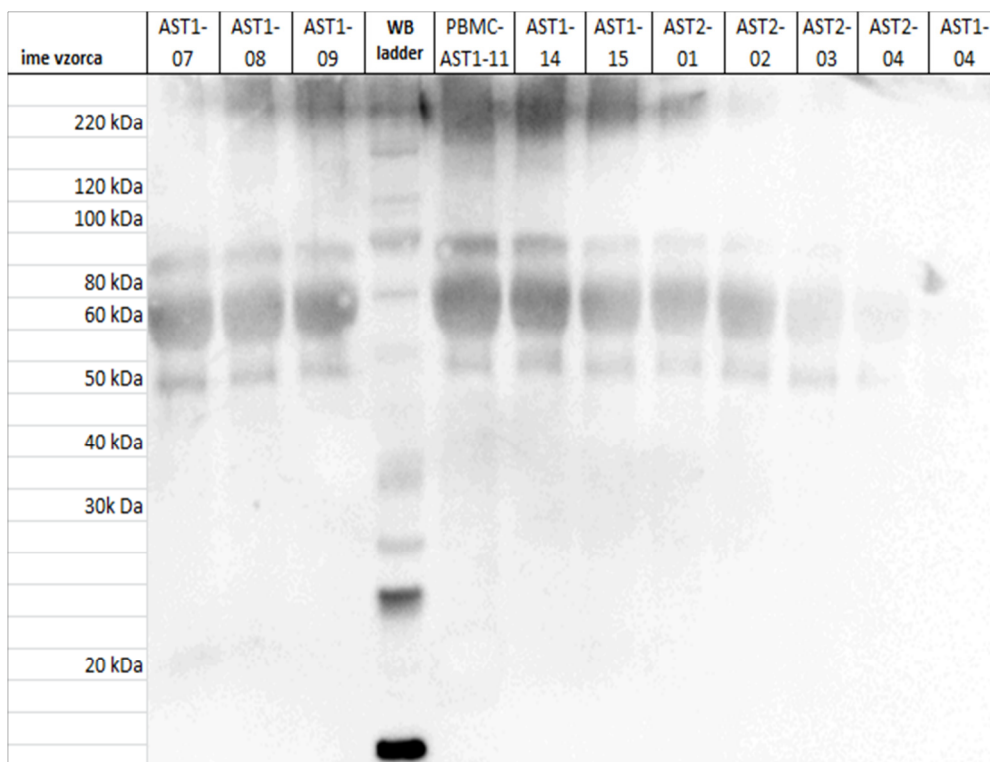


Slika 7-45: Fotografija 7. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.

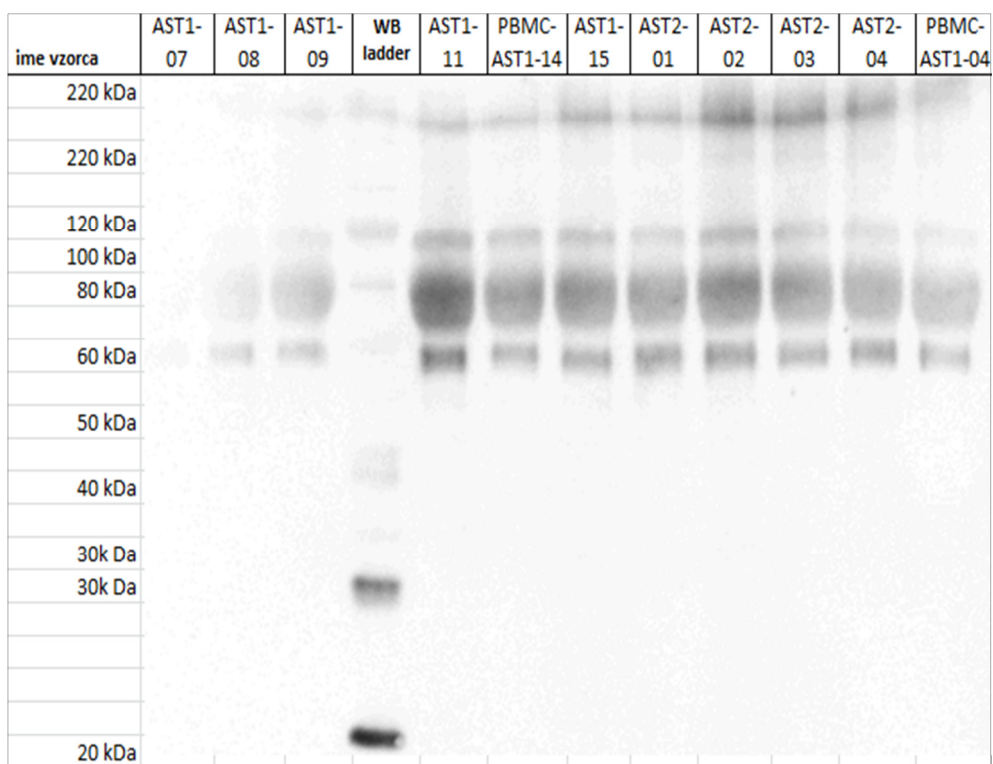


Slika 7-46: Fotografija 7. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo

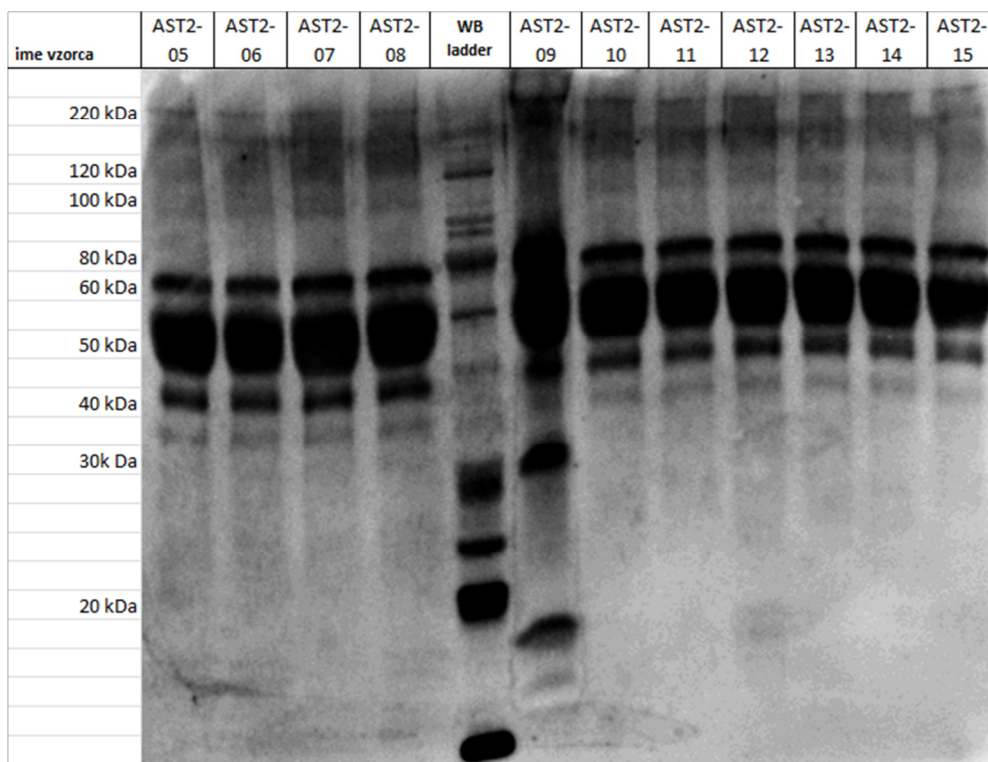


Slika 7-47: Fotografija 8. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.

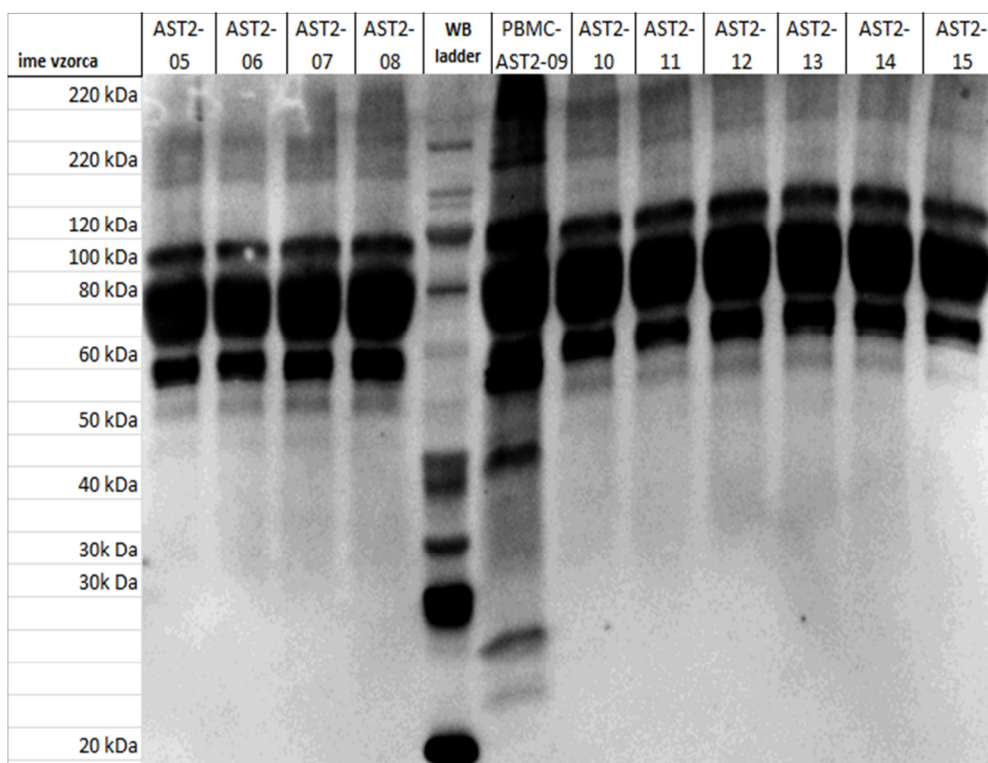


Slika 7-48: Fotografija 8. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.

Učinek agonistov in antagonistov endokannabinoidnih receptorjev CB1 in CB2 na izražanje nekaterih citokinov v celičnih kulturah gojenih limfoidnih celic bolnikov z astmo



Slika 7-49: Fotografija 9. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti CB1.



Slika 7-50: Fotografija 9. membrane prenosa western, inkubirane s protitelesi proti β -aktinu.