

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARSTITEADUSKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Astrid Oras

**Inimese perifeerse vere immuunrakkude iseloomustamine polükromaatse läbivoolu
tsütofluorimeetria abil, kasutades HIP-C 3.3 tööprotokolli**

Magistritöö

Juhendajad: Professor Raivo Uibo
Sulev Ingerpuu, PhD

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Immuunrakkude fenotüpiseerimine	6
1.2. T-lümfotsüüdid.....	8
1.3. T-regulatoorsed rakud.....	11
1.4. B-lümfotsüüdid.....	12
1.5. NK-rakud.....	14
1.6. Dendriitrakud	14
1.7. Monotsüüdid.....	16
1.8. Autoimmuunhaigused.....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1. Valim ja uuringumaterjal.....	18
2.2.2. Immuunofenotüpiseerimine	19
2.2.3. Rakkude märgistamine fluorokroomidega seotud monoklonaalsete antikehadega	20
2.2.4. Läbivoolu tsütofluorimeetria.....	21
2.2.5. Rakupopulatsioonide eristamine paneelide kaupa.....	21
2.2.6. Rakupopulatsioonide absoluutväärtuste määramine.....	26
2.2.7. Statistiline analüüs	27
2.3. Tulemused ja arutelu.....	28
KOKKUVÕTE	47
SUMMARY.....	48
TÄNUAVALDUSED.....	49
KASUTATUD KIRJANDUS.....	50
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	59
LISA 1: Ankeet kontrollgrupile ja patsientidele.....	60
LISA 2: T1D patsientide ja tervete laste võrdlus.....	64
LISA 3. Lihtlitsents	67

KASUTATUD LÜHENDID

CD	diferentseerumise klaster (ingl <i>cluster of differentiation</i>)
DC	dendriitrakk (ingl <i>dendritic cell</i>)
mDC	müeloidne dendriitrakk (ingl <i>myeloid dendritic cell</i>)
pDC	plasmatsütoidne dendriitrakk (ingl <i>plasmacytoid dendritic cell</i>)
FACS	läbivoolu tsütofluorimeetria (ingl <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
Fc	antikeha fragment (ingl <i>fragment crystallizable</i>)
FOXP3	(ingl <i>forkhead box P3</i>)
HLA	inimese koosobivusantigeen (ingl <i>human leukocyte antigen</i>)
IL	interleukiin (ingl <i>interleukin</i>)
INF	interferoon (ingl <i>interferon</i>)
KIR	tapja Ig-sarnane retseptor (ingl <i>killer Ig-like receptors</i>)
MHC	peamine koosobivuskompleks (ingl <i>major histocompatibility complex</i>)
NK	loomulik tapjarakk (ingl <i>natural killer cell</i>)
PBMC	perifeerse vere mononukleaarsed rakud (ingl <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PFC	polükromaatne läbivoolutsütomeetria (ingl <i>polychromatic flow cytometry</i>)
SLAN	(ingl 6-sulfoLacNAc)
T1D	1. tüüpi diabeet e insuliinsõltuv suhkrutõbi (ingl <i>type 1 diabetes</i>)
TCM	tsentraalne mälu T-rakk (ingl <i>central memory T cell</i>)
TEM	efektor mälu T-rakk (ingl <i>effector memory T cell</i>)
TEMRA	lõplikult diferentseerunud efektor mälu T-rakk (ingl <i>terminally differentiated effector memory T cell</i>)
Th	efektor- ehk abistaja rakk (ingl <i>T helper cells</i>)
TNF	tuumori nekroosi faktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
Treg	regulatoorne T-rakk (ingl <i>regulatory T cell</i>)

SISSEJUHATUS

Immuunsüsteemil on oluline roll organismi kaitsmisel patogeenide vastu ning normaalse tervises seisundi säilitamisel. Tuleb märkida, et siiani on terve inimese immuunsüsteemi ja selle varieeruvust indiviiditi vähe uuritud, kusjuures põhifookus on suunatud pigem kõrvalekallete tuvastamisele. Seega on oluline leida parameetrid, mis peegeldaksid immuunsüsteemi olukorda tervetel inimestel. Siinkohal osutuvad oluliseks meetodid, mis võimaldavad immuunsüsteemi seisundi põhjalikku jälgimist. Kogutud informatsioon on aga väga oluline erinevate haiguste diagnostikaks, haiguskulu jälgimiseks ning prognoosi kujundamiseks.

Üheks peamiseks meetodiks immuunrakkude fenotüübi kirjeldamisel on läbivoolu tsütofluorimeetria, mida kasutatakse ka antud töös. Polükromaatne läbivoolu tsütofluorimeetria võimaldab samaaegselt iseloomustada väga paljusid rakupopulatsioone.

Immuunsüsteemis võivad tekkida muutused nii füsioloogiliste protsesside tulemusena (nt vananemine) kui ka mitmesuguste haiguslike seisundite puhul. Viimasel juhul on erilise tähtsusega just autoimmuunhaigused ning immuunpuudulikkus, mis on heterogeenne grupp haigusi, seda nii avaldumise kui ka põhjuste seisukohast. Mitmeid neist haigustest on seostatud muutustega kindlates rakupopulatsioonides. Seega on oluline, et erinevate immuunrakkude alampopulatsioonide suhtes on tervete isikute näitude põhjal kindlaks määratud usaldusväärsed referentsvahemikud, mille suhtes on võimalik võrrelda patsientide analüüsile tulemusi.

Käesolev töö on osa COST ENTIRE (*European Network for Translational Immunology Research and Education*) projektist. Töö eksperimentaalse osa eesmärk oli analüüsida erinevate immuunrakkude, täpsemalt T-lümfotsüütide, T-regulatoorsete rakkude, B-lümfotsüütide, dendriitrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide absoluutarvude varieeruvust tervete inimeste ning esimest tüüpi diabeeti põdevate laste perifeerses veres. Eesmärgist lähtuvalt püstitati järgnevad tööülesanded:

- Hinnata HIP-C tööprotokolli versiooni 3.3 sobivust immuunrakkude, täpsemalt T-, B-, NK-rakkude, dendriitrakkude ja monotsüütide ning nende alampopulatsioonide määramiseks
- Leida nimetatud rakupopulatsioonidele ning nende alampopulatsioonidele referentsväärtused

- Hinnata erinevate rakupopulatsioonide absoluutväärtuste erinevusi meeste ja naiste osas ning nende seost uuritavate vanusega;
- Võrrelda tervete laste immuunrakkude absoluutväärtusi 1. tüüpi diabeeti (T1D) põdevate patsientide tulemustega

Käesolev uuring viidi läbi Tartu Ülikooli arstiteaduskonna bio- ja siirdemediitsiini instituudi immunoloogia osakonnas.

Märksõnad: polükromaatne läbivoolu tsütofluorimeetria, immunofenotüpiseerimine, referentsvahemikud

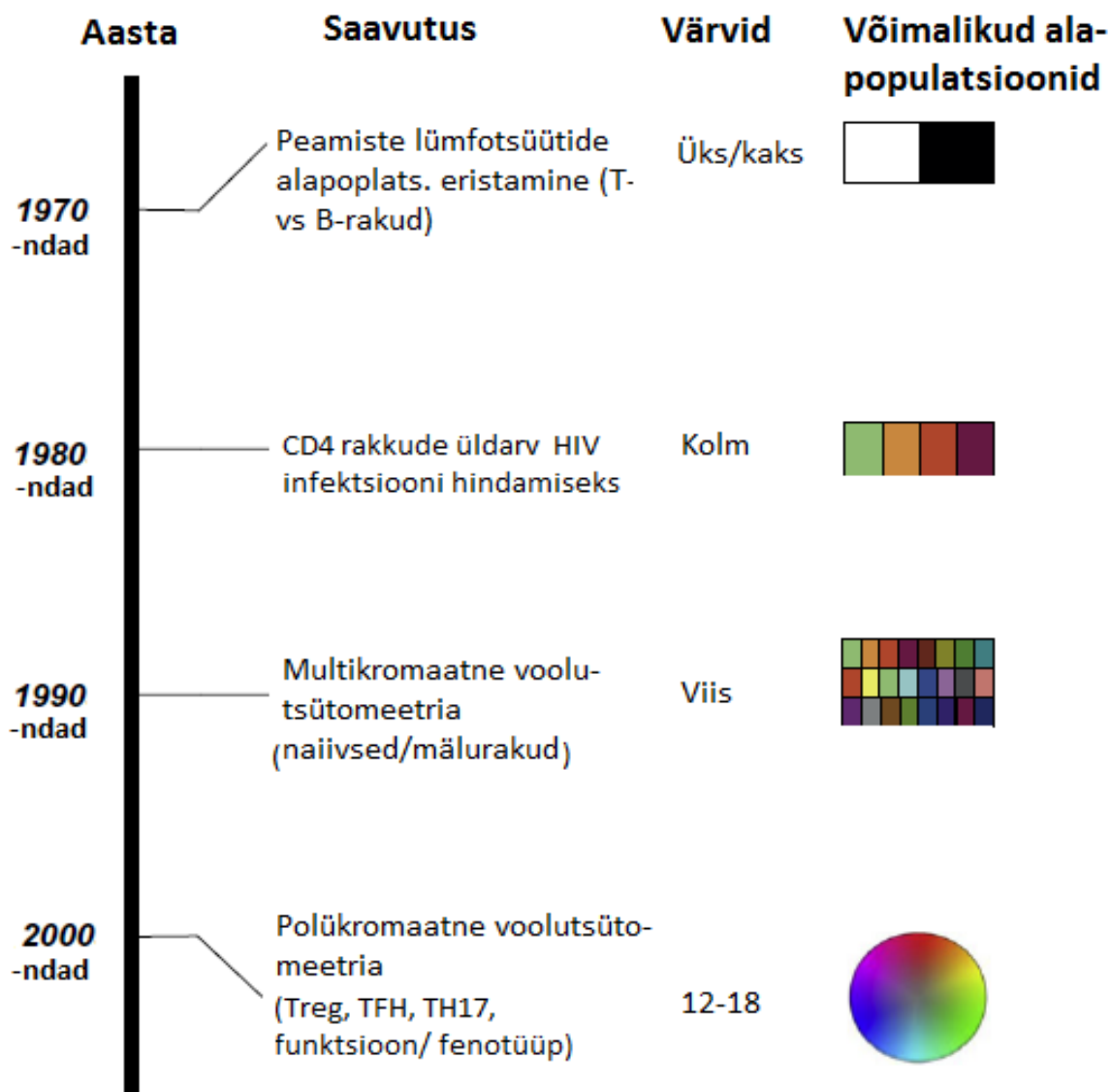
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Immuunrakkude fenotüpiseerimine

Läbivoolu tsütofluorimeetria on üks peamisi meetodeid immuunrakkude fenotüpiseerimiseks ja nende funktsioonide uurimiseks. Selle meetodi eeliseks on võimalus analüüsida mitmeid erinevate rakkude parameetreid ning iseloomustada paljusid rakkude alampopulatsioone samaaegselt (Maecker *et al.*, 2012). Läbivoolu tsütofluorimeetria põhineb rakule seondunud fluorokroomi ergastamisel laserikiirgusega ning sellelt tagasikiirguva valguse lainepikkuse mõõtmisel. Emiteruvad lainepikkust mõõdavad detektorid, mille ees olevad filtrid tagavad, et detektorini jõuab vaid teatud lainepikkusel valgus (Tung *et al.*, 2007).

Alates 1960-ndatest, mil läbivoolu tsütofluorimeetria välja töötati, on selle tehnoloogiline areng ning uuritavate rakupopulatsioonide üha täpsem kindlakstegemine ning iseloomustamine kulgenud paralleelselt (joonis 1) (Chattopadhyay ja Roederer, 2012). Viimase kümnendi jooksul on meetod märkimisväärselt edasi arenenud seoses uute fluorokroomide ja tandem-värvide (uue fluorokroomi sidumine olemasolevale) väljatöötamisega, tänu millele on mõõdetavate parameetrite arv oluliselt kasvanud (Chattopadhyay *et al.*, 2014).

Tänu uutele tehnilistele täiustustele on kasutusele võetud ka mõiste polükromaatne läbivoolu tsütofluorimeetria (ingl *polychromatic flow cytometry*, PFC), mis tähendab, et korraga on võimalik tuvastada viit või enamat märgist (Bendall *et al.*, 2012, Chattopadhyay ja Roederer, 2012). Meetodi kiire edenemine on aga toonud lisaks uutele võimalustele kaasa ka uued kitsaskohad ning seda just rakkude värvimismeetodite (ingl *staining panels*) väljatöötamise ja andmeanalüüsi osas (Bendall *et al.*, 2012).



Joonis 1. Ajajoon illustreerimaks läbivoolu tsütofluorimeetria kui meetodi arengut. Meetodi arengust tulenenud võimalused uute rakupopulatsioonide identifitseerimisel T-rakkude näitel (Chattopadhyay ja Roederer, 2012, autori kohandused).

Omaette arengusuund rakkude fenotüpiseerimisel on masstsütomeetria, milles on ühendatud läbivoolu tsütofluorimeetria võimalused mass-spektromeetriaga. See meetod võimaldab samaaegselt ühe raku tasandil uurida vähemalt 45 erinevat parameetrit ilma fluorestsentsi ja spektraalse ülekattuvuseta. Rakkudes olevate molekulide tuvastamiseks kasutatakse haruldaste leelismuldmetallide isotoope, millega on antikehad märgistatud (Bendall *et al.*, 2012).

Võttes arvesse praegust meetodi kiiret arengut, jätkub tõenäoliselt ka tulevikus uute markerite väljatöötamine ning osutub võimalikuks tuvastada rakkude alampopulatsioone üha täpsemalt. Sealjuures on aga oluline, et informatsioon, mis on praegu peamiste rakupopulatsioonide kohta olemas, oleks üheselt defineeritud. See tähendab, et peamiste immuunrakkude populatsioonide, nagu T-, B-, NK-, dendriitrakkude ning monotsüütide, jaoks peaks olema paika pandud teatud hulk markereid, mille alusel neid kindlaks teha (Maecker *et al.*, 2012).

Tingituna vajadusest töötada välja immunofenotüpeerimine standardid, loodi 2009. aastal NIH (*National Institutes of Health*) ja FOCIS (*United States and the Federation of Clinical Immunology Societies*) algatusel konsortsium. 2011. aastal toimus konsortsiumi nõupidamine inglisekeelse nimetusega *Flow Immunophenotyping Technical Meeting at NIH (FITMaN)*, mille tulemusena pakuti välja võimalikud markerid peamiste immuunrakkude populatsioonide fenotüpeerimiseks (Maecker *et al.*, 2012). Juba 2006. aastal algatati EuroFlow konsortsiumi (EU-FP6, LSHBCT-2006-018708) poolt projekt eesmärgiga töötada välja sobiv antikehade paneel diagnoosimaks ning klassifitseerimaks peamisi leukeemia ja lümfoomi alatüüpe (Kalina *et al.*, 2012). ENTIRE on samalaadne projekt, kuid keskendub ka tervete isikute immunotüüpide kindlaks tegemisele (Popadic *et al.*, 2013).

1.2. T-lümfotsüüdid

T-lümfotsüüdid on osa rakulist immuunsust reguleerivatest immuunrakkudest ning nende esmane jaotamine alatüüpideks põhineb CD8 ja CD4 ekspressioonil ning nende alusel klassifitseeritakse T-lümfotsüüdid vastavalt tsütotoksilisteks (CD8+) ja abistaja-rakkudeks (CD4+) (ingl *T-helper cell*, Th) (joonis 2) (LaRosa ja Orange, 2008, Larbi ja Fulop, 2014). Antigeeniga kokkupuute korral toodavad ja sekreteerivad CD8+ rakud tsütotoksilisi valke, sh perforiini ja gransüüme, mille toimele leiab aset sihtmärkraku membraani kahjustumine ning apoptoos (LaRosa ja Orange, 2008). Vastusena antigeeni toimele produtseerivad CD4+ rakud tsütokiine, mis stimuleerivad nii T-rakkude endi jagunemist ning diferentseerumist, kui ka aktiveerivad teisi rakke, sealhulgas näiteks B-rakke ja makrofaage (Abbas *et al.*, 2014).

1980ndatel olid naiivsete ja mälu T-rakkude eristamisel peamisteks markeriteks CD45R (nüüd tuntud kui CD45RA), LFA-3 (CD58) ja LFA-1 (nüüd CD11a) või UCHL-1 (CD45RO) vastne antikeha (Mahnke *et al.*, 2013). CD45 on proteiin türosiin fosfataas, millel on oluline roll nii lümfotsüütide aktiveerumises kui ka arengus (Bisset *et al.*, 2004). CD45RA ja CD45RO on CD45 geeni splaissvariandid, mille ekspressioon on valdav vastavalt kas naiivsetel või mälu rakkudel. Naiivseid ja mälu rakkude saab eristada ka nende paiknemise alusel.

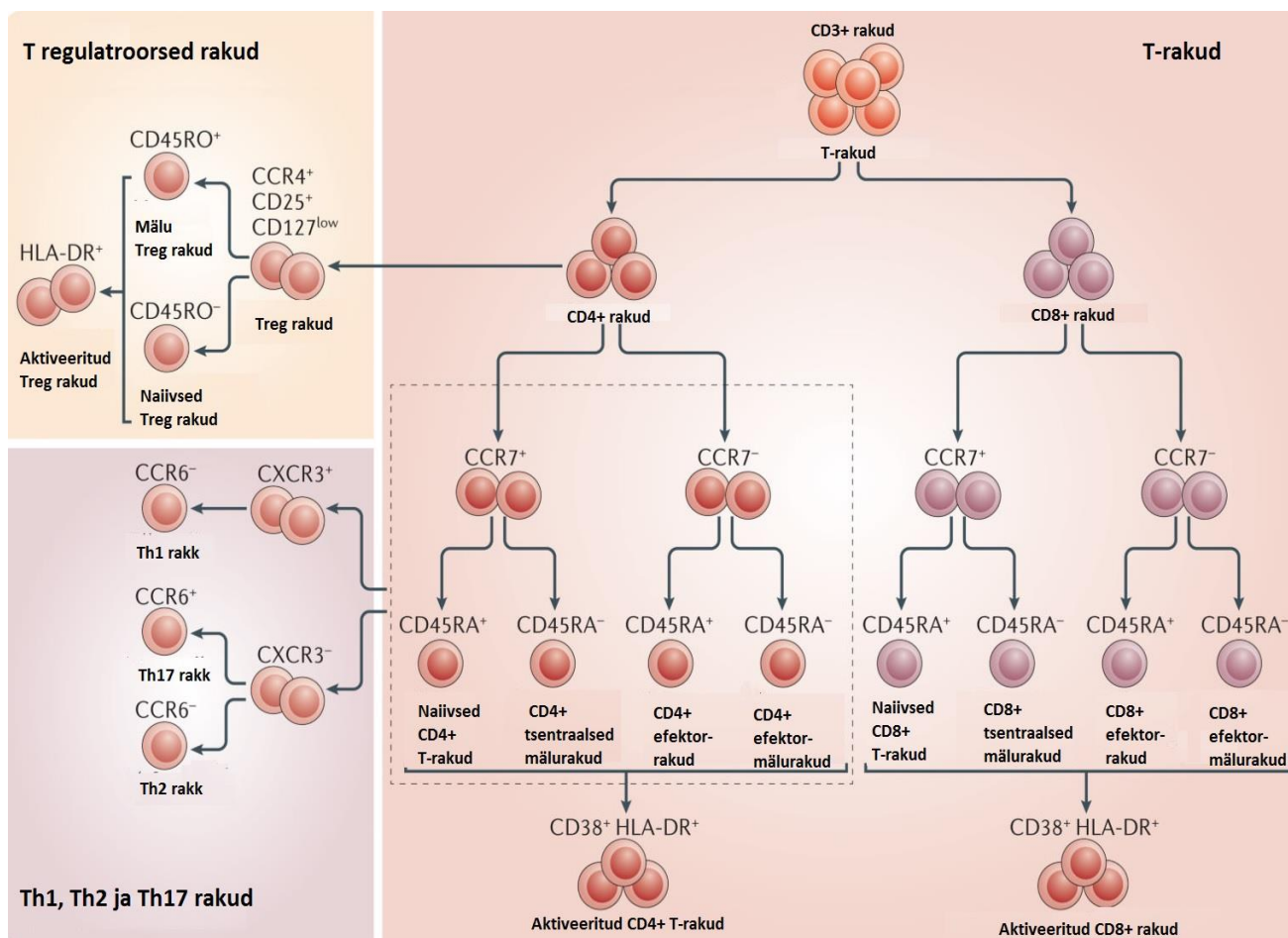
Naiivsed T-rakud ekspresseerivad L-selektiini (CD62L), mis on seotud nende rakkude paiknemisega lümfisõlmedes, samas mälorakud jaotuvad CD62L ekspressiooni alusel kaheks: CD62+ ja CD62- (Mahnke *et al.*, 2013).

Meetodite areng, mille abil saab hinnata tsütokiinide tootmist ühe raku tasandil, on võimaldanud detailselt uurida rakkude fenotüübi ja funktsioonide seost. Tuumori nekroosi faktori (*tumor necrosis factor* – TNF) retseptorite perekonna liige CD27 ja C-C kemokiini retseptor CCR7 on mõlemad seotud T-rakkude ümberpaiknemisega (ingl *homing*) lümfisõlmedesse ning neid kasutatakse koos CD45RA-ga, iseloomustamaks CD8+ mälorakkude alampopulatsioone. CD45RA– CD8+ CD27+ T-rakke, mis ekspresseerivad IL-2 ja IFN- γ , kuid millel puudub kohene tsütotoksiline võimekus, klassifitseeritakse mälorakkudeks. Samas kui CD45RA– CD8+ T CD27– T-rakud toodavad IFN- γ ja TNF, kuid mitte IL-2, on nad võimelised koheselt sihtmärk-rakke hävitama ning on seega klassifitseeritavad kui efektorrakud (Mahnke *et al.*, 2013).

CD4+ ja CD8+ mälu T-rakud, mis ekspresseerivad CCR7, on võimelised tootma suures koguses IL-2, kuid oluliselt madalamal tasemel teisi efektor-tsütokiine (nt IL-4, IL-5 ja IFN- γ) (Mahnke *et al.*, 2012). Samas kui CCR7 suhtes negatiivsed mälorakud produtseerivad IL-4 ja IL-5 (ainult CD4+ T-rakud) ja/või IFN- γ (nii CD4+ kui ka CD8+ T-rakud) ning sisaldavad perforiini graanuleid. Viimased tagavad reinfektsiooni korral kohese tsütotoksilise võimekuse (Tussey *et al.*, 2000, Mahnke *et al.*, 2013). CCR7+ rakke nimetatakse tsentraalseteks mälorakkudeks (ingl *central memory T cell*, TCM), kuna nad on võimelised ümberpaiknema tsentraalsetesse lümfoidorganitesse. CCR7- rakud aga paiknevad perifeersetes lümfoidorganites ja neid nimetatakse efektormälu rakkudeks (ingl *effector memory T cell*, TEM), kuna nad on võimelised kiiresti realiseerima oma efektorfunktsioone. TCM rakud võivad areneda TEM rakkudeks ning neil on viimastega võrreldes pikemad telomeerid, mistõttu peetakse TCM rakke TEM eellasteks (Mahnke *et al.*, 2013).

Nii CD4+ kui ka CD8+ rakud jagatakse omakorda neljaks alampopulatsiooniks vastavalt kemokiini retseptori 7 (CCR7), CD27, CD28 ja CD45RA olemasolule – naiivsed rakud (CCR7+, CD27++, CD28++, CD45RA+), tsentraalsed mälorakud (CCR7+, CD27+++, CD28+++, CD45RA-), efektormälorakud (CCR7-, CD27+/-, CD28+/-, CD45RA-) ja lõpuni diferentseerunud efektormälorakud, mis reekspresseerivad CD45RA (ingl *terminally differentiated effector memory cells reexpressing CD45RA*, TEMRA) (CCR7-, CD27-, CD28-, CD45RA+)- (Larbi ja Fulop, 2014). T-raku aktivatsioonimarkeritena on nii CD4+ kui

ka CD8+ rakkudel kirjeldatud HLA-DR (*human leukocyte antigen*, HLA), CD38 ja CD25 molekule (Bisset *et al.*, 2004).



Joonis 2. T-rakkude jaotamine alampopulatsioonideks. Esmane T-rakkude jaotumine on CD4+ *helper*-rakkudeks (Th) ja CD8+ tsütotoksilisteks rakkudeks, mis mõlemad omakorda jagunevad naiivseteks ja mälorakkude alampopulatsioonideks. Samuti eristatakse aktiveerunud rakke. CD4+ populatsioon hõlmab erinevaid *helper*-rakkude alampopulatsioone: Th1, Th2, Th17. Eraldiseisva populatsiooni moodustavad regulatoorsed T-rakud, mis samuti hõlmavad naiivseid ja mälorakke ning aktiveerunud rakke. (Maecker *et al.* (2012) järgi , autori kohandused).

Funktsiooni alusel saab CD4+ rakud jagada regulatoorseteks ja efektor- ehk abistaja rakkudeks (ingl *T helper cells*, Th). Th rakud hõlmavad omakorda mitut erinevat rakupopulatsiooni: Th1, Th2, Th17, Th22, Th9 ning folliculaarsed Th (joonis 2; Cosmi *et al.*, 2013). Klassikalise definitsiooni alusel iseloomustab Th1 rakke IFN γ ning Th2 rakke IL-4, IL-5, IL-10 ja IL-13 tootmine (Zhu ja Paul, 2010). Samas on aga näidatud, et ka Th1 ja regulatoorsed T-rakud võivad toota IL-10 (Saraiva ja O'Garra, 2010). Lisaks on tõestatud, et Th rakud võivad muuta oma fenotüüpi. Näiteks Th2 rakud võivad ümberprogrammeeruda

ning ekspresseerida lisaks neile iseloomuliku transkriptsioonifaktori Gata3-le Th1 rakkudele omast T-bet-i ning toota IFN γ (Hegazy *et al.*, 2010).

Lisaks eelmainitule klassifitseeritakse abistajarakke ka kemokiiniretseptorite ekspressiooni alusel. CXCR3 (CD183) avaldub eeskätt Th1 rakkudel ning sõltub T-bet; CCR4 ekspressioon on aga valdav Th2 rakkudel ning sõltub GATA-3 (Singh *et al.*, 2008). Th17 rakke iseloomustab transkriptsioonifaktori ROR γ t ning kemokiiniretseptori CCR6 (CD196) ekspressioon (Sallusto *et al.*, 2012, Cosmi *et al.*, 2013) ning nad produtseerivad tsütokiine nagu näiteks IL-23, IL-17a, IL-17f, IL-22 and IL-21 (Zhu ja Paul, 2010). Nimetatud rakupopulatsioonil ning selle efektorsütokiinidel on oluline roll bakterite ning seente vastases immuunvastuses, ent samas on neid seostatud ka autoimmuunsete protsessidega (Ouyang *et al.*, 2008, Zhu ja Paul, 2010).

1.3. T-regulaatorsed rakud

T-rakud, mis paiknevad tüümuses, teevad läbi positiivse ja negatiivse selektsiooni protsessi, mis üldjoontes tähendab, et rakud, mis seostuvad peamise koesobivuskompleksi (ingl *major histocompatibility complex*, MHC) molekulidega kas liiga nõrgalt või liiga tugevalt, hävitatakse apoptoosi teel. Need kaks mehhanismi peaksid kindlustama, et elimineeritakse ebaefektiivsed rakud ning tagatakse immunoloogiline tolerantsus. Samas on aga näidatud autoreaktiivsete T-rakkude esinemist nii tervetel inimestel kui ka autoimmuunhaigusega patsientidel, mis viitab sellele, et kõiki autoantigeenidele reageerivaid T-rakke siiski ei elimineerita kлонаalse selektsiooni käigus (Salaun *et al.*, 2005).

T regulaatorsed (ingl *regulatory T cells*, Treg) rakud on CD4⁺ T-lümfotsüütide alampopulatsioon, millel on oluline roll immuunvastuse moduleerimises ja immuunotolerantsuse vahendamises ning selle kaudu immuunsüsteemi tasakaalu säilitamisel üldisemalt (Sakaguchi *et al.*, 2007). Treg rakkude regulaatorsed omadused seisnevad võimes suruda maha väga paljude erinevate immuunrakkude (näit CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakud, NK- ja NKT-rakud, B-rakud ning antigeeni esitlevad rakud) aktiveerumist, jagunemist ning efektoorse funktsiooni (Sakaguchi *et al.*, 2010).

Kontseptsioon Treg rakkudest pole uus, sest supressiivsete omadustega T-rakke kirjeldati juba 1970ndatel, kui leiti, et teatud T-rakud mitte ei vahenda immuunvastust, vaid suruvad seda alla (Gershon ja Kondo, 1970). Ent oluline läbimurre nende fenotüübi iseloomustamisel saavutati alles 1995. aastal, kui hiirtel tehti Treg markerina kindlaks CD25 ehk interleukiin

(ingl *interleukin*, IL) 2 retseptori α -ahel (Sakaguchi *et al.*, 1995). Hilisemates töödes tõestati, et CD25 ekspresseerub ka inimese Treg rakkudel (Dieckmann *et al.*, 2001, Ng *et al.*, 2001). Ka Foxp3 (ingl forkhead box P3) kirjeldati esmalt hiirtel kui peamist geeni, mis vastutab Treg rakkude arengu ja funktsioneerimise eest ning hiljem ka inimesel kui Treg spetsiifilist markerit (Sakaguchi *et al.*, 2010). Foxp3 geeni olulisus ilmneb nn funktsiooni kadumise (ingl *loss-of-function*) mutatsioonide korral, mis toovad kaasa autoimmuunhaigused nagu näiteks IPEX sündroom (ingl *immunoregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) (LaRosa ja Orange, 2008).

Treg immunofenotüüpiseerimise puhul on olnud probleemiks, et CD25 pole spetsiifiline Treg rakkudele, vaid võib avalduda ka teistel rakupopulatsioonidel, näiteks aktiveeritud T-rakkudel (Banham, 2006). Mittespetsiifilisusele viitab ka see, et CD25 suhtes positiivsed rakud võivad olla FOXP3-. Uue markerina pakuti välja IL-7 retseptori α -ahel (CD127), mille ekspressioon on vastupidine FOXP3-le ning Treg rakkudel oluliselt madalam kui teistel CD4+ rakkudel. Treg rakud on seega käsitletavad kui CD4+CD25+CD127low/- rakud (Liu *et al.*, 2006, Seddiki *et al.*, 2006). Sarnaselt konventsionaalsete T-rakkudega eristatakse ka Treg puhul mälurakke, mille tuvastamine toimub lähtuvalt CCR4 (CD194) ekspressioonist (Baatar *et al.*, 2007).

Lisaks loomulikele Treg rakkudele (ingl *natural* Treg, nTreg) on kirjeldatud ka indutseeritud rakke. nTreg rakud arenevad tuumuses ja ekspresseerivad CD25, kuna nende eksisteerimine on tugevas sõltuvuses IL-2-st. Indutseeritud Treg rakud aga arenevad tuumuseväliselt naiivsetest CD4+ T-rakkudest transformeeriva kasvufaktori β mõjul. Mõlemad populatsioonid on FOXP3+ ja neid ei saa funktsionaalselt eristada (LaRosa ja Orange, 2008).

1.4. B-lümfotsüüdid

B-lümfotsüütidel on keskne roll humoraalse immuunsuse kujunemises, mida vahendavad nende rakkude poolt toodetavad antikehad, mis osalevad rakuväliste patogeenide hävitamises, toksiinide neutraliseerimises, opsonisatsioonis ning komplemendi aktiveerimises (LaRosa ja Orange, 2008). B-rakkude arengus võib eristada järgnevaid etappe: pro-B-rakud, pre-B-rakud, ebaküpsed, transitsionaalsed ehk üleminekurakud, küpsed naiivsed B-rakud, mälu-B-rakud, plasmablastid ja plasmarakud (Leandro, 2013). B-rakkude varajane areng toimub luuüdis, kus eellasrakud diferentseeruvad pro- ja pre-B-rakkudeks, mille käigus leiab ühtlasi aset ka Ig

kergete ja raskete ahelate ümberorganiseerumine. Küpsemine ja diferentseerumine jätkub sekundaarsetes lümfoïdorganites (Morbach *et al.*, 2010).

Transitsionaalsed ehk üleminekurakud on esimene B-rakkude populatsioon, mis migreerub perifeersesse vereringesse ning neid iseloomustab kõrge CD38 ja CD24 ekspressiooni tase (Morbach *et al.*, 2010). B-rakke üldiselt iseloomustavad markerid on aga siiski CD19 ja CD20. CD19 osaleb rakusiseses signaali ülekandes ning on esindatud kõikidel B-raku populatsioonidel (LeBien ja Tedder, 2008). CD20 on küpsete B-rakkude spetsiifiline marker, mis ei avaldu varajastes arengujärkudes ega plasmarakkudel. CD20 on transmembraanne valk, mis toimib kui kaltsiumikanal ning on seotud B-raku aktivatsiooni ja jagunemisega (Leandro, 2013).

Naiivseid B-rakke iseloomustab immunoglobuliinide IgD ja IgM ekspressioon, kuid mälorakud ekspresseerivad oma pinnal isotüübi vahetuse tulemusena kas IgG, IgE või IgA. Mälorakkude markeriks on lisaks ka CD27 molekul (Abbas *et al.*, 2014), mille ekspressioon korreleerub rakkude suuremate mõõtmete ning võimega jaguneda ja diferentseeruda antikehi tootvateks rakkudeks (LeBien ja Tedder, 2008). Perifeerse vere naiivsete ja mälorakkude kindlakstegemiseks on ühed peamised markerid CD27 ja IgD, vastavalt mille ekspressioonile eristatakse nelja alampopulatsiooni: IgD+CD27- naiivsed B-rakud, IgD-CD27+ nn *switched*-mälorakud, mille puhul on toimunud antikeha isotüübi klassi vahetus; IgD+CD27+ nn *non-switched* mälorakud (nimetatakse ka marginaaltsooni B-rakkudeks), mille puhul pole klassi vahetust toimunud ning IgD-CD27- B-rakud (Morbach *et al.*, 2010). B-rakkude diferentseerumisastme kindlakstegemiseks kasutatakse näiteks ka CD38 ja IgD kombinatsiooni (Jackson *et al.*, 2008).

Plasmablastid on lühiealised antikehi tootvad rakud, mis võivad diferentseeruda küpseteks plasmarakkudeks (Leandro, 2013). B-rakkude nõ „mälu“ tagavadki ühelt poolt luuüdis paiknevad pikaalised plasmarakud, mis toodavad kõrge afiinsusega antikehi, teisalt aga ka tsirkuleerivad afiinsusküpsed (ingl *affinity-matured*) mälu B-rakud, mis taaskordsel võõrantigeeniga kokkupuutel diferentseeruvad efektorrakkudeks (Morbach *et al.*, 2010). Plasmablastid on tuvastatavad kui IgD- CD38++ CD27+ rakud (Jackson *et al.*, 2008).

1.5. NK-rakud

NK-rakkude nimi tuleb inglise keelest ning on lühend sõnadest „*natural killer*“ (seetõttu nimetatakse neid rakke ka loomulikeks tapjarakkudeks). NK-rakud on kaasasündinud immuunsuse üks komponent, mis moodustavad tsirkuleerivatest lümfotsüütidest ligikaudu 15%. Nad võivad lüüvida sihtmärkrakke ilma eelneva sensibiliseerumiseta ning sõltumatult MHC ekspressioonist (Cooper *et al.*, 2001). Organismis teevad NK-rakud märklaudrakke kindlaks MHC antigeeni olemasolu või puudumise (ingl *missing-self*) alusel. Selleks on neil inhibitoorsed tapja Ig-sarnased retseptorid (ingl *killer Ig-like receptor*, KIR), mis tunnevad ära MHC I molekule ning nende olemasolul takistavad normaalsete kehaomaste rakkude hävitamise (Vivier *et al.*, 2008).

NK-rakkude fenotüübile on iseloomulik CD56 ekspressioon ning CD3 puudumine. Enamiku NK-rakkude pinnal on avaldunud ka CD16 ehk Fc (ingl *Fragment crystallizable*) retseptor III, mis juhib antikeha-sõltuvat rakulist tsütotoksilisust (Bisset *et al.*, 2004). CD56 ekspressiooni alusel jagatakse NK-rakke CD56*dim* ja CD56*bright* (CD56*br*) alampopulatsioonideks, mis lisaks fenotüübile erinevad ka funktsiooni ja paiknemise poolest. Inglisekeelsed nimetused *dim* ja *bright* tähistavad siinkohal vastavalt CD56 madalat või kõrget ekspressiooni.

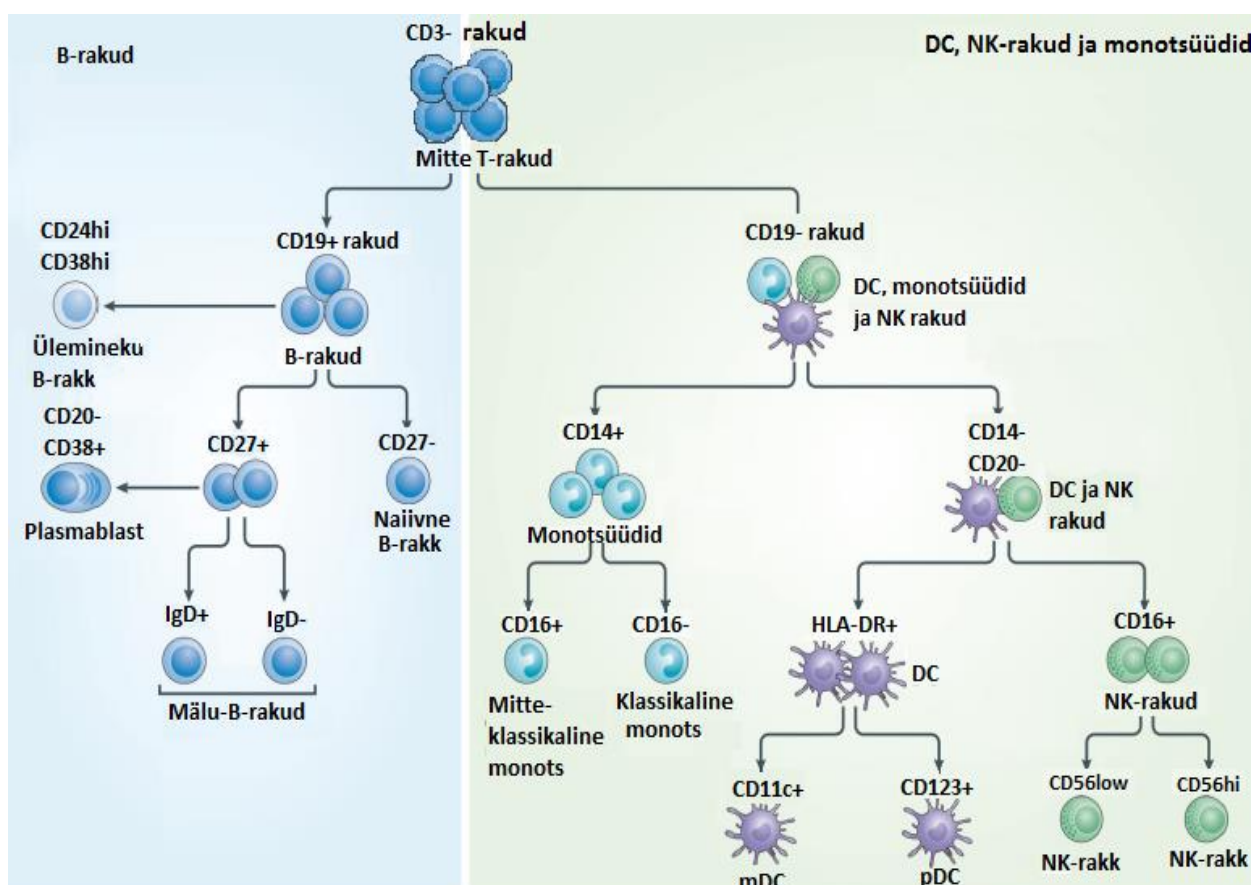
Umbes 90% perifeerses veres tsirkuleerivatest NK-rakkudest on CD56*dim*, lisaks iseloomustab neid rakke ka perforiini ja KIR ekspressioon. CD56*dim* rakud on väga tsütotoksilised ning sekreteerivad sihtmärkraku äratundmisel tsütokiine (Béziat *et al.*, 2011). Enamik lümfisõlmedes ja -koes paiknevatest NK-rakkudest on CD56*br*, millel puudub KIR ning perforiini sekretsioon (Vivier *et al.*, 2008, Béziat *et al.*, 2011). See alampopulatsioon on seotud immunoregulaatorse funktsiooniga ning nad toodavad erinevaid tsütokiinide (nt IFN- γ , TNF- α , IL-10) vastusena monokiini stimulatsioonile (Freud ja Caligiuri, 2006, Béziat *et al.*, 2011). *Ex vivo* tingimustes on CD56*dim* NK-rakud piiratud jagunemisvõimega, kuid üldiselt CD16 antigeeni suhtes positiivsed. Samas enamikul CD56*br* rakkudel see antigeen puudub ning need rakud on *ex vivo* suhteliselt madala tsütotoksilise potentsiaaliga (Freud ja Caligiuri, 2006). Ka on kirjeldatud CD56*dim* CD16+ alampopulatsiooni kui küpseid ning CD56*br* CD16- alampopulatsiooni kui ebaküpseid NK-rakke (Rudolf-Oliveira *et al.*, 2015).

1.6. Dendriittrakud

Dendriittrakud (ingl *dendritic cells*, DC) avastati 1970ndate alguses Ralph Steinmani ja Zanvil Cohni poolt. DC on antigeeni esitlevad rakud, millel on oluline roll immuunvastuse tekkes

(Liu *et al.*, 2010) ning nad kuuluvad koos monotsüütide ja makrofaagidega mononukleaarsete fagotsüütide süsteemi (Collin *et al.*, 2013). DC fenotüüpi iseloomustab CD45 ja MHC-II ekspressioon ning T-rakkude, NK-rakkude, B-rakkude, granulotsüütide ja erütroidsele liinile omaste markerite puudumine (ingl *lineage negative*, Lin-) (Merad *et al.*, 2013).

Veres tsirkuleerivate DC puhul eristatakse kaht peamist alampopulatsiooni: klassikalist ehk müeloidset (mDC; CD11c+ rakud) ja plasmatsütoidset liini (pDC; CD123+ rakud) (Shi *et al.*, 2008, Maecker *et al.*, 2012, Durand ja Segura, 2015) (joonis 3). Dendriitrakud jagatakse klassideks pinnamarkerite, paiknemise ja funktsiooni alusel – plasmatsütoidseid DC-d iseloomustab morfoloogiline sarnasus plasmarakkudele ning omadus toota viraalse stiimuli mõjul suures koguses interferoon α -t (ingl *interferon* α , INF α). Klassikalised DC asuvad lümfooidsetes ja mittelümfooidsetes kudedes (Merad *et al.*, 2013).



Joonis 3. B-rakkude, dendriitrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide alampopulatsioonideks jaotamine. CD3 puudumise ja CD19 olemasolu põhjal eristatakse B-rakke. B-rakud jaotatakse naiivseteks ja mälu-rakkudeks, vastavalt IgD ja CD27 ekspressioonile. Lisaks eristatakse ka plasmablaste ja üleminekurakke. CD3 ja CD19 puudumise alusel eristatakse NK- ning dendriit-rakke (DC) ja monotsüüte. Viimased jaotuvad CD14 ja CD16 ekspressiooni alusel omakorda klassikaliseks ja mitteklassikaliseks monotsüütideks. HLA-DR ja CD16 ekspressiooni alusel eristatakse NK ja DC rakke, viimaste puhul eristatakse müeloidseid (mDC) ja plasmatsütoidseid (pDC) rakke. NK-rakud jagunevad aga kahte alampopulatsiooni vastavalt CD56 ekspressioonitasemel. (Maecker *et al.* (2012) järgi, autori kohandused).

pDC rakud reguleerivad Th2 rakkude ning mDC Th1 rakkude funktsiooni (Shi *et al.*, 2008). pDC-del puudub müeloidsetele DC-dele omaste antigeenide ekspresioon ning nende fenotüüp on iseloomustatav kui Lin⁻ MHCII⁺ CD303(BDCA2)⁺ CD304(BDCA4)⁺ (Merad *et al.*, 2013), samuti on pDC-le iseloomulik CD123 (IL-3R) olemasolu (Collin *et al.*, 2013). cDC ehk mDC fenotüüpi kirjeldatakse vastavalt Lin⁻ MHCII⁺ CD11c⁺ (Merad *et al.*, 2013), lisaks ekspresseerivad mDC-d ka teisi tüüpilisi müeloidseid antigeene nagu CD13, CD33 ja CD11b (Collin *et al.*, 2013).

mDC puhul omakorda võib eristada kahte rakutüüpi: BDCA1/CD1c⁺ mDC ja BDCA3/CD141⁺ mDC (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010, Durand ja Segura, 2015). CD1c⁺ mDC on peamine perifeerses veres paiknev DC alampopulatsioon (Merad *et al.*, 2013). DC puhul on kirjeldatud ka alampopulatsiooni, mida iseloomustab 6-Sulfo LacNAc ehk Slan ekspresioon ning millele on omane kõrge TNF-a tase (Hänsel *et al.*, 2011).

1.7. Monotsüüdid

Nagu DC ja NK-rakud, on ka monotsüüdid osa kaasasündinud immuunsust tagavatest rakkudest ning nad pärinevad DC-ga samast eellasest. Monotsüütide jaotumine alampopulatsioonideks põhineb CD14 (lipopolüsahhariidi retseptor) ja CD16 (Fcγ III retseptor) ekspresioonil (Shantsila *et al.*, 2011). Eristatakse klassikalisi (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediaalseid (CD14⁺⁺CD16⁺⁺) ning mitteklassikalisi (CD14⁺CD16⁺⁺) monotsüüte (Saha ja Geismann, 2011). Varasem klassifikatsioon eristas ainult klassikalisi ja mitteklassikalisi monotsüüte (Maecker *et al.*, 2012). Klassikalised monotsüüdid toodavad suurel hulgal põletikumediaatoreid ning võivad migreeruda kiiresti põletiku- või vigastuse koldesse. Mitteklassikalised monotsüüdid on seotud kudede taastamisega vigastuse järgselt ning samuti nõ „patrullimisega“ endoteeli pinnal (Abbas *et al.*, 2014).

1.8. Autoimmuunhaigused

Normaalselt funktsioneeriv immuunsüsteem tunneb ära ja reageerib organismi sattunud võõrantigeenidele, kusjuures samal ajal säilib immunoloogiline tolerantsus organismi enda ehk autoloogsete antigeenide suhtes. Kui tolerantsust ei säilitata, siis võib tekkida immuunvastus organismi autoloogsete antigeenide suhtes, mis omakorda võib olla põhjuseks autoimmuunhaiguse tekkeks. Autoimmuunhaiguste iseloomulikud tunnused on:

- Sõltuvalt autoantigeenide levikust on autoimmuunhaigused kas süsteemsed või organspetsiifilised. Immuunvastus kindlates kudedes levinud autoantigeenide vastu põhjustab organspetsiifilisi haigusi nagu esimest tüüpi diabeet (T1D). Süsteemsed haigused, nagu näiteks süsteemne erütematoosne luupus, on seotud autoantigeenidega, mille levik pole piiratud kindlate kudedega.
- Koekahjustus on autoimmuunhaiguste puhul vahendatud erinevate efektormehhanismide kaudu. Need mehhanismid hõlmavad immuunkomplekse, tsirkuleerivaid autoantikehi ja autoreaktiivseid T-rakke. Haiguse kliiniline pilt ja patoloogilised iseärasused on üldjuhul määratletud domineeriva autoimmuunvastuse poolt.
- Autoimmuunhaigused kalduvad olema kroonilised ja progressiivse kuluga. Selle põhjuseks on asjaolu, et autoantigeenid hoiavad järjepidevalt juba tekkinud immuunvastust üleval. Samas võib ka ühe autoantigeeni vastu tekkinud, kudesid kahjustav reaktsioon tuua kaasa teiste koekahjustuste vabanemise ning nendele antigeenidele spetsiifiliste lümfotsüütide aktivatsiooni, mis omakorda viib haiguse ägenemiseni (Abbas *et al.*, 2014).

Esimest tüüpi diabeet on autoimmuunhaigus, mida iseloomustab progressiivne immuunvahendatud pankrease β -rakkude hävinemine ning β -rakkude vastaste autoantikehade olemasolu (Abbas *et al.*, 2014). Sarnaselt mitmete teiste autoimmuunhaigustega, on T1D puhul kirjeldatud muutusi perifeerse vere rakkude repertuaaris. T-rakkude puhul on leitud, et CD26 ekspressiooni suhtes positiivsete CD4+ ja CD8+ rakkude hulgas on tsentraalsete mälu T-rakkude ja naiivsete rakkude arv T1D patsientidel võrrelduna kontrollidega oluliselt vähenenud, samas kui TEMRA rakkude arv on jällegi tõusnud (Matteucci *et al.*, 2011). DC puhul on näidatud pDC oluliselt suuremat hulka T1D patsientidel (Allen *et al.*, 2008, Xia *et al.*, 2014), samas kui mDC hulk on haigetel oluliselt väiksem (Allen *et al.*, 2008) või haigete ja kontrolli vahel erinevus puudub (Xia *et al.*, 2014).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eksperimentaalse osa eesmärk on analüüsida erinevate immuunrakkude, täpsemalt T-lümfotsüütide, T-regulatoorsete rakkude, B-lümfotsüütide, dendriitrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide absoluutarvude varieeruvust tervete isikute perifeerses veres ning analüüsida meetodi rakendatavust 1. tüüpi diabeedihaigetel.

Eesmärgist lähtuvalt püstitati järgnevad tööülesanded:

- Hinnata HIP-C tööprotokolli versiooni 3.3 sobivust immuunrakkude, täpsemalt T-, B-, NK-rakkude, dendriitrakkude ja monotsüütide ning nende alampopulatsioonide määramiseks
- Leida nimetatud rakupopulatsioonidele ning nende alampopulatsioonidele referentsväärtused
- Hinnata erinevate rakupopulatsioonide absoluutväärtuste erinevusi meeste ja naiste osas ning nende seost uuritavate vanusega;
- Võrrelda tervete laste immuunrakkude absoluutväärtusi 1. tüüpi diabeeti (T1D) põdevate patsientide tulemustega

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Valim ja uuringumaterjal

Uuritavad kaasati töösse projekti „Diabeedi immuunmehhanismid (IUT20-43)“ raames. Uuringus osales 55 tervet isikut vanuses 11 – 71 aastat (keskmine vanus 32,1 aastat), kellest 16 olid meessoost vanuses 21,2 – 61,4 (keskmine vanus 34,3) ning 39 naissoost uuritavat vanuses 11,0 – 71,0 (keskmine vanus 31,8). Neli uuritavat olid nooremad kui 18 aastat ning kõik neist naissoost. Lisaks tervetele isikutele kaasati uuringusse ka seitse T1D patsienti vanuses 5 – 13 aastat (keskmine vanus 8,7), kellest viis olid naissoost ja kaks meessoost. Uuringusse kaasamine toimus vabatahtlikkuse alusel ning kõik osalejad (laste puhul nende vanemad) täitsid uuringus osalemise teadliku nõusoleku vormi ning ankeedi (LISA 1). Uuring viidi läbi Tartu Ülikooli eetikakomitee loa 163/T-6 (24.09.2007) alusel.

2.2.2. Immuunofenotüpiseerimine

Kõikidelt uuritavatelt koguti 4 ml veeniverd BD Vacutainer® liitium-hepariin või naatrium-hepariin katsutisse. Immuunofenotüpiseerimine teostati nelja erineva antikehade kombinatsiooni ehk paneeli suhtes: 1) T-rakkude paneel; 2) T reguleerivate rakkude paneel; 3) B-rakkude paneel ning 4) dendriitrakkude, NK-rakkude ning monotsüütide paneel. Immuunofenotüpiseerimiseks kasutatud rakumarkerid, neid äratundvad fluorokroomidega seotud monoklonaalsete antikehade kloonid ning antikehade lahjendused on valitud vastavalt HIP-C v3.3 protokollile ning need on ära toodud tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud rakumarkerid ning neid äratundavad monokloonsete antikehade kloonid paneelide kaupa

	Raku marker	Klooni nimetus	Lahjendus	Raku marker	Klooni nimetus	Lahjendus
Fluorokroom	T-rakkude paneel			Treg paneel		
AF488	CD183**	G025H7	1,25µl = 1:120			
PerCPCy5.5	CD4*	RPA-T4	1,25µl = 1:120	CD4*	RPA-T4	1,25µl = 1:120
PE	CD197*	150503	10µl = 1:15	CD25*	M-A251	5µl = 1:30
PE-Cy7	CD45RA*	HI100	2,5µl = 1:60	CD194*	1G1	2,5µl = 1:60
APC	CD38*	HIT2	10µl = 1:15			
AF647				CD127*	hIL-7R-M21	10µl = 1:15
AF700	CD45**	HI30	0,5µl = 1:300	CD45**	HI30	0,5µl = 1:300
APC-H7	CD8*	SK1	2,5µl = 1:60	CD45RO*	UCHL1	2,5µl = 1:60
V450	CD3*	UCHT1	2,5µl = 1:60	CD3*	UCHT1	2,5µl = 1:60
V500	HLA-DR*	L243(G46-6)	2,5µl = 1:60	HLA-DR*	L243(G46-6)	2,5µl = 1:60
BV 605	CD196**	G034E3	1,25µl = 1:120			
	Antikehade segu 34,25 µl + 15,75 µl PBS			Antikehade segu 26,75µl + 23,25µl PBS		
	B-rakkude paneel			DC-MONO-NK paneel		
FITC	CD24*	ML5	10µl = 1:15	Slan****	DD-1	5µl = 1:30
PerCPCy5.5	CD19*	HIB19	2,5µl = 1:60	CD123*	7G3	10µl = 1:15
				CD56****	MY31	5µl = 1:30
PE-Cy7	IgD**	IA6-2	2,5µl = 1:60	CD11c*	B-LY6	2,5µl = 1:60
APC	CD38*	HIT2	10µl = 1:30	CD16*	B73.1	5µl = 1:30
AF700	CD45**	HI30	0,5µl = 1:300	CD45**	HI30	0,5µl = 1:300
APC-H7	CD20*	L27	2,5µl = 1:60	CD3	SK7	
				CD19	HIB19	2,5µl = 1:60
				CD20	L27	
V450				CD14*	MoP9	2,5µl = 1:60
BV 421	CD27**	O323	2,5µl = 1:60			
V500	CD3*	UCHT1	2,5µl = 1:60	HLA-DR*	L243(G46-6)	2,5µl = 1:60
BV 605				CD8a**	RPA-T8	1,25µl = 1:120
	Antikehade segu: 43µl + 7 µl PBS			Antikehade segu: 41,75 + 8,25 µl PBS		

Tootjad: * - Becton Dickinson (BD), ** - BioLegend, *** - Beckman Coulter, **** - Miltenyi Biotec

2.2.3. Rakkude märgistamine fluorokroomidega seotud monoklonaalsete antikehadega

Iga paneeli kohta kasutati 100 µl täisverd, millele lisati 50 µl antikehade segu PBS-is vastavalt tabelis 1 toodud lahjendustele. Seejärel inkubeeriti proove 30 minutit toatemperatuuril pimedas ning lisati 2 ml 1x lüüsilahust (FACS *Lysing Solution*, BD) ja segati 5 sekundit, millele järgnes 10 minutit inkubatsiooni samadel tingimustel. Pärast lüüsimist tsentrifugeeriti (*Biofuge PrimoR*, Heraeus) proove 400g juures 5 minutit toatemperatuuril, supernatant eemaldati ning proovid resuspendeeriti 2 ml puhvris BD *PharmingenStain Buffer* (BSA). Seejärel tsentrifugeeriti rakud 400g 5 minutit toatemperatuuril, supernatant eemaldati ning proovid resuspendeeriti 300 µl FACS puhvris, misjärel analüüsiti proovid läbivoolu tsütofluorimeetri abil.

Tabel 2. Kasutatud fluorokroomid ja markervalgud (HIP-C protokoll 3.3, autori kohandused)

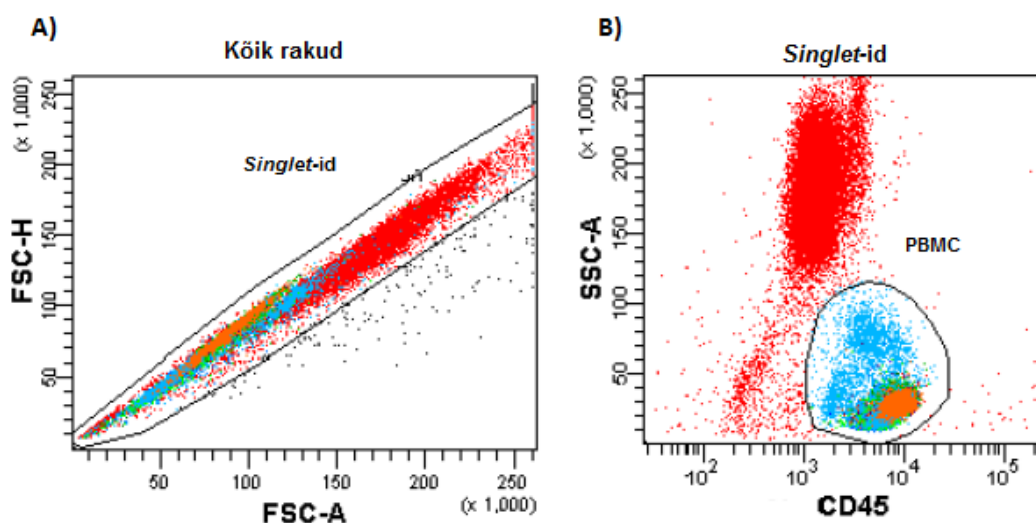
Fluorokroomid	T-rakkude Paneel	Treg paneel	B-rakkude paneel	DC/mono/NK paneel
Fitc			CD24	Slan
AF488	CD183 (CXCR3)			
PerCP-Cy5.5	CD4	CD4	CD19	CD123
PE	CD197 (CCR7)	CD25		CD56
PE-Cy7	CD45RA	CD194 (CCR4)	IgD	CD11c
APC	CD38		CD38	CD16
AF647		CD127		
AF700	CD45	CD45	CD45	CD45
APC-H7	CD8	CD45RO	CD20	CD3+CD19+CD20
V450	CD3	CD3		CD14
BV 421			CD27	
V500	HLA-DR	HLA-DR	CD3	HLA-DR
BV 605	CD196 (CCR6)			CD8a

2.2.4. Läbivoolu tsütofluorimeetria

Läbivoolu tsütofluorimeetiline immunofenotüpiseerimine teostati analüsaatoril LSR Fortessa (BD Biosciences) ning tulemusi analüüsiti kasutades BD FACSDiva™ tarkvara. LSR Fortessa on 5 laseriga voolutsütomeeter (käesolevas töös uuritud parameetrite mõõtmiseks rakendati nelja esimest): sinine (488nm), violetne (405nm), punane (640nm), kollane-roheline (561nm) ja ultravioletne (355nm) (tabel 2). Läbivoolu tsütofluorimeetri seadistamine ning kasutatud fluorokroomidele vastav kompensatsioon teostati toetudes HIP-C protokollile versioonile 3.3. Kompensatsiooniks kasutati CompBeads *Negative Control* (BD™) ja CompBeads *Anti-Mouse Ig* (BD™) kerasid. Igapäevaseks rutiinseks kontrolliks ja masina seaditamiseks kasutati *Cytometer Setup and Tracking* (BD™) kerasid. Igas proovis analüüsiti võimalusel 300000 rakku (ingl *event*). Rakupopulatsioonide eristamine (ingl *gating*) teostati käsitsi, tuginedes peamiselt HIP-C protokollile versioonile 3.3 ning ENTIRE töögrupi poolt välja töötatud täiendustele. Rakupopulatsioonide eristamise põhimõte on ära toodud joonistel 4 – 8 (autori koostatud).

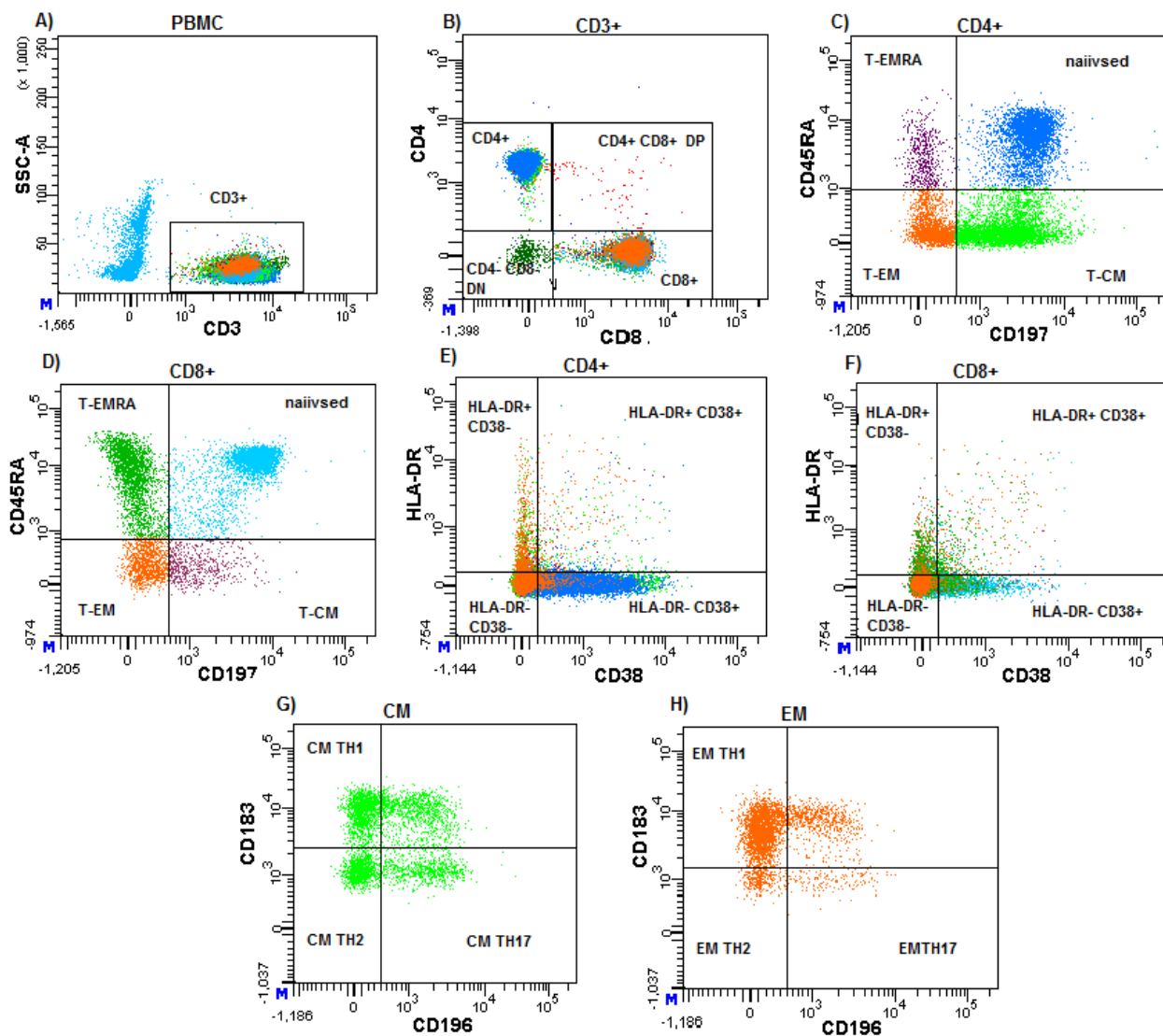
2.2.5. Rakupopulatsioonide eristamine paneelide kaupa

Erinevate paneelide osas toimus rakupopulatsioonide eristamine nii nagu on esitatud joonistel 4 – 8. Kõikide paneelide puhul teostati esimese sammuna üksikute rakupopulatsioonide nn „*singlet*“ eristamine kasutades FSH-H versus FSC-A. Järgmisena eristati PBMC populatsioon kasutades SSC-A vs CD45 (joonis 4).



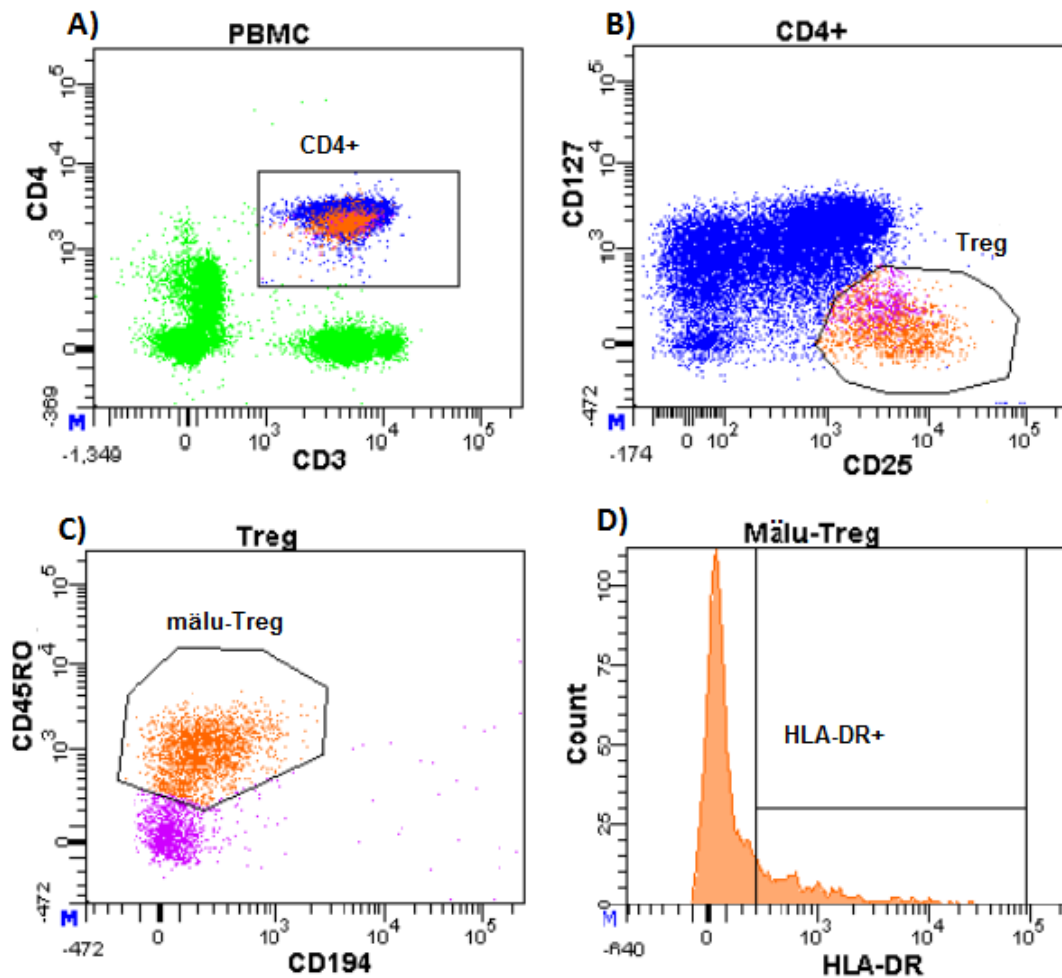
Joonis 4. A) Üksikute rakupopulatsioonide eristamine kasutades FSC-H vs FSC-A; B) PBMC eristamine: SSC-A vs CD45

Alampopulatsioonide eristamine T-rakkude paneelis



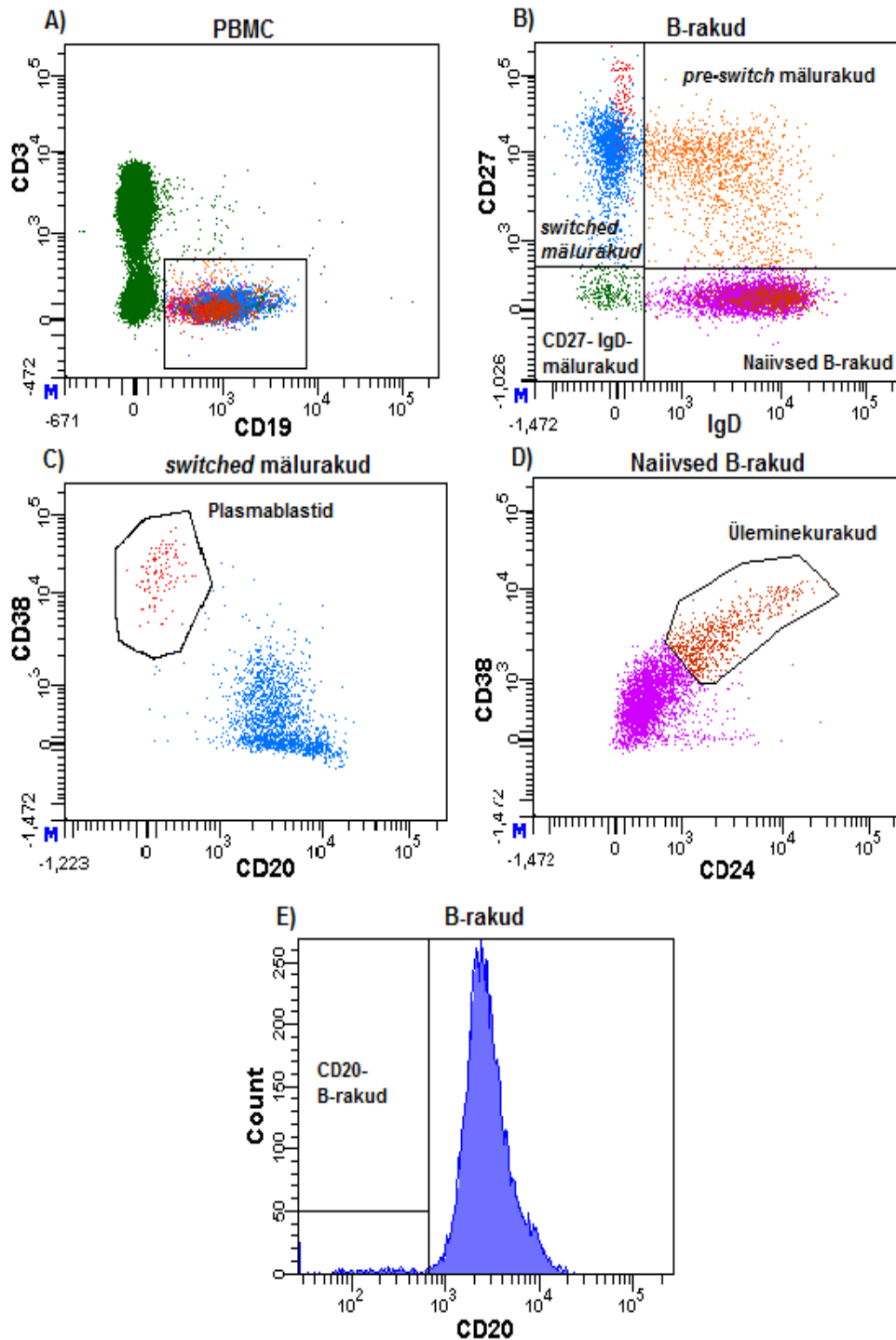
Joonis 5. T-rakkude alampopulatsioonide eristamine. A) CD3+ rakkude eristamine PBMC-dest: SSC-A vs CD3; B) CD4+, CD8+, CD4+ CD8+ topelpositiivsete (DP) JA CD4-CD8- topelnegatiivsete (DN) rakkude eristamine: CD4 vs CD8; C) Naiivsete, T-EMRA, efektor mälu T-rakkude (TEM), tsentraalsete mälu T-rakkude (T-CM) eristamine CD4+ rakkudest: CD45RA vs CD197; D) Naiivsete, T-EMRA, T-EM JA T-CM rakkude eristamine CD8+ rakkudest: CD45RA vs CD197; E) Aktiveerunud rakkude eristamine CD4+ rakkudest; F) Aktiveerunud rakkude eristamine CD8+ rakkudest; G) Th-1, Th2 ja Th17 rakkude eristamine CM-rakkudest: CD183 vs CD196; H) Th-1, Th2 ja Th17 rakkude eristamine EM-rakkudest: CD183 vs CD196.

Alampopulatsioonide eristamine Treg paneelis



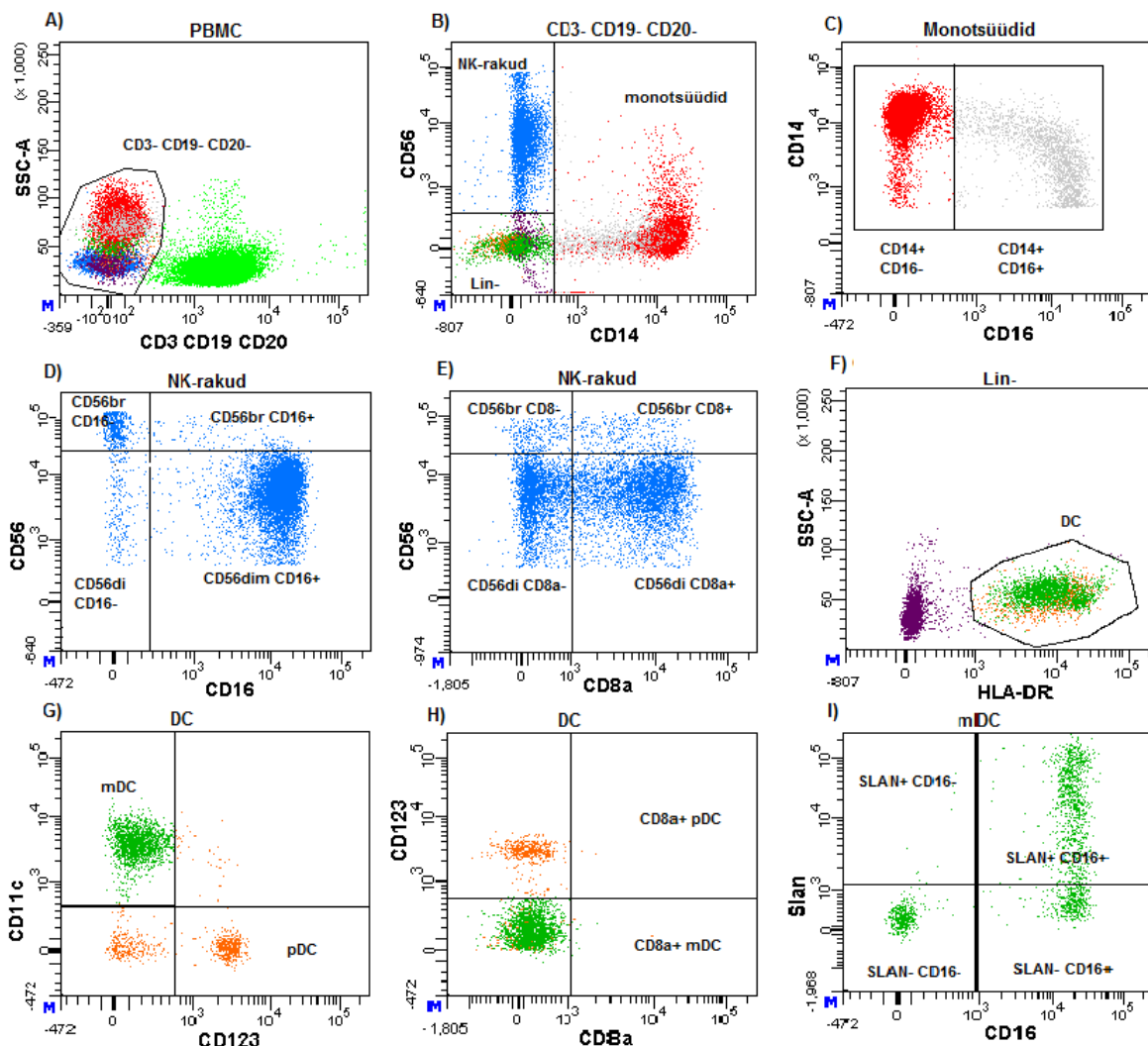
Joonis 6. Treg alampopulatsioonide eristamine. A) CD4+ rakkude eristamine PBMC-dest kasutades CD4 vs CD3; B) Treg rakkude eristamine CD4+rakkudest kasutades CD127 vs CD25 C) mälü-Treg alampopulatsiooni eristamine Treg-dest kasutades CD45RO vs CD194; D) HLA-DR+ rakkude eristamine mälü-Treg-dest

Alampopulatsioonide eristamine B-rakkude paneelis



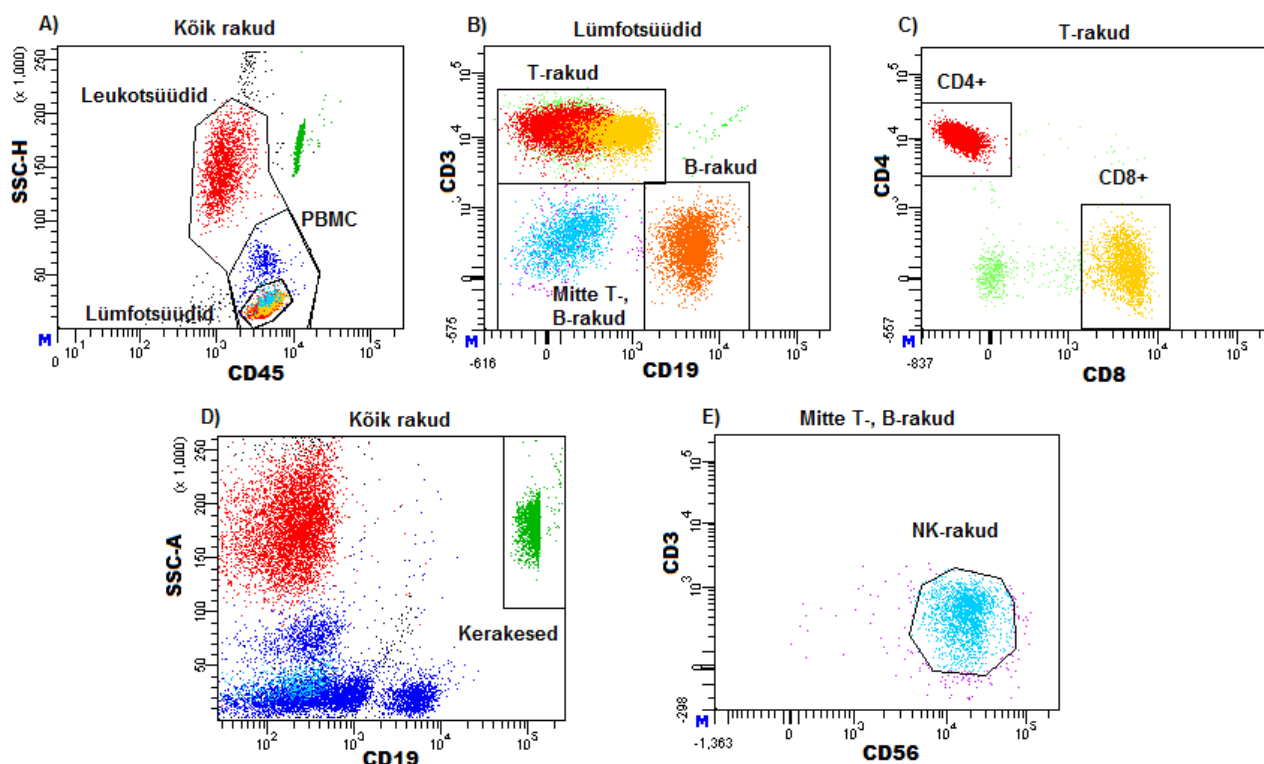
Joonis 7. B-rakkude alampopulatsioonide eristamine. A) B-rakkude eristamine PBMCdest kasutades CD3 vs CD19; B) Naiivsete ja mälurakkude eristamine B-rakkudest kasutades CD27 vs IgD C) Plasmablastide eristamine *switched*-mälurakkudest kasutades CD38 vs CD20; D) Üleminekurakkude eristamine naiivsetest kasutades CD38 vs CD24; E) CD20-rakkude eristamine B-rakkudest.

Alampopulatsioonide eristamine DC, NK-rakkude ja monotsüütide paneelis



Joonis 8. Dendriitrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide alampopulatsioonide eristamine. A) CD3- CD19- CD20- rakkude eristamine PBMC-dest kasutades SSC-A vs CD3 CD19 CD20; B) NK, Lin- ja monotsüütide eristamine kasutades CD56 vs CD14; C) CD14+ CD16- ja CD14+ CD16+ monotsüütide eristamine kasutades CD14 vs CD16; D) NK-rakkude alampopulatsioonide eristamine kasutades CD56 vs CD16; E) NK-rakkude alampopulatsioonide eristamine kasutades CD56 vs CD8a; F) DC eristamine Lin- rakkudest kasutades SSC-A vs HLA-DR; G) mDC ja pDC eristamine DC-st kasutades CD11c vs CD123; H) DC alampopulatsioonide eristamine kasutades CD123 vs CD8a; I) mDC alampopulatsioonide eristamine kasutades Slan vs CD16.

Alampopulatsioonide eristamine TBNK puhul



Joonis 9. TBNK alampopulatsioonide ning kerakeste eristamine. A) Leukotsüütide, PBMC-de ja lümfotsüütide eristamine kõikidest loetud rakkudest kasutades SSC-H vs CD45; B) T-rakkude, B-rakkude ning mitte T-, B-rakkude eristamine lümfotsüütidest kasutades CD3 vs CD19; C) CD4+ ja CD8+ rakkude eristamine T-rakkudest kasutades CD4 vs CD8; D) Kerakeste eristamine kõikidest loetud rakkudest kasutades SSC-A vs CD19; E) NK-rakkude eristamine mitte T-,B-rakkude populatsioonist kasutades CD3 vs CD56.

2.2.6. Rakupopulatsioonide absoluutväärtuste määramine

Rakupopulatsioonide absoluutväärtused arvutati *single-platform* meetodi abil. Selleks kasutati BD *Multitest™ 6-color* TBNK reagenti, mis on mõeldud T-, B- ja NK-rakkude eristamiseks, ning BD *Trucount™* katsuteid. TBNK reagent sisaldas segu järgnevatest fluorokroomidega seotud antikehadest: FITC-märgistatud CD3 (kloon SK7), PE-märgistatud CD16 (kloon B73) ja CD56 (kloon NCAM), PerCP-Cy™5.5-märgistatud CD45 (kloon 2D1 (HLe-1), PE-Cy™7*-märgistatud CD4 (kloon SK3), APC-märgistatud CD19 (kloon SJ25C1) ning APC-Cy7*-märgistatud CD8 (kloon SK1). Katsutid sisaldasid tootja poolt kindlaks määratud hulgal (ligikaudu 50000) lüofiliseeritud fluorestseeruvaid kerakesi (ingl *beads*).

Katsutisse lisati 50 µl täisverd ning 20 µL BD *Multitest 6-color* TBNK antikehade segu, seejärel proov segati ja inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril. Pärast inkubeerimist lisati

proovile 400 µl 1x lüüsilahust FACS *Lysing Solution* (BD), segati ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Seejärel analüüsiti proove LSR Fortessaga. Loeti 50 000 sündmust ning rakkude absoluutväärtused arvutati vastavalt järgnevale valemile:

$$\frac{\text{rakkude arv}}{\text{eristatud kerade arv}} \times \frac{\text{kerade arv katsutis}}{\text{proovi maht (50µl)}} = \text{populatsiooni absoluutväärtus}$$

2.2.7. Statistiline analüüs

Andmeid analüüsiti kasutades Excel 2013 ja MedCalc 13.3 statistikaprogrammi. Referentsvahemike arvutamisel kontrolliti Shapiro-Wilk testiga andmete vastavust normaaljaotusele. Populatsioonide puhul, mis vastasid normaaljaotusele, kasutati referentsvahemike arvutamisel parameetrilist meetodit. Populatsioonide puhul, mis ei vastanud normaaljaotusele, hinnati nende asümmeetriat (ingl *skewness*) ning kuna kõik neist olid positiivse asümmeetriaga (ehk nn „parempoolse sabaga“) rakendati normaaljaotuse saavutamiseks logaritmilist transformatsiooni. Populatsioonide puhul, mis ka seejärel ei vastanud normaaljaotusele, kasutati referentsvahemike arvutamiseks robustset meetodit.

Naiste ja meeste vaheliste erinevuste hindamiseks erinevates rakupopulatsioonides võrreldi mediaanväärtusi, selleks kasutati Mann-Whitney testi ning statistiliselt oluliseks loeti tulemused kui $p < 0,05$. Vanuse ja rakupopulatsioonide vahelise korrelatsiooni hindamiseks kasutati Spearmani korrelatsiooni testi (ingl *Spearman's rank correlation test*), kus r tähistab korrelatsiooni suunda ning oluliseks loeti tulemused kui $p < 0,05$.

2.3. Tulemused ja arutelu

Magistritöö eesmärk oli kirjeldada immuunrakkude varieeruvust tervete inimeste perifeerses veres, eesmärgiga kindlaks teha erinevate immuunrakkude ja nende alampopulatsioonide referentsvahemikud. Tervete inimeste andmetel põhinevad referentsvahemikud mistahes biomarkerite on kliinilises praktikas äärmiselt olulised terviseseisundi hindamiseks, erinevate haiguste diagnostikas, haiguskulu prognoosimiseks, aga ka ravitulemuste jälgimisel.

Töö tulemused on esitatud järgnevas tabelites (tabelid 3 – 14) paneelide kaupa. Erinevaid rakupopulatsioone analüüsiti nii üldpopulatsiooni suhtes kui ka meeste ja naiste hulgas eraldi. Ühtlasi vaadeldi erinevate rakupopulatsioonide esinemist seoses vanusega. Kuigi uuringusse kaasati koos tervete täiskasvanutega ka neli tervet last, otsustati täiskasvanute tulemusi analüüsida laste tulemustest eraldi. Nii ei kasutatud laste tulemusi ka meeste ja naiste võrdlemisel, samuti mitte vanuselise korrelatsiooni arvutamisel.

Kuna uuritavate hulk ei olnud käesolevas töös piisavalt suur, selleks et leida meestele ja naistele ning erinevatele vanusegruppidele iseseisvaid referentsväärtusi, siis arvutati referentsvahemikud üldpopulatsiooni näitajate alusel. Asjaolud, a) et mitmete populatsioonide puhul osutus referentsvahemik üsna suureks, b) et ilmnesis meeste ja naiste vahelised erinevused ning c) et rakupopulatsioonide suurus on seoses vanusega, tingivad vajaduse leida neile gruppidele iseseisvad referentsvahemikud. Seega on edaspidi vaja suurendada uuritavate tervete inimeste hulka ning seda just eriti meessoost ja vanemate isikute osas.

T-rakud

Tabelis 3 esitatud T-rakkude alampopulatsioonide tulemused on kooskõlas varasemate töödega. Al Qouzi *et al.* (2002), Rovati *et al.* (2014), Valiathan *et al.* (2014) ja Rudolf-Oliveira *et al.* (2015) poolt läbi viidud uuringutes saadi T-lümfotsüütide ehk CD3+, CD4+ *helper* ja CD8+ tsütotoksiliste T-rakkude osas mõnevõrra kõrgem väärtus kui käesolevas töös, seevastu Bisset *et al.* (2004) töös aga madalam.

Ka CD4+ naiivsete rakkude puhul saadi Rovati *et al.* ja Valiathan *et al.* töödes kõrgemad väärtused, Bisset *et al.* ja Jiao *et al.* (2009) töödes aga madalamad. Siinkohal on oluline märkida, et kahes esimeses uuringus iseloomustati naiivseid rakke kui CD4+CD45RA+, kahes viimati nimetatus kui CD4+ CD45RA+ CD62L+, käesolevas töös käsitleti neid aga kui CD4+ CD45RA+ CD197+. Seega võivad erinevused olla tingitud erinevatest markervalkude

kombinatsioonidest. On leitud, et CD62L ekspressioonitaset mõjutavad tugevalt näiteks PBMC eraldamine tihedusgradiendi abil (Lin *et al.*, 2002) ja külmutamine vedelas lämmastikus (Weinberg *et al.*, 2009).

Kuigi Bisset *et al.* ja Jiao *et al.* töödes kasutati uuringumaterjalina värsket täisverd, võib CD4⁺ naiivsete rakkude väiksem hulk viidata CD62L mittesobivusele selle populatsiooni identifitseerimiseks. Samas võivad väiksemad väärtused olla tingitud hoopis uuritavate populatsioonide vahelisest erinevusest. Seega, populatsioonide võrdlemist lihtsustaks standardiseeritud meetodika olemasolu, milles kasutatakse samu markereid. Rovati *et al.* ja Valiathan *et al.* töödes saadud suuremad väärtused võivad tuleneda ka sellest, et nende poolt kasutatud markerite kombinatsioon CD4⁺CD45RA⁺ ei tuvasta mitte üksnes naiivseid rakke, vaid võib sisaldada ka TEMRA populatsiooni.

Ka mälorakkude tuvastamiseks kasutati käesolevast tööst erinevaid markereid: vastavalt CD4⁺ CD45RO⁺ (Bisset *et al.*, Rovati *et al.* ja Valiathan *et al.*) või CD4⁺ CD45⁻ (Jiao *et al.*). Olenemata sellest, et kasutati samu markereid, saadi Valiathan *et al.* töös kaks korda suurem väärtus kui Bisset *et al.* ja Rovati *et al.* puhul, samas Jiao *et al.* tulemus oli kooskõlas kahe viimase tööga. Käesolevas töös eristati nii CD4⁺ kui ka CD8⁺ puhul efektor- (CD45RA⁻ CD197⁻) kui ka tsentraalseid (CD45RA⁻ CD197⁺) mälorakkude alampopulatsioone ning nende populatsioonide tulemuste summa on kooskõlas Bisset *et al.*, Rovati *et al.* ja Jiao *et al.* töödes saadud mälorakkude tulemustega.

Sarnaselt käesoleva tööga kasutasid ka Bisset *et al.* (2004) aktiveeritud CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakkude kindlaks tegemiseks markereid HLA-DR ja CD38. Meie tööga võrreldes on HLA-DR⁺ ja/või CD38⁺ rakkude väärtused madalamad, seda just eriti CD8⁺ rakkude puhul.

Tabel 3. T-lümfotsüütide referentsväärtused

	Mediaan	Keskmine	SD	Referentsvahemik
CD3+	1317,0	1364,1	478,4	427 – 2302
CD4+	778,1	820,0	335,1	351 – 1644
CD4+ naiivsed	357,6	411,9	272,4	91 – 1242
CD4+ T-EMRA	4,8	12,9	19,8	0 – 72
CD4+ T-EM	89,5	99,5	45,3	37 - 220
CD4+ EM TH1	35,2	45,5	30,2	11 - 128
CD4+ EM TH2	6,9	8,1	4,7	2 – 22
CD4+ EM TH17	10,5	11,3	5,6	4 – 27
CD4+ T-CM	284,9	299,9	95,6	113 - 487
CD4+ CM TH1	71,4	76,9	29,9	18 – 136
CD4+ CM TH2	51,2	55,2	25,3	22-117
CD4+ CM TH17	68,8	73,2	25,6	23 – 123
CD4+ DR+CD38-	30,9	35,2	20,8	10 – 93
CD4+ DR+CD38+	17,0	18,4	8,6	6 – 46
CD4+ DR-CD38-	322,9	333,4	107,3	123 – 544
CD4+ DR-CD38+	347,5	433,1	291,5	103 – 1236
CD8+	444,2	450,8	177,2	104 – 798
CD8+ naiivsed	169,2	196,6	124,4	0 – 413
CD8+ T-EMRA	106,3	137,6	102,8	24 – 472
CD8+ T-EM	68,5	81,5	49,0	21 – 226
CD8+ T-CM	33,3	38,4	23,6	12 – 94
CD8+ DR+CD38-	39,9	45,4	34,8	8 – 157
CD8+ DR+CD38+	19,9	24,0	14,6	7 – 62
CD8+ DR-CD38-	249,4	259,6	116,5	31 – 488
CD8+ DR-CD38+	97,6	121,9	89,9	21 – 426
CD4CD8 DP	8,8	11,9	11,2	2 – 36
CD4CD8 DN	78,0	82,1	68,8	13 – 293

Käesolevas töös ilmnisid naistel võrrelduna meestega oluliselt suuremad väärtused CD4+ *helper*-rakkude, CD4+ naiivsete rakkude, CD4+ T-EMRA rakkude, efektormälu Th1 rakkude, tsentraalmälu Th1 rakkude, HLA-DR+ CD38+ CD4+, CD4+ HLA-DR- CD38+ ja CD4+CD8+ DP rakkude alampopulatsioonides. Meestel oli CD8+ efektor-mälurakkude hulk suurem kui naistel (Tabel 4). CD4+ rakkude suuremad väärtused naistel on kooskõlas mitmete varasemate tööde tulemustega (Bisset *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2009, Rovati *et al.*, 2014, Rudolf-Oliveira *et al.*, 2015). Seda tendentsi on seostatud suguhormoonide mõjuga T-

lümfootsüütide alampopulatsioonidele (Saxena *et al.*, 2004). Valiathan *et al.* töös selline erinevus aga välja ei tulnud. CD8+ rakkude puhul meeste ja naiste vahel erinevus puudus, mis samuti vastab varasematele töödele (Bisset *et al.*, 2004, Rovati *et al.*, 2014, Valiathan *et al.*, 2014).

Sarnaselt käesoleva tööga leidsid ka Rovati *et al.*, et lisaks CD4+ rakkudele, on ka CD4+ naiivsete rakkude arv naistel oluliselt suurem. Samas ilmes viimati nimetatud töös, et naistel on CD3+ T-lümfootsüütide hulk oluliselt suurem ka rakkude üldpopulatsioonis. Naiivsete rakkude osas Bisset *et al.* töös ei ilmnunud meeste ja naiste vahelist erinevust, ent nagu öeldud käsitleti selles töös naiivseid rakke kui CD4+ CD45RA+ CD62L+. Seega võib jällegi saadud tulemuste erinevus olla tingitud kasutatud markerite erinevusest. Ka CD4+ mälorakkude puhul leiti nimetatud töös oluline erinevus meeste ja naiste vahel, kuid jällegi käsitleti neid kui CD4+ CD45RO+ rakke. Käesolevas töös eristati nii efektor- kui ka tsentraalseid mälorakke ning oluline erinevus tuvastati vaid esimese alampopulatsiooni puhul.

Tabel 4. Meeste ja naiste vaheline erinevus T-raku alampopulatsioonides

	Mehed			Naised			p
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD	
CD3+	1242,9	1208,0	465,7	1345,2	1435,5	473,4	0,113
CD4+	603,0	651,3	295,6	829,0	897,2	327,3	0,004
CD4+ naiivsed	251,7	301,4	211,4	364,8	462,4	284,7	0,037
CD4+ T-EMRA	2,2	10,3	21,1	6,7	14,1	19,4	0,021
CD4+ T-EM	80,9	82,6	35,1	99,5	107,2	47,7	0,094
CD4+ EM TH1	27,7	34,6	26,0	39,2	50,4	31,0	0,041
CD4+ EM TH2	6,3	7,3	4,5	7,1	8,5	4,7	0,388
CD4+ EM TH17	9,1	9,9	4,3	10,7	11,9	6,0	0,325
CD4+ T-CM	263,9	260,6	95,1	301,9	317,9	91,6	0,054
CD4+ CM TH1	53,0	60,9	26,7	76,9	84,2	28,8	0,006
CD4+ CM TH2	43,9	44,3	17,3	52,9	60,2	27,0	0,055
CD4+ CM TH17	67,8	69,7	30,8	70,8	74,8	23,2	0,287
CD4+ DR+CD38-	28,5	31,6	19,7	30,9	36,8	21,3	0,377
CD4+ DR+CD38+	15,5	14,7	6,2	18,8	20,0	9,0	0,033
CD4+ DR-CD38-	285,2	292,4	94,3	334,0	352,2	108,8	0,081
CD4+ DR-CD38+	264,0	312,7	216,0	392,0	488,2	307,2	0,021
CD8+	457,8	461,6	204,3	444,2	445,9	166,4	0,887
CD8+ naiivsed	164,9	171,9	101,8	170,9	207,8	133,3	0,477
CD8+ T-EMRA	84,1	152,6	146,3	107,1	130,8	77,0	0,792
CD8+ T-EM	93,4	99,8	47,1	59,2	73,2	48,2	0,030
CD8+ T-CM	37,6	40,7	24,3	33,2	37,3	23,5	0,417
CD8+ DR+CD38-	43,5	50,9	36,0	28,1	42,8	34,5	0,465
CD8+DR+CD38+	17,2	21,8	15,0	20,6	24,9	14,6	0,320
CD8+ DR-CD38-	271,4	290,9	147,8	238,9	245,3	98,3	0,405
CD8+ DR-CD38+	74,0	98,0	74,2	110,5	132,8	95,2	0,123
CD4+CD8+ DP	6,1	8,9	7,1	9,5	13,3	12,5	0,047
CD4-CD8- DN	51,9	86,8	104,4	78,3	80,0	46,3	0,503

Kasutatud Mann-Whitney testi; paksus kirjas märgitud väärtus kui $p < 0,05$.

Tabelis 5 on esitatud T-rakkude alampopulatsioonide esinemine veres seoses inimese vanusega. Negatiivne seos vanusega ilmnis CD3+, CD4+, CD4+ naiivsete, CD4+ HLA-DR-CD38+, CD8+, CD8+ naiivsete, CD8+ HLA-DR- CD38+ ja CD4- CD8- topeltnegatiivsete rakkude puhul. Positiivne korrelatsioon aga CD4+ HLA-DR+ CD38- ja CD8+ CM rakkude puhul.

Negatiivset korrelatsiooni esinemist inimese vanuse ja CD3+, CD4+, CD4+ naiivsete (CD45RA+CD62L+) rakkude vahel kirjeldasid ka Jiao *et al.* (2009). Sarnased tulemused

meie tööga saadi ka Bisset *et al.* töös, kus võrreldi alla ja üle 50 aastaseid uuritavaid. Madalamad väärtused vanemas vanusegrupis ilmsid CD3+, CD4+, CD4+ naiivsete (CD45RA+CD62L+), CD8+, CD8+ naiivsete (CD45RA+ CD62L+), CD4+ CD38+, CD4+ HLA-DR+ CD38+ ja CD8+ CD38+ populatsioonides.

Nii meeste kui ka naiste hulgas esines negatiivne korrelatsioon CD4+ ja CD8+ naiivsete ja HLA-DR- CD38+ CD4+ rakkude puhul. Naistel esines negatiivne korrelatsioon lisaks veel CD3+, CD4+, CD8+, HLA-DR-CD38- CD8+, HLA-DR- CD38+ CD8+ ja CD4- CD8- DN ning võrdeline seos HLA-DR+CD38- CD4+ puhul. Meestel esines aga positiivne korrelatsioon CD8+ EM ja CM ning CD8+ HLA-DR+ CD38+ rakkude puhul.

Tabel 5. T-raku alampopulatsioonide esinemine veres seoses inimese vanusega

	Kõik		Mehed		Naised	
	r	p	r	p	R	p
CD3+	-0,369	0,008	-0,131	0,629	-0,449	0,007
CD4+	-0,356	0,010	-0,305	0,251	-0,332	0,051
CD4+ naiivsed	-0,516	0,000	-0,555	0,026	-0,508	0,002
CD4+ T-EMRA	0,192	0,177	0,038	0,888	0,296	0,085
CD4+ T-EM	0,091	0,527	-0,078	0,774	0,192	0,268
CD4+ EM TH1	0,209	0,140	0,080	0,770	0,303	0,077
CD4+ EM TH2	-0,047	0,746	-0,277	0,299	0,050	0,774
CD4+ EM TH17	-0,092	0,522	-0,116	0,668	-0,077	0,662
CD4+ T-CM	0,010	0,946	0,131	0,629	0,010	0,954
CD4+ CM TH1	-0,061	0,669	-0,157	0,560	0,045	0,799
CD4+ CM TH2	-0,040	0,783	-0,074	0,787	0,014	0,936
CD4+ CM TH17	0,049	0,735	0,113	0,676	0,051	0,771
CD4+ DR+CD38-	0,482	0,000	0,374	0,154	0,548	0,001
CD4+ DR+CD38+	0,179	0,209	0,434	0,093	0,144	0,408
CD4+ DR-CD38-	0,022	0,879	-0,149	0,583	0,116	0,507
CD4+ DR-CD38+	-0,526	0,000	-0,533	0,034	-0,526	0,001
CD8+	-0,340	0,015	0,096	0,725	-0,509	0,002
CD8+ naiivsed	-0,706	<0,000	-0,639	0,008	-0,727	<0,000
CD8+ T-EMRA	0,126	0,378	0,328	0,215	0,033	0,850
CD8+ T-EM	0,034	0,812	0,522	0,038	-0,151	0,387
CD8+ T-CM	0,325	0,020	0,637	0,008	0,172	0,323
CD8+ DR+CD38-	0,229	0,107	0,203	0,451	0,244	0,158
CD8+ DR+CD38+	0,110	0,444	0,509	0,044	-0,044	0,803
CD8+ DR-CD38-	-0,217	0,125	0,081	0,766	-0,342	0,045
CD8+ DR-CD38+	-0,552	<0,000	-0,060	0,824	-0,741	<0,000
CD4CD8 DP	0,077	0,594	0,462	0,072	-0,089	0,610
CD4CD8 DN	-0,458	0,001	-0,224	0,405	-0,548	0,001

Kasutatud Spearmani korrelatsiooni; paksus kirjas tähistatud väärtused kui $p < 0,05$

Treg rakud

Treg rakkude alampopulatsioonide uurimise tulemused on esitatud tabelis 6. Võrrelduna Hardy *et al.* (2013) tööga on CD4+ CD25+ CD127- Treg rakkude keskvärtus käesolevas töös suurem. Samas kasutati nimetatud töös rakkude arvu määramiseks ainult *TruCOUNT™* meetodit ja ka valim oli märksa väiksem (n=22). Ka Lin *et al.* (2011) uuringus saadud Treg rakkude keskvärtus on tervetel isikutel väiksem kui käesolevas töös.

Szczepanik *et al.* (2011) töös saadud Treg rakkude tulemused nii kontrollidel kui ka patsientidel on madalamad kui käesolevas ja kahes eelnimetatud töös. Ent erinevalt teistest töödest on selles uuringus Treg fenotüpiseeritud kui CD4+ CD25+ Foxp3+ ning varasemates töödes on Treg rakke iseloomustatud ainult CD4 ja CD25 ekspressiooni alusel (Ichiara *et al.*, 2003). Samas on CD25 kirjeldatud ka kui CD4+ rakkude aktivatsioonimarkerit (Bisset *et al.*, 2004). See näitab taaskord, kui oluline osa on markerite valikul, sest sellest sõltub milliseks kujunevad erinevates töödes saadud tulemused.

Tabel 6. T-regulatoorsete rakkude tulemused

	Mediaan	Keskmine	SD	Referentsvahemik
CD4+ T-rakud	795,3	847,0	337,9	372-1668
CD25+CD127-Treg	69,0	72,1	32,2	29 - 151
Mälu-Treg	30,4	33,5	12,4	7 – 59
HLA-DR+Treg	11,8	13,5	6,3	5 - 30

Meeste ja naiste tulemuste võrdluses Treg rakkude puhul olulisi erinevusi ei ilmnenud, kuid taaskord sai kinnitust CD4+ rakkude suurem arv naistel (tabel 7).

Tabel 7. Meeste ja naiste vaheline erinevus Treg rakkude alampopulatsioonides

	Mehed			Naised			p
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD	
CD4+ T-rakud	646,3	692,2	315,3	847,9	917,8	328,0	0,007
CD25+CD127-Treg	57,9	63,4	32,6	71,7	76,1	31,6	0,076
Mälu-Treg	25,0	30,5	13,4	34,9	34,9	11,8	0,180
HLA-DR+Treg	10,0	12,7	8,0	13,0	13,9	5,4	0,180

Kasutatud Mann-Whitney testi; paksus kirjas märgitud väärtus kui $p < 0,05$.

Ilmnes, et rakkude üldpopulatsioonis on CD4+ rakkude hulk seotud vanusega, nagu ka eelnevalt analüüsitud T-rakkude paneelis. Kui vaadelda meeste ja naiste tulemusi eraldi, siis ei ilmnenud olulist seost üheski populatsioonis (tabel 8). Orsini *et al.* (2012) leidsid oma töös, et Treg rakkude arv väheneb seoses vanusega. Ent kui uuriti eraldi alla 20 ja üle 20 aastaseid uuritavaid, selgus, et langus esineb ainult esimeses grupis ehk noorte hulgas ning edaspidi püsib Treg rakkude hulk üsna muutumatult kuni kõrge eani. Kuna käesolevas töös võeti arvesse ainult täiskasvanute tulemused, siis on üsna ootuspärane, et Treg rakkude puhul seost vanusega ei leitud. Samas leiti nimetatud töös positiivne korrelatsioon vanuse ja mälu Treg rakkudega, mida meie ei tuvastanud.

Tabel 8. Treg rakkude alampopulatsioonide seos vanusega

	Kõik		Mehed		Naised	
	r	p	r	p	r	p
CD4+ T-rakud	-0,354	0,011	-0,269	0,313	-0,331	0,052
CD25+CD127-Treg	-0,243	0,086	-0,249	0,353	-0,183	0,293
Mälu-Treg	0,057	0,689	0,056	0,837	0,107	0,542
HLA-DR+Treg	0,181	0,205	0,097	0,721	0,298	0,082

Kasutatud Spearmani korrelatsiooni; paksus kirjas tähistatud väärtused kui $p < 0,05$

B-rakud

B-rakkude alampopulatsioonide analüüsi tulemused on esitatud tabelis 9. Varasematest töödest leiab informatsiooni peamiselt B-rakkude üldarvu kohta, kus on nende identifitseerimiseks kasutatud CD19 markerit (Valiathan et al., 2014; Bisset et al., 2004; Al-Jabri et al., 2008). Duchamp et al. (2014) ja Morbach et al. (2010) on sarnaselt käesoleva tööga uurinud ka B-rakkude alampopulatsioone ning eristanud naiivseid ja mälurakke CD27 ja IgD ekspressiooni alusel. Morbach et al. (2010) on samuti uurinud CD24+ CD38+ transitsionaalseid B-rakke. Viimati nimetatud töös uuriti B-rakkude alampopulatsioone seitsme erineva vanusegrupi lõikes, alates varasest lapseast kuni 50nda eluaastani. Duchamp et al. töö keskendus aga B-rakkude referentsväärtuste hindamisele lastel.

Caraux et al. (2010) uurisid sarnaselt käesoleva tööga B-rakkude alampopulatsioone täiskasvanute hulgas. Sellest olenemata, et naiivsete rakkude tuvastamiseks kasutati selles töös kombinatsiooni CD10-CD27-CD38-, on saadud tulemus sarnane käesolevas töös saadud andmetega. Mälurakke identifitseeriti kui CD10-CD27+CD38- ning mälurakkude alampopulatsioone ei eristatud. Saadud tulemus on aga kooskõlas käesolevas töös eristatud *switched* ja *pre-switch* mälurakkude keskmiste summaga.

Tabel 9. B-raku alampopulatsioonide tulemused

	Mediaan	Keskmine	SD	Referentsvahemik
CD19+ B-rakud	193,6	206,6	83,2	43 – 369
CD20- B-rakud	2,0	2,9	3,0	1 – 9
Switched mälurakud	32,9	36,5	16,5	14 – 78
Plasmablastid	1,3	1,9	1,7	0 – 7
Pre switch mälurakud	31,3	33,4	19,6	0 – 70
CD27- IgD-	5,6	6,1	3,6	2 – 17
Naiivsed B-rakud	128,2	131,7	72,5	33 – 377
Üleminekurakud	14,0	17,1	12,3	3 – 63

Meeste ja naiste vahelisi erinevusi kajastab tabel 10. B-rakkude üldpopulatsiooni ehk CD19+ rakkude puhul sooga seotud erinevusi ei täheldatud, mis on kooskõlas varasemate töödega

(Bisset *et al.*, 2004, Rovati *et al.*, 2014, Valiathan *et al.*, 2014, Rudolf-Oliveira *et al.*, 2015). Ka ei esinenud olulisi erinevusi üheski alampopulatsioonis. Varasemalt on leitud, et naistel on CD20- B-rakkude arv oluliselt kõrgem kui meestel (Rudolf-Oliveira *et al.* 2015).

Tabel 10. Meeste ja naiste vaheline erinevus B-rakkude alampopulatsioonides

	Mehed			Naised			p
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD	
CD19+ B-rakud	169,3	190,4	95,6	217,1	213,7	77,7	0,208
CD20- B-rakud	1,9	2,0	0,9	2,1	3,4	3,4	0,246
Switched mälorakud	30,0	34,9	22,9	34,6	37,2	13,1	0,172
Plasmablastid	1,6	1,7	1,1	1,2	1,9	1,9	0,795
Pre switch mälorakud	31,4	31,9	11,6	29,2	34,0	22,4	0,588
CD27- IgD- mälorakud	4,4	5,1	3,8	6,1	6,6	3,4	0,062
Naiivsed B-rakud	107,6	120,0	82,3	134,4	136,9	68,4	0,224
Üleminekurakud	12,4	17,3	16,2	14,5	17,0	10,4	0,435

Kasutatud Mann-Whitney testi; paksus kirjas tähistatud väärtused kui $p < 0,05$

Tabelis 11 on toodud B-rakkude hulga ning vanuse korrelatsioon üldpopulatsioonis, aga ka meeste ja naiste hulgas eraldi. Statistiliselt oluline negatiivne korrelatsioon ilmnes ainult CD20- B-rakkude ja plasmablastide puhul. Varasemates töodes on CD19+ rakkude puhul leitud oluline negatiivne korrelatsioon vanusega (Jentsch-Ullrich *et al.*, 2005, Jiao *et al.*, 2009). Ka Caraux *et al.* (2010) töös ilmnes küll langus, kuid mitte statistiliselt oluline. Samas aga Bisset *et al.* (2004) töös, kus võrreldi CD19+ rakkude väärtusi üle ja alla 50 aastastel uuritavatel, ei olnud gruppide vahel olulist erinevust. Caraux *et al.* (2010) töös leiti plasmarakkude puhul negatiivne korrelatsioon vanusega. Kuna käesolevas töös ei uuritud plasmarakke vaid plasmablaste, pole nende tööde tulemused otseselt võrreldavad. Samas on aga tulemused kooskõlas, sest plasmablastid on plasmarakkude eellasteks.

Sarnaselt üldpopulatsiooniga ilmnes naistel plasmablastide populatsioonis vastupidine korrelatsioon vanusega. Varasemalt on leitud, et CD27- IgD- topeltnegatiivsete rakkude osakaal tõuseb seoses vananemisega. Näiteks Colonna-Romano *et al.* (2009) töös leiti, et eakamatel on oluliselt rohkem IgD- CD27 rakke. Meeste puhul meie töös ei leitud ühtki vanusega seost.

Tabel 11. B-rakkude alampopulatsioonide seos vanusega

	Kõik		Mehed		Naised	
	r	p	r	p	r	p
CD19+ B-rakud	-0,048	0,743	-0,043	0,880	-0,068	0,704
CD20- B-rakud	-0,298	0,038	-0,239	0,390	-0,310	0,075
Switch mälorakud	0,000	0,999	0,096	0,733	-0,028	0,875
Plasmablastid	-0,439	0,002	-0,172	0,541	-0,533	0,001
Pre switch mälorakud	-0,125	0,391	-0,311	0,260	-0,079	0,658
CD27- IgD- mälorakud	-0,076	0,604	0,218	0,435	-0,219	0,214
Naiivsed B-rakud	-0,065	0,659	-0,064	0,820	-0,084	0,636
Üleminekurakud	-0,143	0,328	0,064	0,820	-0,279	0,110

Kasutatud Spearmani korrelatsiooni; paksus kirjas tähistatud väärtused kui $p < 0,05$

Dendriittrakud, NK-rakud ja monotsüüdid

Tabelis 12 on esitatud dendriittrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide tulemused üldpopulatsioonis. Rovati *et al.* (2009) ja Orsini *et al.* (2012) töödes saadud DC väärtus on madalam kui käesolevas töös saadud tulemus. Samas kasutati viimasena nimetatud töös DC tuvastamiseks ka erinevat markerite kombinatsiooni, milleks oli CD14^{lo} CD16^{lo} CD85^{k+}. Ka mDC väärtus on käesolevas töös märgatavalt suurem, kuid pDC väärtused on üsnagi sarnased Orsini *et al.* tööle. pDC tuvastamiseks on mõlemad eelnimetatud töögrupid kasutanud CD123, kuid mDC puhul kasutati Orsini *et al.* töös markerit CD33.

Szabolcs *et al.* (2003) ja Autissier *et al.* (2010) kasutasid samu markereid, mida kasutati käesolevas töös. Esimesed said pDC osas sarnase, kuid mDC osas jällegi madalama tulemuse. Autissier *et al.*, said mDC osas käesoleva tööga ligilähedase ning pDC mõnevõrra kõrgema väärtuse. Nende töö valim oli aga väga väike ($n=9$), kuna peamine eesmärk oli välja töötada immunofenotüpiseerimiseks sobivad paneelid, mitte referentsväärtuste leidmine. Seega siinkohal tundub, et erinevus on pigem seotud uuritavate populatsioonide kui markerite valikuga.

Nagu tulemustest nähtub, ekspresseerib enamik mDC rakke Slan-i, samas aga on Slan+ mDC rakud inimese perifeerses veres üsna vähe esindatud populatsioon. Nahas on need rakud aga oluliselt rohkem levinud ning nende tõsnud väärtusi on täheldatud autoimmuunhaiguste korral, näiteks psoriaasi (Hänsel *et al.*, 2011, Günther *et al.*, 2012) ja süsteemse erütematoosse luupuse puhul (Hänsel *et al.*, 2013).

Autissier *et al.* (2010) töös esitatud monotsüütide alampopulatsioonide CD14+ CD16- ja CD14+ CD16+ absoluutväärtused on märgatavalt suuremad kui käesolevas töös. Aga nagu juba öeldud, siis nimetatud töö valim oli väike ning selle fookus ei olnud referentsväärtuste leidmine.

Tabel 12. Dendriitrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide tulemused

	Mediaan	Keskmine	SD	Referentsvahemik
CD3- CD19- CD20-	574,8	629	221,6	305 - 1157
Monotsüüdid	298,1	302,9	96,9	113 - 493
CD14+ CD16- mono	280,6	280,6	88,2	108 - 454
CD14+ CD16+	19,4	22,3	13,6	6 - 60
NK-rakud	198,9	237,4	143,8	65 - 626
CD56di CD16+ NK	180,6	218	142,7	52 - 619
CD56di CD16- NK	7	8,3	4,1	0 - 15
CD56br CD16- NK	7,6	7,9	3,5	1 - 15
CD56br Cd16+ NK	2,9	3,2	2,3	1 - 11
CD56br CD8a- NK	7,1	7,1	3,2	3 - 16
CD56br CD8a+ NK	4,2	4,8	2,5	1 - 13
CD56di CD8a- NK	99,7	120,6	93,2	25 - 365
CD56di CD8a+ NK	92,3	105	67,6	22 - 326
Lin-	84,1	86,5	31,5	43 - 155
Dendriitrakud	41,1	45,9	20,5	19 - 96
pDC	8	9,2	4,9	3 - 22
mDC	29,1	33,9	18,1	11 - 83
Slan+ CD16+ mDC	16,5	20,1	13,9	0 - 45
Slan- CD16- mDC	8,1	8,3	3,4	3 - 17
Slan- CD16+ mDC	3,2	5,2	5,6	0 - 15
Slan+ CD16- mDC	0,1	0,2	0,2	0 - 1

Tabelis 13 on esitatud naiste ja meeste vahelised erinevused DC, NK-rakkude ja monotsüütide alampopulatsioonides. Naiste ja meeste tulemuste mediaanide võrdlusel ilmnes NK-rakkude alampopulatsioonides oluline erinevus vaid CD56^{hi} CD8a⁺ rakkude osas, kuid ülejäänud populatsioonides olid naiste ja meeste tulemused üsna sarnased. See on kooskõlas mitme eelneva tööga, kus NK-rakkude üldpopulatsioonis naiste ja meeste puhul erinevusi ei leitud (Bisset *et al.*, 2004, Valiathan *et al.*, 2014). Vastukaaluks on aga mitmes teises varasemas töös meestel leitud oluliselt suurem absoluutväärtus NK-rakkude üldpopulatsioonis (Chng *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2013, Rudolf-Oliveira *et al.*, 2015) kui ka küpsete ehk CD56⁺CD16⁺ (käesolevas töös tähistatud CD56^{br} CD16⁺) alampopulatsioonis (Rudolf-Oliveira *et al.*, 2015).

Ka DC ja selle alampopulatsioonide puhul soost sõltuvaid erinevusi ei ilmnenud. Erinevalt käesolevast tööst on varasemalt aga näiteks DC ja mDC puhul täheldatud naistel madalamaid väärtusi kui meestel, kuid seda ainult alla 50 aastaste uuritavate puhul. Üle 50 aastaste meeste ja naiste vahel erinevust ei olnud (Orsini *et al.*, 2012).

Monotsüütide puhul ei esinenud samuti meeste ja naiste vahel erinevusi ei üldpopulatsioonis ega ka alampopulatsioonides. Heimbeck *et al.* (2010) töös leiti naistel oluliselt madalamad väärtused monotsüütide üldpopulatsioonis ning ka mitte-klassikaliste CD14⁺ CD16⁺⁺ monotsüütide puhul.

Tabel 13. Meeste ja naiste vaheline erinevus dendriitrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide alampopulatsioonides

	Mehed			Naised			p
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD	
CD3- CD19- CD20-	613,9	706,0	278,0	574,8	593,8	184,5	0,208
Monotsüüdid	311,0	320,5	107,8	296,0	294,9	92,1	0,685
CD14+ CD16- mono	290,0	296,4	94,1	270,2	273,5	85,8	0,700
CD14+ CD16+ mono	19,5	24,2	17,0	18,6	21,5	11,8	0,730
NK-rakud	269,8	296,6	200,9	188,3	210,4	101,1	0,208
CD56di CD16+ NK	249,1	277,8	200,4	165,4	190,7	98,8	0,201
CD56di CD16- NK	7,4	9,0	4,6	7,0	8,0	3,8	0,556
CD56br CD16- NK	6,9	6,9	3,1	7,9	8,4	3,6	0,223
CD56br CD16+ NK	2,3	2,9	2,0	2,9	3,3	2,5	0,536
CD56br CD8a- NK	6,0	7,1	3,6	7,1	7,1	3,1	0,800
CD56br CD8a+ NK	4,3	4,5	2,2	4,1	4,9	2,7	0,919
CD56di CD8a- NK	104,1	151,7	139,4	99,7	106,3	59,4	0,655
CD56di CD8a+ NK	132,5	133,3	68,6	78,2	92,1	64,0	0,026
Lin-	86,6	86,4	28,4	80,6	86,6	33,2	0,839
Dendriittrakud	41,5	47,8	22,9	39,8	45,1	19,6	0,700
pDC	7,9	9,5	6,3	8,0	9,1	4,1	0,792
mDC	32,5	35,6	19,0	27,4	33,1	17,8	0,685
Slan+ CD16+ mDC	17,8	21,5	15,9	16,3	19,5	13,0	0,839
Slan- CD16- mDC	8,1	8,2	3,2	8,1	8,3	3,6	0,984
Slan- CD16+ mDC	3,5	5,6	5,4	3,0	5,1	5,8	0,670
Slan+ CD16- mDC	0,1	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,158

Kasutatud Mann-Whitney testi; paksus kirjas märgitud väärtus kui $p < 0,05$.

Tabelis 14 on esitatud DC, NK-rakkude ja monotsüütide alampopulatsioonide seos vanusega. NK-rakkude puhul leiti, et CD56br CD16-, CD56br CD16+ ja CD56br CD8a- NK-rakkude puhul esineb vanusega seotud negatiivne korrelatsioon. NK-rakkude üldpopulatsiooni kui ka mitmete alampopulatsioonide puhul korrelatsiooni vanusega ei ilmnenud. Jentsch-Ullrich *et al.* (2005), Jiao *et al.* (2009) ja Choi *et al.* (2014) töödes, kus uuriti vaid CD56+ CD16+ ja/või CD56+ NK-rakkude üldpopulatsiooni, leiti et nende rakkude hulk on positiivses korrelatsioonis vanusega. Vanuse ja CD56br CD8a- NK-rakkude vaheline negatiivne korrelatsioon ilmnes mõlemas grupis ka meeste ja naiste puhul eraldi vaadatuna, naistel lisaks ka CD56br CD16+ NK-rakkude puhul.

Kogu täiskasvanute valimi lõikes leiti DC alampopulatsioonide puhul negatiivne korrelatsioon vanusega pDC rakkude ja positiivne seos Slan- CD16+ mDC rakkude osas. Orsini *et al.* (2012) töös ilmnis rakkude arvu ja vanuse vaheline negatiivne korrelatsioon nii DC üldpopulatsioonis, kui ka mDC ja pDC alampopulatsioonides. Nimetatud töö puhul kaasati analüüsi ka laste tulemused ning kui võrreldi alla ja üle 20 aastaseid uuritavaid eraldi, jäi seos püsima ainult pDC puhul. Ka teistes töödes, mille valim hõlmas vaid täiskasvanuid, ilmnis oluline langus ainult pDC puhul (Pérez-Cabezas *et al.*, 2007, Jing *et al.*, 2009). Seda tendentsi on seostatud sellega, et pDC rakud asuvad lümfoïdkoes, sealhulgas tütümuses, ning nende kudede vanuselise taandarenguga (Jing *et al.*, 2009).

Jing *et al.* töös uuriti lisaks tervetele noortele ja vanemaealistele ka erinevate haigustega vanemaealisi inimesi. Vastupidiselt tervetele, kelle puhul mDC väärtustes erinevusi polnud vanusegruppide vahel, leiti, et võrreldes tervete noortega on haigete vanemaealiste mDC väärtus oluliselt madalam. See võib aga viidata mDC ja vanemaealiste tervisestaatuse vahelist seosele.

Käesolevas töös saadud meeste ja naiste tulemusi eraldi vaadatuna, ilmneb erinev korrelatsioon pDC ja mDC alampopulatsioonides seoses vananemisega (tabel 14). Meeste puhul ei esine seost kummaski alampopulatsioonis. Naistel esineb pDC langus seoses vanusega, kuid lisaks sellele nähtub mDC puhul hoopis vastupidine seos - nende rakkude arv on vanusega positiivses korrelatsioonis. Nagu ka üldpopulatsioonis, esineb nii meeste kui ka naistel puhul positiivne seos vanuse ja Slan- CD16+ mDC rakkude ja naistel lisaks ka Slan+ CD16+ mDC rakkude puhul.

Monotsüütide puhul on kirjeldatud rakkude arvu tõusu seoses vanusega mitte-klassikaliste CD14+ CD16+ rakkude alampopulatsioonis (Seidler *et al.*, 2010). Käesolevas töös monotsüütide üldpopulatsioonis ega ka kummaski alampopulatsioonis üheski grupis seost vanusega ei leitud.

Tabel 14. Dendriitrakkude, NK-rakkude ja monotsüütide alampopulatsioonide esinemine seoses vanusega

	Kõik		Mehed		Naised	
	r	p	r	p	r	p
CD3- CD19-CD20-	-0,090	0,513	-0,396	0,129	0,071	0,685
Monotsüüdid	-0,165	0,227	-0,149	0,583	-0,166	0,339
CD14+ CD16- mono	-0,184	0,179	-0,199	0,461	-0,201	0,247
CD14+ CD16+ mono	0,017	0,905	-0,057	0,833	0,166	0,341
NK-rakud	0,014	0,921	-0,387	0,139	0,197	0,257
CD56di CD16+ NK	0,027	0,845	-0,365	0,165	0,206	0,235
CD56di CD16- NK	-0,220	0,106	-0,252	0,347	-0,315	0,066
CD56br CD16- NK	-0,304	0,024	-0,334	0,206	-0,234	0,176
CD56br CD16+ NK	-0,295	0,029	-0,145	0,592	-0,341	0,045
CD56br CD8a- NK	-0,407	0,002	-0,635	0,008	-0,333	0,050
CD56br CD8a+ NK	-0,257	0,058	-0,215	0,424	-0,219	0,205
CD56di CD8a- NK	-0,063	0,649	-0,316	0,233	0,147	0,399
CD56di CD8a+ NK	0,078	0,570	-0,442	0,087	0,210	0,226
Lin-	0,030	0,830	-0,004	0,987	0,170	0,328
Dendriitrakud	0,024	0,865	-0,029	0,914	0,111	0,527
pDC	-0,306	0,023	-0,362	0,168	-0,342	0,044
mDC	0,162	0,237	0,019	0,944	0,347	0,041
Slan+ CD16+ mDC	0,109	0,430	-0,015	0,957	0,354	0,037
Slan- CD16- mDC	-0,151	0,270	-0,239	0,373	-0,157	0,368
Slan- CD16+ mDC	0,506	0,000	0,543	0,030	0,507	0,002
Slan+ CD16- mDC	-0,031	0,821	0,103	0,704	-0,022	0,900

Kasutatud Spearmani korrelatsiooni; paksus kirjas tähistatud väärtused kui $p < 0,05$

Lisaks tervetele inimestele kaasati käesolevasse töösse ka seitse T1D patsienti. Mitmetes varasemates töödes on leitud, et T1D patsientidel on immuunrakkude hulk võrreldes tervete inimestega oluliselt muutunud (Allen *et al.*, 2008, Matteucci *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2014). Kuna aga käesolevas töös oli nii T1D patsientide kui ka tervete laste arv valimis väga väike, siis ei peetud nende gruppide võrdlemist otstarbekaks. Lisas 2. on esitatud neid kahte gruppi käsitlevate andmete mediaan-, keskväärtused ja standard hälve (Lisa 2: tabelid 15-18). Seega tervete isikute ja T1D patsientide vahelised erinevused vajavad edasist uurimist.

Käesoleva töö tulemuste võrdlemisel varasemate töödega ilmnes nii sarnasusi kui ka erinevusi, mis viitab uuritavate populatsioonide vahelisele varieeruvusele, kuid võib olla tingitud ka immunofenotüüpiseerimiseks kasutatud markerite valikust ja/või meetodika erinevustest. Kuigi mitmete selles töös esitatud immuunrakkude alampopulatsioonide referentsvahemike kohta puuduvad andmed, me siiski leiame, et meie töös esitatud väärtused on piisava usaldusväärsusega. Seda kinnitab asjaolu, et käesolevas töös saadud põhiliste immuunrakkude populatsioonide absoluutarvude kesk- ja/või mediaanväärtused on üldjoontes kooskõlas varasemate tööde tulemustega. Lisaks referentsväärtuste leidmisele on käesolev töö oluline ka sellest aspektist, et meie uuring hõlmas suure enamiku immuunrakkudest.

Immunofenotüüpiseerimise tulemused sõltuvad suurel määral uuritava materjali ning markerite valikust. Uuritavaks materjaliks võib olla nii täisveri, nagu kasutati käesolevas töös, kui ka eelnevalt isoleeritud ja külmutatud PBMC-d. Varasemad analüüsid on näidanud, et saadud näidud varieeruvad sõltuvalt sellest, kas analüüsimine on teostatud värske täisvere või külmutatud rakkudega. Erinevused võivad esineda nii rakkude arvus kui ka pinnamarkerite ekspressioonis, nagu ilmnes dendriitrakkudega tehtud uuringus. Leiti, et müeloidsete ja plasmatsütoidsete dendriitrakkude arv on oluliselt suurem värske vereproovi puhul ning erinev on ka CCR7 valgu tase (Chowdhury *et al.*, 2010). Samuti võib raku alampopulatsioonide jaotumist mõjutada see kui rakke eraldatakse Ficoll gradiendiga (Appay *et al.*, 2006). Kliinilistes uuringutes on seega soovitatav kasutada täisverd.

Lisaks eelmainitule võib rakkude absoluutarvude väärtust mõjutada kahese (ingl *dual*) või ühese (ingl *single*) platvormi kasutamine absoluutväärtuste arvutamisel. Esimesel juhul arvutatakse tulemus kasutades lümfotsüütide (või leukotsüütide) väärtusi, mis on saadud vere hematoloogilisel analüüsimisel, mis tähendab, et kasutatakse kahte erinevat analüsaatorit. Teisel juhul aga arvutatakse absoluutväärtused, kasutades ainult kindlaks määratud kerakeste arvuga proove (nagu käesolevas töös kasutatud TruCount katsutid) ja ainult ühte analüsaatorit. On leitud, et TruCount katsuteid kasutades on tulemuste varieeruvus

laborisiseselt kui ka erinevate laborite vahel oluliselt väiksem (Schnizlein-Bick *et al.*, 2000). Samuti on eelistatud ühese platvormi kasutamine, kui uuritava materjali kogus on limiteeritud, sest ei ole vaja võtta proove kahe eraldi analüüsi jaoks. Meie võrdlesime oma töös saadud näitused nii töödega, kus sarnaselt käesoleva tööga kasutati rakkude absoluutarvu leidmiseks ühest platvormi (Bisset *et al.*, 2004, Chng *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2013) kui ka nendega, kus kasutati kahest platvormi (Valiathan *et al.*, 2014, Rudolf-Oliveira *et al.*, 2015).

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kuigi leidsime immuunrakkudele ning nende alampopulatsioonidele referentsvahemikud täiskasvanute hulgas, tuleks siiski uurida suuremat hulka inimesi. Seda seetõttu, et meie tulemused näitavad meeste ja naiste vahelist erinevust mitmete rakupopulatsioonide osas ning muutusi rakupopulatsioonides seose vanusega.

Kui T-rakkude puhul ilmnes meeste ja naiste vaheline statistiliselt oluline erinevus mitmetes alampopulatsioonis, siis B-rakkude, DC ja Treg ning nende alampopulatsioonide väärtused olid mõlema soo osas sarnased. NK-rakkude puhul esines oluline erinevus samuti ainult CD56⁺CD8a⁺ alampopulatsiooni puhul.

Oluline seos vanusega ilmnes aga nii T-, B-, NK-rakkude kui ka DC puhul ning oli enamasti negatiivne. Mõnedes populatsioonides esines aga ka rakkude arvu tõus seoses vanusega: CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁻, CD8⁺TCM ja Slan⁻CD16⁺mDC. Meeste ja naiste osas eraldi vaadatuna olid muutused rakupopulatsioonides seoses vanusega üsna erinevad. Naistel esines vanusega seotud muutusi palju rohkemates alampopulatsioonides kui meestel. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et naised moodustasid käesoleva uuringu valimist suurema osa ehk ligikaudu kaks kolmandikku ning meeste arv ei olnud piisav nende seoste ilmnemiseks. Samas võib see olla tingitud ka suurematest bioloogilistest muutustest naistel seoses vanenemisega, näiteks menopausiga kaasnevatest hormonaalsetest muutustest (Giglio *et al.*, 1994).

Järeldused

Lähtuvalt töö tulemustest võib teha järgmised järeldused:

- Kuna käesoleva töö tulemused on sarnased varasemate tööde tulemustega, kinnitab see HIP-C protokoll versiooni 3.3 sobivust immuunrakkude fenotüüpiseerimiseks. Kasutades HIP-C protokoll versiooni 3.3 on võimalik lisaks T-, B-, NK-, dendriitrakkude ja monotsüütide üldpopulatsioonidele määrata ka nende rakkude vähemesindatud alampopulatsioone, mida varasemalt on uuritud üsna vähe;
- Töö tulemuste põhjal arvutasime referentsvahemikud eelnimetatud immuunrakkudele ning nende alampopulatsioonidele täiskasvanute hulgas, kuid leiame, et lõplike referentsvahemike leidmiseks tuleks uurida suuremat gruppi terveid inimesi. Laste arv valimis oli liiga väike leidmaks referentsvahemikke;
- Meie tulemused näitavad meeste ja naiste vahelist erinevust mitmetes rakupopulatsioonides, samuti ilmneb seos mitmete rakupopulatsioonide hulga ning vanuse vahel. Mitmete populatsioonide puhul esines meestel ja naistel sarnane vanuseline seos, aga oli ka populatsioone, kus seos vanusega esines ainult ühe soo puhul. Lähtuvalt sellest arvame, et on oluline leida eraldi referentsväärtused meestele ja naistele ning erinevatele vanusegruppidele;
- Meie poolt uuritud T1D patsientide ja tervete laste valimid ei olnud piisavalt suured, et nende põhjal teha olulisi järeldusi ning see vajaks edasisi uuringuid suuremate gruppidega.

KOKKUVÕTE

Immuunsüsteem on olulise tähtsusega organismi kaitsmisel patogeenide vastu ning normaalse tervises seisundi säilitamisel. Immuunsüsteemi tasakaal ning kõrvalekalded peegelduvad immuunrakkude arvu ja funktsioonis. Üheks peamiseks immunofenotüüpiseerimise meetodiks on läbivoolu tsütofluorimeetria, mis võimaldab samaaegselt iseloomustada paljusid rakkude alampopulatsioone. Tervete inimeste uurimisel saadud mistahes biomarkerite, sealhulgas immuunrakkude, referentsvahemikud on olulised erinevate haiguste diagnostikas ja jälgimiseks.

Käesolevas töös analüüsiti tervete inimeste ning 1. tüüpi diabeeti (T1D) põdevate laste perifeerse vere T-, B-, NK-, dendriitrakkude ja monotsüütide alampopulatsioone. Uuringus osales 55 tervet isikut, kellest neli olid lapsed, ning lisaks uuriti seitset T1D põdevat last. Töö eesmärk oli hinnata HIP-C protokolliga versiooni 3.3 sobivust immunofenotüüpiseerimiseks ning saadud tulemuste põhjal arvutada referentsvahemikud eelnimetatud immuunrakkude alampopulatsioonidele.

Saadud tulemuste põhjal arvutati välja erinevaid rakupopulatsioone iseloomustavad referentsväärtused. Kuna laste arv valimis oli väga väike, siis leiti referentsvahemikud ainult tervete täiskasvanute puhul. Lisaks võrreldi rakupopulatsioonide väärtuste erinevusi meeste ja naiste vahel. Meie töö tulemusena selgus, et meeste ja naiste osas on mitmete rakupopulatsioonide näitajad erinevad. Ühtlasi uuriti rakupopulatsioonide näitajate muutusi seoses vanusega kõigi täiskasvanute, aga ka meeste ja naistel hulgas eraldi. Tulemused näitasid, et paljude rakupopulatsioonide esinemise sagedus on seotud vanusega, kusjuures ilmnes, et mitmel juhul oli meeste ja naiste rakupopulatsioonide vanuseline seos erinev.

Nii meeste- ja naistevahelised kui ka vanusega seotud erinevused viitavad sellele, et otstarbekas on leida erinevatele vanusegruppidele ning meestele ja naistele iseseisvad referentsväärtused. Kuna T1D patsientide ja tervete laste valimid olid väga väikesed, siis nende tulemuste põhjal olulisi järeldusi teha ei saa.

Meie uuringu tulemused kinnitavad, et kasutatud meetodika on sobiv immunofenotüüpiseerimiseks, kuid tööd on vaja jätkata suuremate gruppidega nii tervete kui ka haigete osas.

Flow cytometric immunophenotyping of human periferal blood immune cells according to the HIP-C protocol version 3.3

Astrid Oras

SUMMARY

Flow cytometric immunophenotyping of immune cells is an important method in the evaluation and diagnosis of a variety of clinical conditions, including immunodeficiency and autoimmunity. Essential to the effective application of this approach is accurate reference values from healthy controls against which results can be meaningfully compared.

The aim of this study was to analyze the variation of T-, B-, NK-, dendritic cell and monocyte subsets in peripheral blood among healthy volunteers with the task to establish reference range of the values of immune cells. In addition, to compare the values of healthy children and patients with type 1 diabetes (T1D). Flow cytometric analysis of whole blood from 55 healthy donors (16 males, 39 females, 11 - 71 years old, mean age 32.1 years) and 7 children with T1D was performed.

Our results for the main immune cell populations are in keeping with previous studies, which confirms the suitability of HIP-C protocol version 3.3 for immunophenotyping. We managed to obtain reference ranges for the subsets of T-, B-, NK-cells, dendritic cells and monocytes in healthy adults.

Comparison of male and female showed gender-dependent differences in many populations. Also, in many subsets the inverse or converse correlation with age was identified. Futhermore, in some subsets different age-associated correlations were observed between male and female.

Taking account of above-mentioned findings we suggest that it is essential to establish age- and gender-specific reference ranges for immune cell subsets. For that purpose, a greater number of healthy subjects should be studied in the future. As the number of healthy children and T1D patients was not sufficient, further analysis is needed to assess the potential differences between these groups.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma juhendajat professor Raivo Uibot nõuannete ja toetuse töö valmimisel. Täna ka dr. Thomas Gieset ning tema töögruppi Heidelbergi Ülikoolist võimaluse eest õppida töös kasutatud meetodikat. Samuti olen väga tänulik kaasjuhendajale dotsent Sulev Ingerpuule põhjalike kommentaaride eest. Suur tänu ka kogu bio- ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonna töötajatele toetava ja meeldiva töökeskkonna eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access*. Elsevier Health Sciences.

Al-Jabri, A. A., Al-Shukaili, A. K., Al-Rashdi, Z. T., & Ganguly, S. S. (2008). Reference ranges for lymphocyte subsets in healthy adult male Omanis. *Saudi medical journal*, 29(3), 409-412.

Al Qouzi, A., Al Salamah, A., Al Rasheed, R., Al Musalam, A., Al Khairy, K., Kheir, O., ... & Hajeer, A. H. (2002). Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Saudi men. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(2), 279-281.

Allen, J. S., Pang, K., Skowera, A., Ellis, R., Rackham, C., Lozanoska-Ochser, B., ... & Peakman, M. (2009). Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture. *Diabetes*, 58(1), 138-145.

Appay, V., Reynard, S., Voelter, V., Romero, P., Speiser, D. E., & Leyvraz, S. (2006). Immuno-monitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples. *Journal of immunological methods*, 309(1), 192-199.

Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H., & Williams, K. C. (2010). Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry part A*, 77(5), 410-419.

Baatar, D., Olkhanud, P., Sumitomo, K., Taub, D., Gress, R., & Biragyn, A. (2007). Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4- Tregs, regulate effector T cells using FasL. *The Journal of Immunology*, 178(8), 4891-4900.

Banham, A. H. (2006). Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3+ regulatory T cells. *Trends in immunology*, 27(12), 541-544.

Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M., & Chattopadhyay, P. K. (2012). A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in immunology*, 33(7), 323-332.

Béziat, V., Duffy, D., Quoc, S. N., Le Garff-Tavernier, M., Decocq, J., Combadière, B., ... & Vieillard, V. (2011). CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *The Journal of Immunology*, *186*(12), 6753-6761.

Bisset, L. R., Lung, T. L., Kaelin, M., Ludwig, E., & Dubs, R. W. (2004). Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *European journal of haematology*, *72*(3), 203-212.

Caraux, A., Klein, B., Paiva, B., Bret, C., Schmitz, A., Fuhler, G. M., ... & Perez-Andres, M. (2010). Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasma cells. *haematologica*, *95*(6), 1016-1020.

Chattopadhyay, P. K., & Roederer, M. (2012). Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*, *57*(3), 251-258.

Chng, W. J., Tan, G. B., & Kuperan, P. (2004). Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, *11*(1), 168-173.

Choi, J., Lee, S. J., Lee, Y. A., Maeng, H. G., Lee, J. K., & Kang, Y. W. (2014). Reference Values for Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in a Healthy Korean Population. *Immune network*, *14*(6), 289-295.

Chowdhury, F., Johnson, P., & Williams, A. P. (2010). Enumeration and phenotypic assessment of human plasmacytoid and myeloid dendritic cells in whole blood. *Cytometry Part A*, *77*(4), 328-337.

Collin, M., McGovern, N., & Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, *140*(1), 22-30.

Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Pellicanò, M., Vitello, S., Lio, D., ... & Caruso, C. (2009). A double-negative (IgD⁻ CD27⁻) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mechanisms of ageing and development*, *130*(10), 681-690.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology*, *22*(11), 633-640.

- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*, 85(1), 36-42.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., & Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺ CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of experimental medicine*, 193(11), 1303-1310.
- Duchamp, M., Sterlin, D., Diabate, A., Uring-Lambert, B., Khourouj, G. E., Le Mauff, B., ... & Picard, C. (2014). B-cell subpopulations in children: National reference values. *Immunity, inflammation and disease*, 2(3), 131-140.
- Durand, M., & Segura, E. (2015). The known unknowns of the human dendritic cell network. *Frontiers in immunology*, 6.
- Freud, A. G., & Caligiuri, M. A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunological reviews*, 214(1), 56-72.
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), 723.
- Giglio, T., Imro, M. A., Filaci, G., Scudeletti, M., Puppo, F., De Cecco, L., ... & Costantini, S. (1994). Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life sciences*, 54(18), 1305-1312.
- Günther, C., Starke, J., Zimmermann, N., & Schäkel, K. (2012). Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation. *Clinical and experimental dermatology*, 37(2), 169-176.
- Hardy, M. Y., Vari, F., Rossetti, T., Hart, D. N., & Prue, R. L. (2013). A flow cytometry based assay for the enumeration of regulatory T cells in whole blood. *Journal of immunological methods*, 390(1), 121-126.
- Hegazy, A. N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Fröhlich, A., Bergthaler, A., ... & Löhning, M. (2010). Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3⁺T-bet⁺ Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions. *Immunity*, 32(1), 116-128.
- Heimbeck, I., Hofer, T. P., Eder, C., Wright, A. K., Frankenberger, M., Marei, A., ... & Ziegler-Heitbrock, L. (2010). Standardized single-platform assay for human monocyte

subpopulations: Lower CD14⁺ CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry Part A*, 77(9), 823-830.

Hänzel, A., Günther, C., Ingwersen, J., Starke, J., Schmitz, M., Bachmann, M., ... & Schäkel, K. (2011). Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong T_H17/T_H1 T-cell responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 787-794.

Hänzel, A., Günther, C., Baran, W., Bidier, M., Lorenz, H. M., Schmitz, M., ... & Schäkel, K. (2013). Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 40, 1-8.

Ichihara, F., Kono, K., Takahashi, A., Kawaida, H., Sugai, H., & Fujii, H. (2003). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clinical Cancer Research*, 9(12), 4404-4408.

Jackson, S. M., Wilson, P. C., James, J. A., & Capra, J. D. (2008). Human B cell subsets. *Advances in Immunology*, 98, 151-224.

Jentsch-Ullrich, K., Koenigsmann, M., Mohren, M., & Franke, A. (2005). Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults—a monocentric German study. *Clinical Immunology*, 116(2), 192-197.

Jiao, Y., Qiu, Z., Xie, J., Li, D., & Li, T. (2009). Reference ranges and age-related changes of peripheral blood lymphocyte subsets in Chinese healthy adults. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(7), 643-650.

Jing, Y., Shaheen, E., Drake, R. R., Chen, N., Gravenstein, S., & Deng, Y. (2009). Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Human Immunology*, 70(10), 777-784.

Kalina, T., Flores-Montero, J., Van Der Velden, V. H. J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., ... & Orfao, A. (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26(9), 1986-2010.

Larbi, A., & Fulop, T. (2014). From “truly naive” to “exhausted senescent” T cells: when markers predict functionality. *Cytometry Part A*, 85(1), 25-35.

LaRosa, D. F., & Orange, J. S. (2008). 1. Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(2), S364-S369.

Leandro, M. J. (2013). B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Res. Ther*, *15*, S3.

LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, *112*(5), 1570-1580.

Lin, S. J., Chao, H. C., Yan, D. C., & Huang, Y. J. (2002). Expression of adhesion molecules on T lymphocytes in young children and infants—a comparative study using whole blood lysis or density gradient separation. *Clinical & Laboratory Haematology*, *24*(6), 353-359.

Lin, Y., Gustafson, M. P., Bulur, P. A., Gastineau, D. A., Witzig, T. E., & Dietz, A. B. (2011). Immunosuppressive CD14⁺ HLA-DR^{low/-} monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, *117*(3), 872-881.

Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., ... & Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*, *203*(7), 1701-1711.

Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nature Reviews Immunology*, *12*(3), 191-200.

Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M., & Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European journal of immunology*, *43*(11), 2797-2809.

Matteucci, E., Ghimenti, M., Di Beo, S., & Giampietro, O. (2011). Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes. *Journal of clinical immunology*, *31*(6), 977-984.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*, *31*.

Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G., & Girschick, H. J. (2010). Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical & Experimental Immunology*, *162*(2), 271-279.

Ng, W. F., Duggan, P. J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A. D., ... & Lechler, R. I. (2001). Human CD4⁺ CD25⁺ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, *98*(9), 2736-2744.

Orsini, G., Legitimo, A., Failli, A., Massei, F., Biver, P., & Consolini, R. (2012). Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *International immunology*, *24*(6), 347-356.

Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, *28*(4), 454-467.

Pérez-Cabezas, B., Naranjo-Gómez, M., Fernández, M. A., Grífols, J. R., Pujol-Borrell, R., & Borrás, F. E. (2007). Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors. *Experimental gerontology*, *42*(10), 1033-1038.

Popadic, D., Anegón, I., Baeten, D., Eibel, H., Giese, T., Marits, P., ... & Wikström, A. C. (2013). Predictive immunomonitoring--the COST ENTIRE initiative. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, *147*(1), 23.

Rovati, B., Mariucci, S., Manzoni, M., Bencardino, K., & Danova, M. (2009). Flow cytometric detection of circulating dendritic cells in healthy subjects. *European Journal of Histochemistry*, *52*(1), 45-52.

Rovati, B., Mariucci, S., Poma, R., Tinelli, C., Delfanti, S., & Pedrazzoli, P. (2014). An eight-colour flow cytometric method for the detection of reference values of lymphocyte subsets in selected healthy donors. *Clinical and experimental medicine*, *14*(3), 249-259.

Rudolf-Oliveira, R. C. M., Gonçalves, K. T., Martignago, M. L., Mengatto, V., Gaspar, P. C., de Moraes, A. C. R., ... & Santos-Silva, M. C. (2015). Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method. *Immunology letters*, *163*(1), 96-101.

Saha, P., & Geissmann, F. (2011). Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunology and cell biology*, *89*(1), 2-4.

- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155(3), 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Wing, K., & Miyara, M. (2007). Regulatory T cells—a brief history and perspective. *European journal of immunology*, 37(S1), S116-S123.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 490-500.
- Salaun, J., Corbel, C., & Le-Douarin, N. M. (2005). Regulatory T cells in the establishment and maintenance of self-tolerance: role of the thymic epithelium. *Int. J. Dev. Biol*, 49, 137-142.
- Sallusto, F., Zielinski, C. E., & Lanzavecchia, A. (2012). Human Th17 subsets. *European journal of immunology*, 42(9), 2215-2220.
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170-181.
- Saxena, R. K., Choudhry, V., Nath, I., Das, S. N., Paranjape, R. S., Babu, G., ... & Ganguly, N. K. (2004). Normal ranges of some select lymphocyte sub-populations in peripheral blood of normal healthy Indians. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*-, 86(7), 969-974.
- Schnizlein-Bick, C. T., Spritzler, J., Wilkening, C. L., Nicholson, J. K., & O'Gorman, M. R. (2000). Evaluation of TruCount absolute-count tubes for determining CD4 and CD8 cell numbers in human immunodeficiency virus-positive adults. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(3), 336-343.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Tangye, S. G., Alexander, S. I., Solomon, M., Lee, S., ... & de Saint Groth, B. F. (2006). Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood*, 107(7), 2830-2838.
- Seidler, S., Zimmermann, H. W., Bartneck, M., Trautwein, C., & Tacke, F. (2010). Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC immunology*, 11(1), 30.

- Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., MONTORO-GARCIA, S., Drayson, M. T., & Lip, G. Y. H. (2011). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(5), 1056-1066.
- Shi, J., Ikeda, K., Maeda, Y., Shinagawa, K., Ohtsuka, A., Yamamura, H., & Tanimoto, M. (2008). Identification of CD123+ myeloid dendritic cells as an early-stage immature subset with strong tumoristatic potential. *Cancer letters*,270(1), 19-29.
- Singh, S. P., Zhang, H. H., Foley, J. F., Hedrick, M. N., & Farber, J. M. (2008). Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *The Journal of Immunology*, 180(1), 214-221.
- Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142–62.
- Steinman RM, Cohn ZA. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* 139:380–97.
- Szabolcs, P., Park, K. D., Reese, M., Marti, L., Broadwater, G., & Kurtzberg, J. (2003). Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells*, 21(3), 296-303.
- Szczepanik, A. M., Siedlar, M., Sierzega, M., Goroszeniuk, D., Bukowska-Strakova, K., Czupryna, A., & Kulig, J. (2011). T-regulatory lymphocytes in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(3), 343.
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell research*, 20(1), 4-12.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., ... & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74-e80.
- Torres, A. J. L., Angelo, A. L. D., Netto, E. M., Sampaio, G. P., Souza, D. F. C., Inocência, L. D. A., ... & Brites, C. (2009). Reference range for T lymphocytes populations in blood donors from two different regions in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13(3), 221-225.

- Tung, J. W., Heydari, K., Tirouvanziam, R., Sahaf, B., Parks, D. R., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (2007). Modern flow cytometry: a practical approach. *Clinics in laboratory medicine*, 27(3), 453-468.
- Tussey, L., Speller, S., Gallimore, A., & Vessey, R. (2000). Functionally distinct CD8+ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *European journal of immunology*, 30(7), 1823-1829.
- Valiathan, R., Deeb, K., Diamante, M., Ashman, M., Sachdeva, N., & Asthana, D. (2014). Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology*.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature immunology*, 9(5), 503-510.
- Weinberg, A., Song, L. Y., Wilkening, C., Sevin, A., Blais, B., Louzao, R., ... & Fenton, T. (2009). Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(8), 1176-1186.
- Wong, W. S., Lo, A. W. I., Siu, L. P., Leung, J. N. S., Tu, S. P., Tai, S. W., ... & Wong, K. F. (2013). Reference ranges for lymphocyte subsets among healthy Hong Kong Chinese adults by single-platform flow cytometry. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(4), 602-606.
- Xia, C. Q., Peng, R., Chernatynskaya, A. V., Yuan, L., Carter, C., Valentine, J., ... & Clare-Salzler, M. J. (2014). Increased IFN- α -Producing Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) in Human Th1-Mediated Type 1 Diabetes: pDCs Augment Th1 Responses through IFN- α Production. *The Journal of Immunology*, 193(3), 1024-1034.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

HIP-C protocol versioon 3.3

<http://entire-net.eu/wp-content/uploads/2012/09/HIP-C-3.3.pdf>

LISA 1: Ankeet kontrollgrupile ja patsientidele

Ankeet (KONTROLLGRUPP)

	Kuupäev	Isiku unikaalne number (täidab labor)
--	----------------	--

Isikuandmed

	Ees- ja perekonnanimi	Isikukood	Elukoht	Telefon
Rahvus	<i>vanavanemate rahvuse alusel</i>			
	Emapoolne vanaema		Emapoolne vanaisa	
	Isapoolne vanaema		Isapoolne vanaisa	
1. tüüpi diabeet perekonnas	Ema	Isa	Õde-vend	Lapsed

--	--	--

Kaasuvad haigused (võimalusel märkida diagnoosimise aasta)

Endokriinsed autoimmuunsed	Krooniline türeoidiit	Graves'i haigus	Autoimmuunne türeoidiit	Muu
Mitteendokriinsed autoimmuunsed	Tsöliaakia	Autoimm. maksahaigus	Vitiliigo	Reumaatiline haigus
	Sclerosis multiplex		Muu	
Krooniline pankreatiit	Anamneesis		Võimalus anamneesi ja kl. leiu alusel	

--	--	--

Muu

Arsti andmed	Nimi	Töökoht või lühend		Telefon
Saabunud katsutid (<i>täidab labor</i>)	Lisanditeta	EDTA	Na-hepariin	RNA

Patsiendi ankeet (1. tüüpi diabeet)

	Kuupäev	Patsiendi unikaalne number
--	----------------	-----------------------------------

Patsiendi andmed

	Ees- ja perekonnanimi	Isikukood	Elukoht	Telefon
Patsiendi rahvus	<i>vanavanemate rahvuse alusel</i>			
	Emapoolne vanaema		Emapoolne vanaisa	
	Isapoolne vanaema		Isapoolne vanaisa	
1. tüüpi diabeet perekonnas	Ema	Isa	Õde-vend	Lapsed

Diabeedi anamnees

Diagnoosimise kuupäev	Sümptomite kestus	Kaalulangus (kg)	Ketonuuria	Ketoatsidoos
	Insuliini päevaannus koju kirjutamisel		C-peptiid paastuseerumis nmol/l <i>(võimalusel määrata stabiilses faasis, nt. enne kojumenekut), määramise kuupäev</i>	

Kaasuvad haigused *(võimalusel märkida diagnoosimise aasta)*

Endokriinsed autoimmuunsed	Krooniline türeoidiit	Graves'i haigus	Autoimmuunne türeoidiit	Muu
Mitteendokriinsed autoimmuunsed	Tsöliaakia	Autoimm. maksahaigus	Vitiliigo	Reumaatiline haigus

	Sclerosis multiplex	Muu
Krooniline pankreatiit	Anamneesis	Võimalus anamneesi ja kl. leiu alusel

Muu

Arsti andmed	Nimi	Töökoht või lühend		Telefon
Saabunud katsutid (täidab labor)	Lisanditeta	EDTA	Na-hepariin	RNA

LISA 2: T1D patsientide ja tervete laste võrdlus

T-rakud

Tabel 15. T1D põdevate ja tervete laste T-raku alampopulatsioonide võrdlus

	T1D			Terved		
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD
CD3+	1272.6	1546.1	506.1	1379.5	1469.2	386.7
CD4+	838.7	1017.7	375.0	686.7	771.1	300.2
CD4+ naiivsed	540.2	724.8	366.6	403.3	455.3	189.7
T-EMRA CD4	7.5	15.6	23.9	17.1	16.7	15.5
T-EM CD4	62.3	77.3	44.5	75.2	76.9	10.9
EM TH1	26.2	35.0	29.9	32.6	33.8	3.1
EM TH2	9.3	9.3	4.4	10.1	10.5	2.4
EM TH17	8.7	11.1	6.6	10.0	11.3	3.2
T-CM CD4	175.6	203.2	100.0	200.2	225.8	119.1
CM TH1	67.9	63.8	30.9	69.7	69.3	32.6
CM TH2	39.6	39.9	16.8	35.5	37.1	10.0
CM TH17	43.1	49.2	27.1	47.5	58.8	39.2
DR+CD38- CD4	17.7	21.5	11.6	33.3	31.6	9.0
DR+CD38+ CD4	26.3	28.1	13.8	16.2	18.5	7.6
DR-CD38- CD4	147.1	242.6	140.1	223.1	230.9	78.1
DR-CD38+ CD4	652.4	725.4	241.1	420.9	490.2	222.4
CD8+	356.2	420.0	117.9	505.7	535.0	83.8
CD8+ naiivsed	255.4	255.2	101.5	246.1	282.9	101.7
T-EMRA CD8	97.0	98.7	39.3	154.1	154.0	46.2
T-EM CD8	42.1	50.4	31.1	70.7	69.4	12.3
T-CM CD8	10.8	18.3	14.1	29.9	32.5	21.9
DR+CD38- CD8	13.6	22.8	16.7	63.9	60.8	33.0
DR+CD38+ CD8	45.8	41.8	24.5	40.8	40.7	14.7
DR-CD38- CD8	140.1	170.9	90.5	251.5	238.0	30.2
DR-CD38+ CD8	164.3	184.4	68.8	162.4	195.5	74.4
CD4CD8 DP	5.2	5.2	1.4	4.8	5.3	2.9
CD4CD8 DN	105.6	103.4	38.1	145.2	158.5	42.2

Treg

Tabel 16. T1D põdevate ja tervete laste Treg rakkude alampopulatsioonide võrdlus

	T1D			Terved		
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD
CD4+ T-rakud	860.2	1040.8	380.4	711.4	795.2	297.5
CD25+CD127-Treg	83.6	82.8	21.5	66.3	70.0	18.8
Mälu-Treg	33.9	33.3	8.6	29.4	30.2	3.9
HLA-DR+Treg	10.4	11.4	3.4	13.2	13.6	1.1

B-rakud

Tabel 17. T1D põdevate ja tervete laste B-raku alampopulatsioonide võrdlus

	T1D			Terved		
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD
CD19+ B-rakud	401.5	346.8	135.7	381.8	429.1	98.5
CD20- B-rakud	14.5	19.9	14.6	10.9	17.5	15.0
<i>Switched</i> mälurakud	35.7	44.6	22.4	45.2	53.5	19.2
Plasmablastid	9.9	8.6	3.2	2.1	4.3	4.0
<i>Pre switch</i> mälurakud	30.1	45.9	30.0	52.5	48.2	12.0
CD27- IgD- mälurakud	11.8	11.3	5.8	9.7	22.0	22.2
Naiivsed B-rakud	293.1	246.3	113.4	282.1	309.1	74.6
Üleminekurakud	53.1	47.7	29.4	60.1	62.1	5.8

Dendriittrakud, NK-rakud ja monotsüüdid

Tabel 18. T1D põdevate ja tervete laste DC, NK-rakkude ja monotsüütide alampopulatsioonide võrdlus

	T1D			Terved		
	Mediaan	Keskmine	SD	Mediaan	Keskmine	SD
CD3- CD19- CD20-	431.8	555.0	293.9	670.8	656.5	123.9
Monotsüüdid	251.7	268.3	104.6	308.2	322.5	54.5
CD14+ CD16- mono	235.4	244.7	100.9	277.1	292.8	44.7
CD14+ CD16+ mono	16.6	23.8	16.0	36.3	29.8	16.5
NK-rakud	180.5	198.2	175.3	206.8	236.9	120.8
CD56di CD16+ NK	155.1	179.4	175.1	180.4	212.1	119.9
CD56di CD16- NK	6.6	5.6	2.3	7.9	11.0	9.7
CD56br CD16- NK	5.7	7.8	4.6	8.7	9.5	2.0
CD56br CD16+ NK	6.3	5.5	2.7	4.0	4.3	2.9
CD56br CD8a- NK	7.5	7.1	4.0	7.7	8.0	1.4
CD56br CD8a+ NK	3.4	4.7	3.2	5.9	6.3	1.7
CD56di CD8a- NK	56.0	65.5	66.2	69.5	98.1	73.3
CD56di CD8a+ NK	108.7	120.9	110.9	124.6	124.6	56.5
Lin-	73.6	88.5	34.3	91.9	94.2	17.5
Dendriittrakud	28.0	36.2	21.6	52.1	51.8	24.9
pDC	5.7	7.2	5.7	8.3	8.5	1.4
mDC	12.9	14.2	3.2	40.4	37.4	23.1
Slan+ CD16+ mDC	8.2	8.0	4.9	31.4	26.7	17.8
Slan- CD16- mDC	5.0	5.1	2.8	6.8	8.1	3.7
Slan- CD16+ mDC	0.7	0.8	0.7	2.0	2.4	2.5
Slan+ CD16- mDC	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3

LISA 3. Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Astrid Oras (sünnikuupäev: 22.01.1989),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Inimese perifeerse vere immuunrakkude iseloomustamine polükromaatse läbivoolu tsütofluorimeetria abil, kasutades HIP-C 3.3 tööprotokolli,

mille juhendajad on professor Raivo Uibo ja Sulev Ingerpuu,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

1. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
2. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015