

Opinnäytetyö (AMK)

Bio –ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikan suuntautumisvaihtoehto

2011

Riina Kautonen

NEUTROFIILISTEN GRANULOSYYTTIEN *E. COLI* K12 -KANNAN FAGOSYTOOSI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

Turun ammattikorkeakoulu

Bio -ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Opinnäytetyön valmistumisajankohta 2011 | Sivumäärä: 42

FT Esa-Matti Lilius, FM Janne Atosuo, FM Kai Rosenberg

Riina Kautonen

NEUTROFIILISTEN GRANULOSYYTTIEN *E. COLI* K12 -KANNAN FAGOSYTOOSI

Tässä työssä tutkittiin bioluminesoivan *E. coli* K12 pEGFPABCDEamp^r-kannan viabiliteettiä, mittaamalla bakteerin emittoimaa bioluminesenssia reaaliaikaisesti. Bakteerisolujen tappamiseen käytettiin fagosytoivia neutrofiilisiä granulosityttejä, jotka eristettiin ihmisen perifeerisestä verestä. Työssä tutkittiin myös veren soluttoman osan seerumin vaikutusta solujen viabiliteettiin ja neutrofiilisten granulosityttien fagosytoositehokkuuteen. Bakteerisolujen kuolevuutta pyrittiin todistamaan maljaamalla reaktionäyhteitä ja lisäämällä reaktioihin sytokalasiini D:tä, jolla on fagosytoosia estävä vaikutus.

E. coli -bakteeria kasvatettiin haluttuun pitoisuuteen, mikä määritettiin mittaamalla bakteerisolususpension absorbanssi sekä määrittämällä graafisesti absorbanssia vastaava solupitoisuus suspensiossa. Leukosyytit ja seerumi eristettiin hematologisin menetelmin ja leukosyyttien sekä neutrofiilisten granulosityttien pitoisuus määritettiin värjäämällä solut ja mikroskopoimalla näytteet.

Reagenssit pipetoitiin 96-kuoppalevylle, jossa reaktioita mitattiin reaaliaikaisesti luminometrillä mittaamalla *E.coli* -bakteerin säteilemä bioluminesenssi. Reaktioita kuvattiin kineettisillä käyrillä, joista voitiin graafisesti määrittää elävien bakteerisolujen lukumäärä.

Aikaisemmin on ajateltu, että neutrofiiliset granulositytit tappavat bakteerisolut solunsisäisesti endosytoimalla solut ja erittämällä granuloiden sisältämää vetyperoksidia ja myeloperoksidaasia ja muita bakterisidisiä yhdisteitä, tuhotakseen bakteerisolut. Tulokset osoittavat kuitenkin, että neutrofiiliset granulositytit tappavat bakteerisolut pääasiassa solunulkoisesti, purskauttamalla vetyperoksidin ja myeloperoksidaasin bakteerisolujen päälle ja fagosytoimalla kuolleet solut. Huomattiin, että jo pienikin pitoisuus neutrofiilejä tappaa bakteerisoluja suuria määriä. Myöskään sytokalasiini D:llä ei ollut huomattavaa vaikutusta fagosytoosiin, mikä selittäisi solunulkoisen tappomekanismin.

ASIASANAT:

fagosytoosi, neutrofiilinen granulositytti, neutrofiili, bioluminesenssi

Riina Kautonen

PHAGOCYTOSIS OF *E. COLI* K12 STRAIN BY NEUTROPHILIC GRANULOCYTES

The aim of this study was to determine the viability of the K12 pEGFPABCDEamp strain of *E. coli* by measuring bioluminescence in realtime. The bacterial cells were phagocytosed by neutrophilic granulocytes which were isolated on the human peripheral blood. The impact of blood serum on the phagocytosis of neutrophilic granulocytes and on the viability of bacterial cells was also studied. The death of bacterial cells was proved by plating the reaction samples and adding cytochalasin D to prevent the phagocytosis of neutrophilic granulocytes.

The *E. coli* was cultured until the desired cell count was reached. The cell concentration corresponding to the suspension's absorbance was graphically determined. Leucocytes and serum from blood were isolated by hematologic methods and the concentrations of leucocytes and neutrophils were calculated by light microscopy.

The reagents were pipetted onto 96-well plates where reactions were determined by measuring the bioluminescence of viable *E. coli* cells. The viability of bacterial cells was illustrated by kinetic curves from which the viable cell count could be determined.

Previously, it has been thought that the neutrophilic granulocytes kill bacterial cells intracellularly by endocytosing the cells and secreting hydrogen peroxide and myeloperoxidase from granules inside the cell to destroy the bacterial cells. However, the results indicate that the neutrophilic granulocytes mainly kill by bursting out hydrogen peroxide and myeloperoxidase on the bacterial cells and phagocytosing the dead bacteria. It was discovered that even relatively small neutrophil concentrations kill high bacteria concentrations. Cytochalasin D did not have any significant impact on phagocytosis either, which also seems to imply extracellular killing mechanisms.

KEYWORDS:

phagocytosis, neutrophilic granulocytes, neutrophil, bioluminescence

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 IMMUUNIVASTE	8
2.1 Synnynnäinen immuunivaste	8
2.2 Leukosyytit	9
2.3 Granulosyytit	9
2.4 Vasta-aineet eli immunoglobuliinit	10
2.5 Komplementti	12
2.6 Fagosytoosi ja opsonisaatio	13
2.6.1 Fagosytoosin vaiheet	16
2.6.2 Fagosyyttien tappomekanismit	17
2.7 Tulehdusreaktio	17
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	19
3.1 Bakteerisolujen kasvatus	19
3.2 Veren käsittely ja valkosolujen puhdistus	20
3.2.1 Punasolujen lyyssaus	20
3.2.2 Seerumin talteenotto	20
3.3 Valkosolujen värjäysmenetelmät ja laskeminen	20
3.4 Puskurit	21
3.5 Sytokalasiini D	22
3.6 Luminesenssin mittaaminen	22
3.6.1 Bioluminoiva plasmidi luxABCDEamp	23
3.7 Bakteerisolujen maljaus	24
4 KOEAJOT JA PÄÄTELMÄT	24
4.1 Leukosyyttien laimennussarjan tappokapasiteetin mittaaminen	24
4.2 Optimaalisen seerumipitoisuuden määrittäminen	27
4.3 Optimaalinen seerumipitoisuus ja neutrofiilien tappokapasiteetti	29
4.4 Reagenssien pipetointijärjestyksen vaihtaminen	33
4.5 Puskureiden vaikutus	35
4.6 Maljaus	36
5 YHTEENVETO	39
6 LÄHTEET	42

LIITTEET

Liite 1. Giemsan väriliuos

Liite 2. Puskurit

Liite 3. *E. coli* -pitoisuuden määrittäminen absorbanssin (620 nm) avulla

Liite 3. Maljauslaskut

KUVAT

Kuva 1. Neutrofiilinen granulosyytti ¹

Kuva 2. Komplementin aktivaatitiet ¹

Kuva 3. Kaaviokuva bakteerisolun fagosytoosista ¹

Kuva 4. Elektronimikroskooppikuva IgG-vasta-ainepäälysteisestä jakautuvasta bakteerisolusta neutrofiilin fagosytoimana ¹

Kuva 5. Sytokalasiini D ¹³

Kuva 6. Bioluminoiva plasmidi luxABCDEamp ¹⁵

KUVIOT

Kuvio 1. Bakteerisolujen viabiliteetti 1

Kuvio 2. Bakteerisolujen viabiliteetti 2

Kuvio 3. Optimaalisen seerumipitoisuuden määrittäminen graafisesti

Kuvio 4. Optimaalisen seerumipitoisuuden vaikutus, kun neutrofiilien lukumäärä on 2×10^3

Kuvio 5. Optimaalisen seerumipitoisuuden vaikutus, kun neutrofiilien lukumäärä on 4×10^3

Kuvio 6. Reagenssien pipetointijärjestyksen muuttamisen vaikutus

Kuvio 7. Puskureiden vaikutus signaaliin

Kuvio 8. Maljausajo gHBSS puskurissa

Kuvio 9. Maljausajo HBSS puskurissa

KAAVIOT

Kaavio 1. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä 1

Kaavio 2. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä 2

Kaavio 3. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä 3

Kaavio 4. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä 4

Kaavio 5. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä 5

TAULUKOT

Taulukko 1. Vasta-aineluokkien ominaisuudet ¹

Taulukko 2. Luminesenssin mittausparametrit

Taulukko 3. Elävien bakteerisolujen määrä seerumipitoisuuden vaihdellessa

Taulukko 4. Neutrofiilien lukumäärä

Taulukko 5. Elävien bakteerisolujen lukumäärä 1

Taulukko 6. Elävien bakteerisolujen lukumäärä 2

Taulukko 7. Pipetointijärjestyksen vaihtamisen vaikutus fagosytoosiin

Taulukko 8. Elävien bakteerisolujen määrä ennen maljausta

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI) SANASTO

PAMP	=pathogen associated molecular pattern, patogeenin yhdistetty molekyylinen rakenne
HNP	=human neutrophil proteins, ihmisen neutrofiiliset proteiinit
CRP	=C-reactive protein, C-reaktiivinen proteiini
MAC	=membrane attack complex, kompleksi, joka kiinnittyy solukalvoon
EDTA	=etyleenidiamiinitetraetikkahappo
HBSS	=Hank's balanced salt solution
gHBSS	=Hank's balanced salt solution, joka sisältää 0,1% gelatiinia
DMSO	=dimetyylisulfoksidi

1 JOHDANTO

Työn tavoitteena oli määrittää *E.coli* K12 pEGFPABCDEamp^r-kannan elävien solujen määrä kineettisistä *E.coli* -bakteerin kuolevuutta kuvaavista käyristä sekä tutkia neutrofiilisten granulosityttien fagosytoosin kapasiteettia tappaa *E.coli* -bakteeria. Reaktioissa käytettiin reagenssina myös veren solutonta osaa seerumia, opsonoimaan bakteerisoluja, koska bakteerisolujen opsonisaatio lisää huomattavasti neutrofiilien kapasiteettia fagosytoida soluja.

Menetelminä käytettiin perushematologian ja mikroskopian menetelmiä. Leukosyyttien lukumäärä saatiin määritettyä värjäämällä verisolut kristallivioletilla ja neutrofiilien lukumäärä verinäytteen sivelyvalmisteesta, värjäämällä solut Giemsan väriliuoksella. Leukosyytit eristettiin ja puhdistettiin vapaaehtoisten luovuttajien verinäytteistä.

E.coli -bakteerin kuolevuutta ja fagosytoivien neutrofiilien tehokkuutta analysoitiin mittaamalla *E.coli* -bakteeriin transformoidun plasmidin emittoimaa bioluminesenssia. Mitattu bioluminesenssi on suoraan verrannollinen elävien bakteerisolujen määrään. *E.coli* -bakteeria kasvatettiin aluksi putkikasvatuksena pakastetusta valmisteesta LB-kasvatusmediumissa. *E.coli* -bakteerin solupitoisuus saatiin määritettyä graafisesti kasvukäyrältä kasvatuksen aikana mitatun absorbanssin avulla.

2 IMMUUNIVASTE

Ihmiset altistuvat joka päivä miljoonille patogeeneille. Mikrobeita voi päästä elimistöömme hengityksen, kosketuksen, suun tai ihovamman kautta. Adaptiivinen immuunivaste auttaa meitä välttämään patogeenien aiheuttamien tulehdusten syntyä. Se muistaa aiemmin kohtaamansa patogeenit ja osaa suojautua tietyn patogeenin aiheuttamaa infektiota vastaan. Adaptiivinen immuunivaste on kuitenkin hidas ja spesifinen. Kun immuunivaste ei ole kohdannut patogeenia aiemmin, puolustautuminen tätä uutta mikrobia vastaan on tehtävä muuta kautta. Tällöin on kyse synnynnäisestä immuunivasteesta, joka on epäspesifinen ja toimii nopeasti. Esimerkiksi bakteerien lisääntymiskyky on nopeaa ja ne voivat aiheuttaa vakavan tulehduksen jo päivässä. Adaptiivisen immunitetin vaste uutta patogeenia kohtaan vie kuitenkin viikkoja, kun taas synnynnäinen immunitetti pystyy vastaamaan tulehdukseen jo tunneissa. Synnynnäinen immuunivaste myös auttaa adaptiivisen immuunivasteen aktivoitumisessa. ¹

2.1 Synnynnäinen immuunivaste

Synnynnäinen immuunivaste on epäspesifinen, toisin kuin adaptiivinen immuunivaste, joka on spesifinen tietylle patogeenille. Synnynnäinen immuunivaste käyttää pääasiassa kolmea keinoa, joilla se pysäyttää patogeenien hyökkäyksen. ¹ Fyysisiä ja kemiallisia esteitä ovat ihon paksu, keratisoituneiden kuolleiden solujen kerros, ihon rasvahapot, epiteelikudosten lima, esimerkiksi hengitysteissä ja ruuansulatuskanavissa, mahalaukun happo, syljen antibakteerinen koostumus ja epiteelikudosten normaalin bakteeriflooran tuottamat bakterisidit eli toksiset, bakteereita tappavat proteiinit. ²

Fyysisten ja kemiallisten puolustautumiskeinojen lisäksi synnynnäinen immuunivaste laukaisee tulehdusreaktion, joka auttaa vastetta toimimaan nopeammin ja hidastamaan mikrobien kasvua erilaisin keinoin. Veren soluttoman osan, seerumin komplementin toiminta, aktivoi immuunivasteen valkosolujen toimintaa.

2.2 Leukosyytit

Leukosyytit eli valkosolut vastaavat sekä synnynnäisen immunitetin että adaptiivisen immunitetin toiminnasta. Leukosyyteiksi solut erilaistuvat hematopoieettisista kantasoluista luuytimessä sekä maksassa. Solut siirtyvät kehon eri kudoksiin ja erilaistuvat kohdekudoksen mukaan. Leukosyytit toimivat yhdessä puolustautuessaan patogeenejä vastaan. Toiset toimivat paikallisesti kudoksissa ja toiset siirtyvät infektiopaikalle ruumiin nesteiden mukana. Leukosyytit erilaistuvat viideksi erilaiseksi ryhmäksi: lymfosyytit, monosyytit ja makrofagit, granulosyytit, syöttösolut ja dendriittisolut. Nämä soluryhmät edelleen erilaistuvat erilaisiksi populaatioiksi.²

2.3 Granulosyytit

Granulosyyttien eli polymorfonukleaaristen leukosyyttien tuma on jakaantunut kahdesta viiteen osaan. Granulosyyttien sytoplasma sisältää granuloita, jotka tappavat mikro-organismeja ja tehostavat tulehdusreaktiota. Granulosyyttien toimintaa stimuloivat muun muassa partikkeleiden opsonisaatio. Granulosyyttejä ovat basofiilit, neutrofiilit ja eosinofiilit.

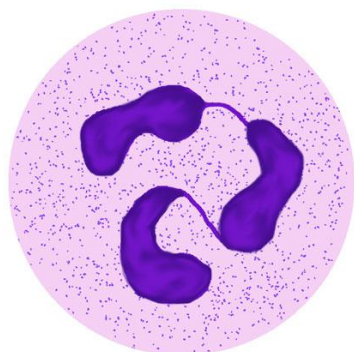
Neutrofiilit eli neutrofiiliset granulosyytit ovat kaikkein yleisimpiä veren leukosyyttejä. Suurin osa neutrofiileista on varastoituneena luuytimeen. Neutrofiilien elinikä on noin 5 vuorokautta verenkierrossa ja 1-2 vuorokautta niiden valettua kudoksiin. Niiden tuma on jakaantunut kolmesta viiteen lohkokoon, jotka ovat kiinni toisissaan kromatiinirihmoilla.^{3,4} Solut sisältävät isoja primaarisia ja pienempiä sekundaarisia granuloita. Primaariset eli atsurofiiliset rakkulat ovat lysosomeja, jotka sisältävät myeloperoksidaasia, antibakteerisia peptidejä ja proteolyttisiä entsyymejä. Sekundaariset rakkulat sisältävät lysosyyymiä ja laktoferriniä.⁴ Lysosyyymi hydrolysoi makromolekyylejä, kuten proteiineja, polysakkarideja ja nukleiinihappoja alhaisessa pH:ssa.⁵

Neutrofiilien lysosomaaliset entsyymit viittaavat niiden fagosyyttiseen luonteeseen. Neutrofiilit tuottavat superoksidianioneja ja vetyperoksidia, jotka tappavat bakteereita. Bakteerin endosytoinut neutrofiili tuottaa

superoksidianioneja ja vetyperoksidia varastoimiensa hiilihydraattien avulla. Myeloperoksidaasi katalysoi vetyperoksidin ja halogenidin bakteerin soluseinän halogenaatiota, joka johtaa solun kuolemaan. ⁵

Neutrofiileilla on reseptoreja vasta-aineille ja komplementtiproteiineille. Neutrofiilit vaeltavat tulehduspaikalle, jossa ne vastaavat mikrobien fagosyytoosista. ² Granulat sisältävät myös mikrobisidejä kationisia proteiineja, läpäisevyyttä tehostavia proteiineja sekä defensiinejä. ³ Ihmisellä on neljää erilaista defensiiniä (human neutrophil proteins): HNP-1,2,3 ja 4. Defensiinit tekevät bakteerien seinämästä läpäisevämmän muodostamalla jännitteestä riippuvia kanavia solun membraaniin, jolloin ionit pääsevät virtaamaan kanavia pitkin. ²

Neutrofiileilla on myös kyky erittää granuloiden bakterisidisiä yhdisteitä ulos solusta ja tappamaan siten bakteerisolut solunulkoisesti eli ekstrasellulaarisesti. Tämä saattaa vahingoittaa kudosta pitkäaikaisissa bakteeri-infektioissa tai komplementin stimuloimissa kohteissa, joissa on läsnä paljon neutrofiileja. ⁵



Kuva 1. Neutrofiilinen granulosyytti ⁶

2.4 Vasta-aineet eli immunoglobuliinit

Nisäkkäillä on viisi vasta-aineluokkaa: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Vasta-aineiden perusrakenne koostuu neljästä eri polypeptidiketjusta: kahdesta raskaasta ketjusta ja kahdesta kevyestä ketjusta. Jokaisella vasta-aineluokalla on omat raskaat ketjunsä, jotka ovat esitettyinä taulukossa 1. Neljä ketjua pysyy yhdessä sekä ei-kovalenttisilla sidoksilla että kovalenttisilla disulfididisidoksilla. Y:n muotoisella vasta-aineella on kaksi antigeenin sitoutumiskohtaa ja häntäosa.

Kevyitä ketjuja on kaksi: κ ja λ . Vasta-aineluokilla IgA ja IgG on lisäksi alaluokkia.¹

Veressä suurin vasta-aineluokka on IgG. IgG on monomeeri, joka koostuu neljästä polypeptidiketjusta. Sen lisäksi, että IgG aktivoi komplementin, se pystyy sitoutumaan makrofagiin ja neutrofiilien Fc-reseptoreihin. Fagosyytit sitoutuvat ja tuhoavat mikro-organismit, joihin IgG on kiinnittynyt. Myös vasta-aine luokka IgM aktivoi ja tehostaa komplementin toimintaa sitoutumalla antigeeneihin. Aktivoituneen komplementin komponenttien sitoutuminen vasta-aineantigeenikompleksiin lisää antigeenien kykyä stimuloida B-soluja tuhatkertaiseksi.¹

Neutrofiileilla on ainakin kolmea erilaista Fc γ reseptoria, jotka sitoutuvat eri affiniteetilla eri IgG:n alaluokkiin. Sekä alhaisen että korkean affiniteetin omaavat reseptorit osallistuvat opsonoitujen patogeeneiden fagosytoosiin voimistaen tapahtumaa. Parhaiten fagosytoosi tehokkuutta lisäävät näihin reseptoreihin sitoutuvat IgG:n alaluokat IgG1 ja IgG3.³

Taulukko 1. Vasta-aineluokkien ominaisuudet¹

	Vasta-aineluokka				
Ominaisuudet	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Raskaat ketjut	α	δ	ϵ	γ	μ
Kevyet ketjut	κ tai λ	κ tai λ	κ tai λ	κ tai λ	κ tai λ
Neljän ketjun yksiköiden lukumäärä	1 tai 2	1	1	1	5
Prosenttiosuus veressä	15	<1	<1	75	10
Komplementin aktivointi	-	-	-	++	++++
Sitoutuu neutrofiileihin				+	

- ei aktivointia

+ vähäinen aktiivisuus

++ selkeä aktiivisuus

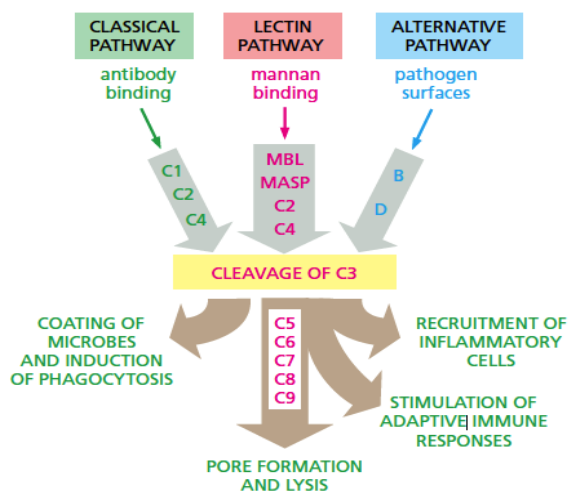
++++ korkea aktiivisuus

2.5 Komplementti

Komplementti koostuu noin 20 liukoisesta proteiinista, jotka kiertävät veressä sekä solun ulkoisissa nesteissä. Monet komplementin komponenteista aktivoituvat tulehdusreaktiosta. Komplementti nimi tulee siitä, miten nämä komponentit komplementoivat eli täydentävät vasta-aineiden toimintaa. Toisaalta osa komponenteista toimii reseptoreina, jotka tunnistavat patogeenien kanssa vuorovaikutuksissa olevia rakenteita. ¹

Komplementilla on kolme tehtävää: 1) Ne suojaavat bakteeri-infektioilta opsonisoimalla, aktivoimalla leukosyyttejä ja hajottamalla bakteerien soluseinää. 2) Komplementti yhdistää synnynnäisen immuniteetin ja adaptiivisen immuniteetin toiminnan ja se 3) hävittää jätteitä, jotka tulevat muun muassa apoptoosin ohjautuneista soluista ja vammasta aiheutuneesta tulehduksesta. ²

Komplementin aktivoituessa, ensimmäisenä aktivoituvat aikaiset komplementin komponentit. Aikaisiin komplementin komponentteihin kuuluu kolme ryhmää, joista jokainen jakautuu omaksi tiekseen: klassinen aktivaatio, lektiiniaktivaatio ja oikotieaktivaatio. Nämä komponentit toimivat paikallisesti aktivoitakseen komplementin komponentin C3, ² mikä on esitetty kuvassa 1.



Kuva 2. Komplementin aktivaatitiet ¹

Klassinen aktivaatiotie aktivoituu vasta-aineiden toimesta. Ilman vasta-aineiden aktivointia komplementti käynnistyy joko oikotieaktivaation tai lektiiniaktivaation kautta. Oikotieaktivaatio on periaatteessa kokoajan valmiustilassa, jolloin se hyökkää nopeasti patogeeneja vastaan. Komplementin komponentit aktivoituvat mikrobin pinnalla niin kauan, kunnes aktivointiin tarvittavaa pintaa ja komponentteja riittää. ⁴

Aktivaatiotietä, jossa tunnistavana komponenttina on mannoosia sitova lektiini, kutsutaan lektiinitieksi. Tarkin aktivaatiotie on klassinen aktivaatio, jossa vasta-aineet tunnistavat rakenteita. Vasta-aineiden muodostuminen on hidasta, kun elimistö kohtaa patogeenin ensimmäistä kertaa eli kun kyseessä on primaarivaste. Kun vasta-aineet ovat jo olemassa, klassinen aktivaatio on yhtä nopea kuin oikotieaktivaatio.

Järjestelmässä, tiestä riippumatta, komplementin komponenttien pilkkoutumistuotteet aktivoivat aina seuraavaa ja etenee näin putousmaisesti kohti aktivaatiotapahtuman loppua, joka johtaa membraaneja tuhoavaan (MAC) kompleksin muodostumiseen. Yhdessä kompleksissa on C5b-, C6-, C7- ja C8-molekyylejä yksi sekä monta C9-molekyyliä.

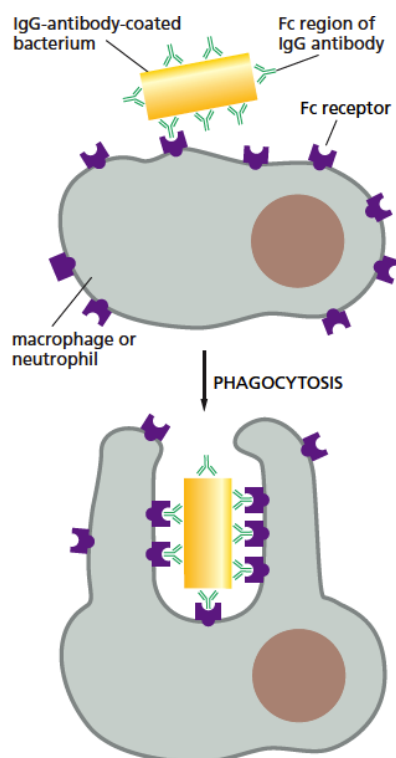
Komplementti voimistuu proteolyyttisten entsyymien läsnä ollessa. Yksi proteolyyttinen molekyyli pystyy pilkkomaan useita seuraavan vaiheen pilkkoutumistuotteita. Voimistuminen eli amplifikaatio tapahtuu vain mikrobien eli kohteen pinnalla. Liukoiset aktivaation estäjät varmistavat, että voimistuminen ei tapahdu, esimerkiksi omien solujen pinnoilla. ⁴

2.6 Fagosytoosi ja opsonisaatio

Fagosytoosi on endosyytosin erikoistapaus, jolloin solu käyttää suuria endosytoivia fagosomeja apunaan mikrobien ja kuolleiden solujen syönnissä. Nisäkkäillä on kaksi valkosoluluokkaa, jotka ovat erikoistuneet fagosytoosin: makrofagit ja neutrofiilit. Makrofageilla on tärkeä rooli apoptoosiin kuolleiden solujen syöjänä. ¹

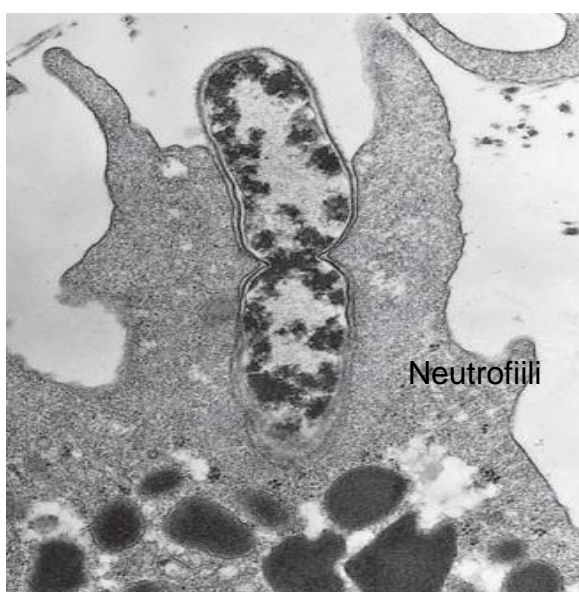
Fagosytoivien solujen sisällä olevat fagosomit voivat olla melkein yhtä suuria kuin itse solut. Fagosomit fuusioituvat solujen sisällä lysosomien kanssa, jolloin syöty materiaali hajoaa. Hajotettavan materiaalin jäänteet hävitetään eksosytoimalla ne ulos solusta.¹

Fagosytoivat solut käyttävät kahta mekanismia mikrobien tunnistamiseen: opsonoinnista riippuvaan ja opsonoinnista riippumattomaan mekanismiin. Fagosytointi tehostuu huomattavasti opsonoinnilla. Opsonisaatio on tapahtuma, jossa mikro-organismi tai muu partikkeli on pinnoitettu seerumin komponenteilla, vasta-aineilla, mannoosia sitovilla proteiineilla ja komplementti C3b:llä. Komponenttien tarttuminen esimerkiksi mikrobien pintaan, auttaa fagosytoivia soluja huomaamaan vieraat partikkelit ja tehostamaan tapahtumaa. Seerumin komponentit toimivat yhdistävänä tekijänä fagosytoivien solujen ja vieraiden mikrobien välillä. Ne sitoutuvat sekä mikrobien pinnalle että erityisiin reseptoreihin fagosytoivan solun pinnalla.² Kuvissa 3 ja 4 on esitetty, miten neutrofiili tai makrofagi fagosytoi IgG-vasta-aine päällysteisen bakteerisolun.



Kuva 3. Kaaviokuva bakteerisolun fagosytoosista¹

Opsonoinnista riippumattomat mekanismit eivät tarvitse seerumin komponentteja fagosytointiin. Spesifiset tai epäspesifiset reseptorit fagosytoivien solujen pinnalla tunnistavat rakenteita mikro-organismien pinnoilla. Opsonoinnista riippumattomia mekanismeja on neljä: lektiini fagosytoosi, jossa tunnistaminen tapahtuu kohdesolun pintalektiinien ja fagosytoivan solun pinnalla olevien hiilihydraattien välillä. Toisessa tapauksessa sekä fagosytoivan solun ja mikro-organismien pintaproteiinit reagoivat keskenään ja kolmas hydrofobinen tapaus, on bakteerin ja fagosytoivan solun vuorovaikutukset. Neljäs opsonoinnista riippumaton vuorovaikutustyyppi on isännän omien mikrobien tunnistaminen.² Erilaiset mikrobien kanssa vuorovaikutuksissa olevat immunostimulantit esiintyvät usein toistuvina rakenteina. Näitä rakenteita kutsutaan patogeenein kanssa vuorovaikutuksissa oleviksi molekyylisiksi rakenteiksi PAMP (*pathogen-associated-molecular-pattern*). Näitä rakenteita tunnistavat isäntäsolujen reseptorit (pattern recognition receptors). Reseptorit sijaitsevat liukoisina komplementin komponenttien osana tai isäntäsolun solukalvoreseptoreina. Reseptorit aloittavat patogeenin fagosytoosin ja käynnistävät synnynnäisen immunitetin toiminnan.¹



Kuva 4. Elektronimikroskooppikuva IgG-vasta-ainepäällysteisestä jakautuvasta bakteerisolusta neutrofiilin fagosytoimana¹

2.6.1 Fagosytoosin vaiheet

Mikrobien luokse fagosyyttejä houkuttelee kemotaktiset aineet, jotka muodostavat pitoisuusgradientteja. Neutrofiilit liikkuvat tätä syntynyttä pitoisuusgradienttia pitkin kohti mikrobeja. Tapahtuma on nimeltään kemotaksis. Aineita, jotka osallistuvat tapahtumaan ovat komplementin aktivaatiotuotteet, kemokiinit ja bakteerien peptidit, joissa N-terminaalinen aminohappo on formyyylimetionini. Kemotaktinen signaali syntyy, kun komplementti aktivoituu tai mikrobit vapauttavat peptideitään. Fagosyyttien pinnalla on reseptoreita, johon kemotaktiset aineet sitoutuvat. Kun aine sitoutuu reseptoriinsa, tapahtuu solunsisäinen aktivaatio ja fagosyytit muuttuvat liikkumis- ja tarttumiskykyisemmiksi.^{2,4}

Kuten edellä mainittiin, fagosyytti voi tarttua mikrobiin suoraan tai epäsuorasti. Fagosyytti tunnistaa mikrobin pinnalla olevia rakenteita ja tarttuu niihin reseptoreillaan. Esimerkiksi tunnistettavana osana voi olla mikrobin pintarakenteiden mannoosi, ja fagosyytin reseptorin sokeria tunnistava pääteosa. Fagosyytti voi myös tunnistaa mikrobin komplementin tai vasta-aineiden välityksellä epäsuorasti. Bakteerit, joiden ympärille on muodostunut kapseli, tai ihmisen omien solujen mannoosirakenteiden peittyvyys muiden sokerirakenteiden alle, voi estää suoran fagosytoinnin, jolloin komplementin osat tai vasta-aineet tarttuvat mikrobin pinnalle ja opsonoivat sen.

Mikrobin opsonointi useammalla tekijällä, lisää fagosytoinnin tehokkuutta. Fagosyyteilla ovat vasta-aineille omat Fc-reseptorinsa sekä komplementin tunnistavilla omansa, kuten C3b:tä tunnistava valkuainen CR1 (CD35). Erilaiset reseptorit tunnistavat erilaisia rakenteita mikrobeissa, jolloin ne synnyttävät fagosyyteissa erilaisia vasteita. Näiden reseptorien kautta tapahtuva tarttuminen komplementin oikotien kautta (vasta-aineita ei vielä ole syntynyt) käynnistää fagosyyttien sisällä myös nielemiseen ja mikrobin tappoon johtavan signaaliketjun.⁴

Fagosyytti nielee mikrobin aktiivisen sisäänoton tai passiivisen absorption kautta. Fagosomi, jossa nielty mikrobi jää fagosyytin sisään, muodostuu, kun

fagosyytin valejalat kuroutuvat mikrobin ympärille. Valejalat liikkuvat aktiini – ja myosiinimolekyyleillä. Mikrobi alkaa hajota, kun fagosomiin yhdistyy lysosomirakkuloita, jotka hajottavat entsyymeillään mikrobin.⁴

2.6.2 Fagosyyttien tappomekanismit

Fagosyyttien tappomekanismit synnyttävät hapesta riippuvaisia reaktiivisia yhdisteitä, kuten vapaita happiradikaaleja O_2^- (superoksidi), OH (hydroksyyliiradikaali) ja H_2O_2 (vetyperoksidi). O_2^- -ionilla on negatiivinen varaus sekä yksi pariton elektrodi ja se reagoi hyvin herkästi molekyylien ja atomien kanssa. Hydroksyyliiradikaali on niin sanottu vapaa radikaali, jolla on yksi pariton elektrodi. OH on erittäin reaktiivinen ja se on mikrobeille toksinen yhdiste. Superoksidia syntyy määrällisesti enemmän hydroksyyliiradikaalin verrattuna, mutta se on superoksidia aktiivisempi. Vetyperoksidi on myös bakteereita tappava, mutta jotkin bakteerit pystyvät estämään sen toiminnan. Vetyperoksidin ja kloridi-ionien reaktiotuote hypokloriitti saattaa tuottaa reagoidessaan amiinien kanssa kloramiineja, jotka ovat mikrobeja tappavia yhdisteitä. Vetyperoksidin ja kloridi-ionin reaktiota katalysoi myeloperoksidaasi.

4

Neutrofiillisten granulosityttien sisällä on rakkuloita, jotka sisältävät pieniä peptidejä. Näillä peptideillä, joita kutsutaan defensiineiksi, on bakterisidinen vaikutus. Defensiinit tarttuvat mikrobin pinnalle ja tekevät sen solukalvoon reikiä, joiden läpi ionit kulkevat. Myös typpioksidilla NO saattaa olla mikrobeja tuhoava vaikutus. NO tuhoaa mikrobeja fagosyyttien sisällä. Defensiinien ja typpioksidien lisäksi lysosomaaliset entsyymit ja matala pH tuhoavat mikrobeja fagosyyttien sisällä.⁴

2.7 Tulehdusreaktio

Tulehdusreaktio on yksi tärkeimmistä epäspesifisistä puolustamiskeinoista. Tulehdusreaktio poistaa elimistölle vieraita rakenteita ja varoittaa elimistöä. Se myös viestii alkaneesta reaktiosta muualle elimistöön ja käynnistää paranemisen. Paikallisen tulehdusreaktion merkkejä ovat punoitus, kuumotus,

kipu ja turvotus. Muualla elimistössä verenkierto ja verenläpäisevyys lisääntyvät ja kudosten määrä lisääntyy. Yleistynyt tulehdus aiheuttaa kuumeen ja laskee verenpainetta. Tulehdusreaktion voi aiheuttaa mikrobit, erityisesti niiden komponenttien endotoksiinit ja muut toksiinit. Myös kemikaalit ja entsyymit voivat aiheuttaa tulehduksen sekä paikallinen fyysinen vamma. Solujen ainesosat solun ulkopuolella saavat elimistön reagoimaan myös tulehdukseen.⁴

Akuutti tulehdus saa vahingoittuneen kudoksen vapauttamaan kemiallisia signaaleja, jotka aktivoivat endoteelin verisuonia. Verisuonet laajenevat ja saavat veren virtaamaan hitaammin. Verisuonten selektiinit houkuttelevat paikalle neutrofiilejä, jotka vierivät hitaasti pitkin endoteeliä. Tulehdusreaktion vapauttamien kemikaalien lähettämät signaalit aktivoivat neutrofiileille, jotka aktivoi niiden pinnalla olevia integriinejä. Integriinit sitoutuvat endoteelin adheesio-molekyyleihin ja neutrofiilit pysähtyvät. Neutrofiilit muuttavat muotoaan mahtuakseen puristautumaan läpi endoteelisolukon ja siirtymään tulehduspaikalle sekä hyökkäämään tulehduksen aiheuttavaan patogeeniin. Neutrofiilit paikalle houkuttelevat kemotaksiinit, joita esim. bakteerit tuottavat.²

Bakteerien erittämät kemotaktiset aineet, kuten formyyli-metionyylipeptidit myös laajentavat verisuonia. Sen lisäksi, että verisuonten läpäisevyys kasvaa, mukaan tulee imusuoniston toiminta, joka poistaa nesteitä. Imusuonisto pumppaa nesteitä tehokkaasti imusolmukkeisiin, jolloin nesteiden kierto kudoksessa lisääntyy ja näkyy turvotuksena.⁴

Tulehdusreaktion aikana myös solun ulkoisten nesteiden pH kasvaa, joka aktivoi kallikreiniensyymiä. Kallikreini halkaisee bradykiniinin kininogeenistä, joka sitoutuu verisuonen seinämiin, avaten solujen välisiä liitoksia. Liitosten avaaminen lisää nesteiden virtausta kudokseen ja sallii leukosyyttien tulon tulehduspaikalle. Bradykiniini on merkittävä kivun ja turvotuksen aiheuttaja. Sen vaikutus loppuu kahden sitä hajottavan entsyymin kinaasin I ja II vaikutuksesta.^{2,4}

Komplementin reaktiketjun tuloksena vapautuva C5-tekijän pilkkoutumistuote C5a on vahvasti kemotaktinen ja tulehdusreaktion yksi tärkeimmistä tuotteista.

C5:n pilkkoutumista edeltää C-reaktiivisen proteiinin ja lektiinin reagointi bakteerien polysakkaridien kanssa, jolloin aktivoituu komplementin klassinen tai lektiiniaktivaatiotie. C-reaktiivinen proteiini (CRP) hillitsee tulehdusreaktiota voimistamalla oikotieaktivaatiota C3 tasolle. CRP kuitenkin ohjaa voittuneiden solujen fagosytoosia.⁴

Tulehdusreaktioon osallistuu myös hyytymisjärjestelmä, jonka toimintaan kallikreiini liittyy. Fibriniitit hyytyvät, joka rajoittaa bakteerien kulkua tulehduspaikalle. Jotkin bakteerit pystyvät kuitenkin hajottamaan tai estämään veren hyytymistä.⁴

Komplementti aktivoituu tulehdusreaktion ensimmäisessä vaiheessa ilman vasta-aineiden aktivaatiota. Komplementin lisäksi neutrofiilit, syöttösolut ja eosinofiilit reagoivat minuuteissa tulehdusreaktion alkamisesta. Ne pysyvät aktiivisina muutamia tunteja. Ensimmäinen vaihe pystyy yleensä tuhoamaan tunkeilijat. Tämän lisäksi ehtivät lymfosyytit tuottamaan vasta-aineita. Vasta-aineiden tuotanto tarkoittaa immunologisen muistin muodostumista. Jos sama mikrobi on myöhemmin vastuussa tulehduksesta, lymfosyyttien tuottamat vasta-aineet auttavat taistelussa patogeenia vastaan. Vasta-aineiden olemassaolo voimistaa mikrobien fagosytointia ja komplementin aktivoitumista.⁴

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Bakteerisolujen kasvatus

Bakteerisolujen kasvatusliuoksena käytettiin Luria- Bertanin- (LB)-mediumia. Koeputkeen pipetoitiin 5 ml LB-mediumia ja 100 µl -70 °C:ssa säilytettyä *E.coli* -bakteerin K12 p(luxABCDEamp)-valmistetta. Inkubointi tapahtui + 37 °C:sta ravistelulla, 250 rpm. Bakteerisuspension kasvua seurattiin mittaamalla absorbanssi spektrofotometrillä (Shimadzu) aallonpituudella 620 nm. Bakteeria kasvatetaan, *E.coli* -bakteerin kasvukäyrän eksponentiaalisen vaiheen alkuosaan, jolloin OD 0,1-0,3. *E. coli* -suspension OD bakteerisolujen pitoisuuden funktiona liitteessä 3. funktiona Suspensiota sentrifugoitii 1000 g,

10 minuutin ajan, jonka jälkeen solut resuspensoitiin haluttuun tilavuuteen gHBSS puskuriin.

3.2 Veren käsittely ja valkosolujen puhdistus

Verinäytteet otettiin vapaaehtoisilta luovuttajilta korkeintaan muutamaa tuntia ennen valkosolujen puhdistusta. Riippuen veren määrän tarpeesta, verinäytteet otettiin EDTA-putkiin, jossa veri ei hyydy ja tarvittaessa putkiin, joissa veren annettiin hyytyä seerumin talteenottoa varten. Seuraavissa kappaleissa käsitellään tarkemmin verinäytteen käsittelyn eri vaiheita.

3.2.1 Punasolujen lyysaus

Punasolujen lyysausta eli hajotusta varten valmistettiin 0,8 % ammoniumkloridiliuos 10 x:sta ammoniumkloridistokista. Koeputkeen lisättiin veri, ammoniumkloridi ja steriiliä tislattua vettä niin, että lopullinen laimennos oli 1/10 ja annettiin liuoksen seistä 15 minuuttia huoneenlämmössä. Lyysatyt punasolut sentrifugoitiin koeputken pohjalle 1700 rpm noin 10 minuutin ajan.⁷ Punasolujen debris imettiin vesi-imulla huolellisesti. Pelletti resuspensoitiin gHBSS-puskuriin, haluttuun valkosolujen pitoisuuteen.

3.2.2 Seerumin talteenotto

Verinäytteen annettiin seistä huoneenlämmössä 45 minuutin ajan, jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin 7 minuuttia 1700 rpm. Putkeen syntynyt ylempi faasi (seerumi) pipetoitiin talteen eppendorf-putkiin.⁷ Yhden putken seerumitilavuus oli noin 50 µl. Seerumi säilytettiin pakasteena -70 °C:ssa.

3.3 Valkosolujen värjäysmenetelmät ja laskeminen

Solut värjättiin lisäämällä eppendorf-putkeen 250 µl kristalliviolettiä ja 25 µl EDTA-putken verta. Seosta pipetoitiin 10 µl Bürker-Türkin laskukammioille.

Bürkerin-Türkin laskukammion tilavuus on $1/10 \text{ mm}^3$. Solut laskettiin neliskulmaisista ruuduista keskivahvalla objektilla ja heikolla okulaarilla.⁸ Tässä tapauksessa 10x:lla objektiivilla.

Solujen lukumäärä saatiin laskemalla molempien kammioiden solujen lukumäärän keskiarvo ja kertomalla tulos 10^5 . Saatu tulos oli valkosolujen lukumäärä per ml verta.

Verinäytteestä tehtiin myös aluslasivalmiste eli diffi. Pieni pisara verta pipetoitiin puhtaalle alustalle hiottua peitin- tai aluslasia käyttäen. Aluslasia painettiin pöytää vasten ja samalla toisella kädellä painettiin hiottulasi veripisaran päälle, niin että pisara leviää lasin reunaa pitkin. Lasia vedetään kevyesti, jotta veri levittyi aluslasille ohueksi kerrokseksi.⁸

Diffi värjättiin Giemsa-värjäyksellä. Ilmakuivattua diffiä kiinnitettiin aluksi metanolissa 3 minuuttia, minkä jälkeen levy upotettiin väriliuokseen (koostumus liitteessä 1) 15 minuutiksi, jonka jälkeen lasi huuhdottiin tislattulla vedellä. Levy kuivattiin imupaperilla.⁸ Soluista laskettiin valomikroskoopilla, 100x:lla objektiivin suurennoksella 200 leukosyyttiä, johon sisältyi myös neutrofiilien lukumäärä, joka voitiin myös määrittää prosentuaalisesti.

3.4 Puskurit

Bakteerisolut sekä leukosyytit suspensoitiin gHBSS ja HBSS (Hank's Balanced salt solution)⁹ puskureihin. Pääasiallisesti käytettiin puskurina gHBSS-puskuria, jossa on 0,1 mg gelatiinia HBSS-puskurissa.¹⁰ Gelatiini estää solujen aggregoitumista, jolloin bioluminenssisignaali yleensä kasvaa. Puskureiden koostumus on liitteessä 2.

Verinäyte putkissa lisäaineena käytettiin EDTA:ta eli etyylidiamiinitetraetikkahappoa.¹¹ EDTA:n tehtävä on estää verta hyytymästä, käsittelyä odottavissa putkissa. EDTA kelatoi veren raudan muodostamalle sen kanssa kompleksiyhdisteen.

3.5 Sytokalasiini D

Aktiinisäikeiden polymerisaation voi estää sieniperäisillä toksiineilla, sytokalasiineilla.¹² Sytokalasiini D on hyvin toksininen yhdiste, jota käytetään polymerisaatiotutkimuksissa. Sytokalasiini D sitoutuu aktiinisäikeeseen, estäen sen alayksiköiden yhdistymisen sekä dissosiaation.¹³ Sytokalasiini D:n molekyyli rakenne kuvassa 5.



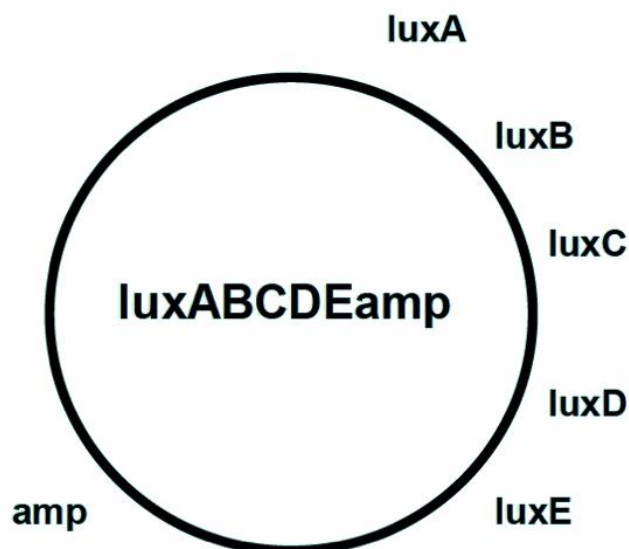
Kuva 5. Sytokalasiini D¹³

3.6 Luminesenssin mittaus

Luminesenssi mitattiin luminometrilla Berthold LB 940 Mithras. Laitteen ohjelmana käytössä oli Mikrowin 4.41. Bioluminenssisignaalin luminometri antoi RLU (Relative Light Unit) yksikössä.¹⁴ Parametreina käytettiin taulukossa 2 esitettyjä arvoja. Kuoppalevyn yhteen kaivoon pipetoitiin yhteensä 200 µl reagensseja (bakteerisuspensio, leukosyyttisuspensio ja seerumi). Kuoppiin, joihin ei tullut bakteri-, tai leukosyyttisuspensiota, korvattiin vastaava tilavuus puskurilla.

3.6.1 Bioluminoiva plasmidi luxABCDEamp

Escherichia coli -rekombinanttiin on transformoitu bakteriolusiferaasientsyymiä ilmentävä luxABCDEamp geeni. Lusiferaasientsyymioperoni (luxABCDE) tuottaa soluja, jotka emittoivat bioluminesenssisäteilyä. Bioluminesenssi on suoraan verrannollinen elävien solujen määrään.¹⁵ Tässä työssä on mitattu bakteerisolujen viabiliteettia mittaamalla inkuboituja mikrobeja ja neutrofiilejä 96-kuoppalevyllä. Bioluminesenssi mitataan ajan funktiona, jolloin saadaan aikaan kineettinen käyrä inkuboinnin kulusta.



Kuva 6. Bioluminoiva plasmidi luxABCDEamp⁹

Taulukko 2. Luminesenssin mittausparametrit

Kokonaisaika	20000 s
Kierrosaika	60,0 s
Laskenta-aika	0,50 s
Lämpötila	37,0 °C

3.7 Bakteerisolujen maljaus

Maljauksen tarkoituksena oli todentaa bakteerisolujen kuoleminen. Ennen maljausta tehtiin luminometrilla ajo, joissa oli mukana sekä neutrofiilit, seerumi, bakteerisolut ja sytokalasiini. Neutrofiilit, seerumi ja bakteerisolut suspensoitiin sekä gHBSS että HBSS puskureihin. Leukosyyttien pitoisuus $6,2 \times 10^6$ solua/ml verta ja bakteerien pitoisuus $0,25 \times 10^7$. Ajon jälkeen bakteerisuspensiota pipetoitiin 100 μ l näyte kuoppalevyltä ja tehtiin laimennokset 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ja 1/ 100000 (100 μ l solususpensiota ja 900 μ l uutta LB-mediumia) LB-mediumiin. Maljoille laimennokset pipetoitiin kahdessa eri tilavuudessa 100 μ l ja 20 μ l. Heti yhdelle maljalle pipetoinnin jälkeen, bakteerisuspensio levitettiin elatusaineen pinnalle tasaiseksi kerroksi rikkomatta elatusaineen pintaa. Elatusaineena maljauksessa käytettiin LA-mediumia, jonka koostumus liitteessä 2. Maljoja kasvatettiin vuorokausi $+37$ °C:sta. Kasvatuksen jälkeen pesäkkeet laskettiin.

4 KOEAJOT JA PÄÄTELMÄT

4.1 Leukosyyttien laimennussarjan tappokapasiteetin mittaaminen

Bakteerisolut kasvatettiin ja käsiteltiin kuten kappaleessa 3.1 on selvitetty. Lopullinen absorbanssi, jolloin kasvatus lopetettiin oli 0,13. Bakteerisolususpensio resuspensoitiin gHBSS puskuriin niin, että lopullinen bakteerien pitoisuus laimennoksessa oli $1,5 \times 10^7$ solua/ml ja 15×10^3 solua/ 100 μ l eli kuopassa oleva solumäärä. Verta käytettiin 2,5 ml, josta punasolut lyyssattiin lisäämällä 10 ml 0,8 % NH_4Cl :a. Puhdistettujen leukosyyttien lukumäärä laskettiin Bürker-Türkin laskukammioilta ja saatiin pitoisuudeksi $7,6 \times 10^6$ solua/ml verta. Leukosyyttejä lopullisessa suspensiossa oli $2,5 \times 7,6 \times 10^6$ solua/ml. Leukosyyttipitoisuus jätettiin korkeaksi, koska suspensiosta tehtiin useita laimennoksia. Leukosyyttisuspensiosta tehtiin seuraava laimennossarja: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048 ja 1/4096. Reagenssina käytettiin myös 1 % seerumia. Kaikki reagenssit pipetoitiin 96-

kuoppalevylle kaaviossa 1 esitettyssä järjestyksessä. Kuoppiin pipetoitiin 100 µl bakteerisuspensiota, 100 µl leukosyyttisuspensiota ja 2 µl seerumia. Kuoppiin, joihin ei tullut leukosyyttejä, korvattiin tilavuus samalla määrällä puskuria. Kuoppalevyltä mitattiin reaktiot reaaliaikaisesti, mistä saatiin bioluminesoivan bakteerin viabiliteettia kuvaavat käyrät (kuvio 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B												
C	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s
D												
E	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N
F												
G	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N
H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Kaavio 1. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevylle 1

B=bakteerit

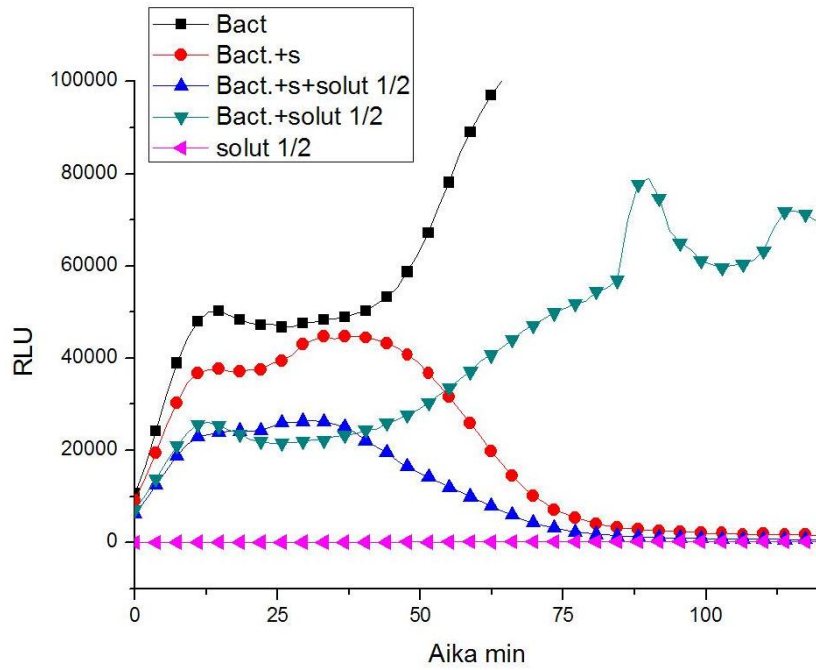
B+s=bakteerit ja seerumi

B+s+N=bakteerit, seerumi ja valkosolut

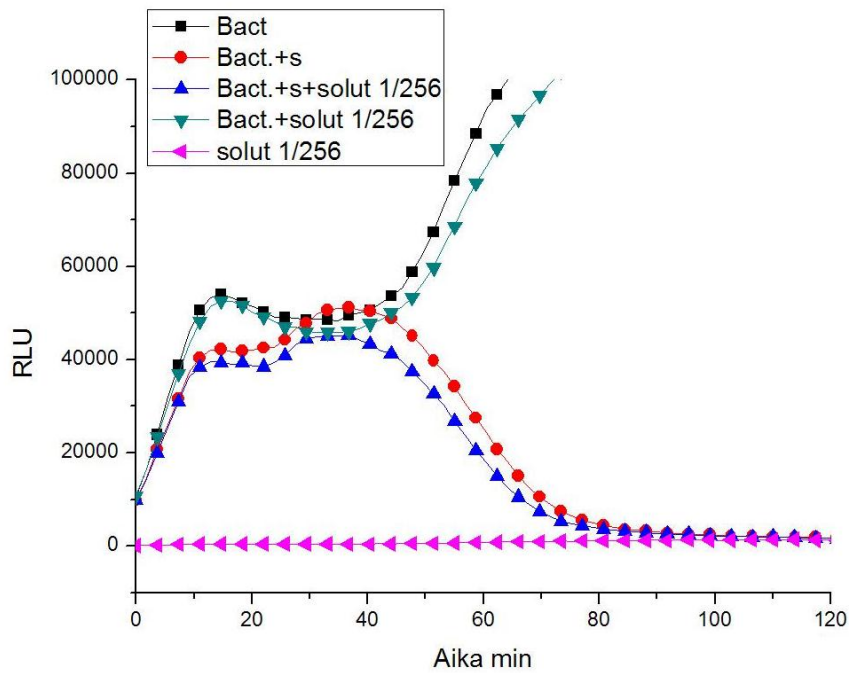
B+N=bakteerit ja valkosolut

Laimennussarja (sarakkeen numero=laimennos sarakkeessa):

1=(1/2), 2=(1/4), 3=(1/8), 4=(1/16), 5=(1/32), 6=(1/64), 7=(1/128), 8=(1/256),
9=(1/512), 10=(1/1024), 11=(1/2048), 12=(1/4096)



Kuvio 1. Bakterisolujen viabiliteetti 1



Kuvio 2. Bakterisolujen viabiliteetti 2

Kuviossa 1 nähdään miten seerumia ja leukosyyttejä sisältävä käyrä lähtee mukailee seerumikäyrää, kun leukosyyttien tappokyky heikkenee. Vertailemalla kuvioita 1 ja 2 nähdään, miten leukosyyttipitoisuuden laskiessa käyrät, joissa nämä solut ovat mukana, lähestyvät bakteerisolukäyrää. Tämä tarkoittaa, että neutrofiilit eivät yksinään pysty enää bakteerisoluja tappamaan. Myös käyrä, joka esittää leukosyyttien ja 1 % seerumin tappokykyä, on lähes samanlainen kuin seerumin tappokykyä kuvaava käyrä.

4.2 Optimaalisen seerumipitoisuuden määrittäminen

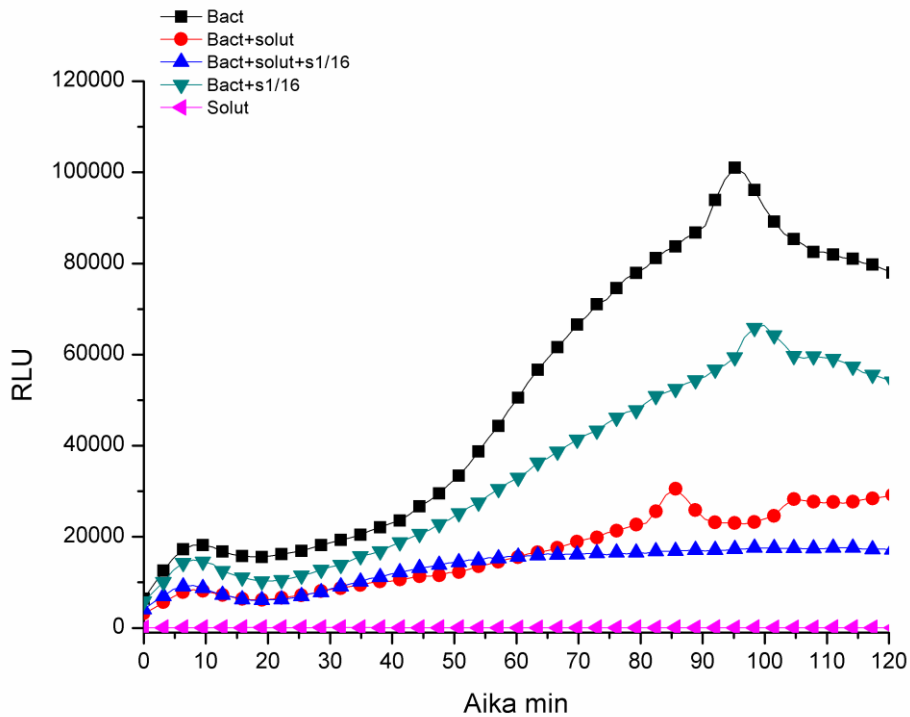
Bakteerisoluja kasvatettiin kunnes suspension mitattu absorbanssi oli saavuttanut OD:n 0,245, jolloin suspensiossa oli $6,5 \times 10^7$ bakteerisolua. Suspensiosta tehtiin laimennos 1/4 gHBSS:n niin, että bakteerien pitoisuus oli $1,6 \times 10^7$ solua/ml ja kuopissa bakteerisolujen lukumäärä reaktioiden alussa oli 30×10^3 solua. Leukosyytit puhdistettiin 2,5 ml:sta EDTA verta ja resuspensoitiin 2 ml:aan gHBSS puskuria, jolloin saatiin laimennos 1/4. Puskuriin resuspensoidussa leukosyyttisuspensiossa neutrofiilejä oli $3,2 \times 10^6$ solua/ml. Solususpensio laimennettiin 1/2, jolloin kuopissa oli neutrofiilejä noin 2000.

Seerumi otettiin pakasteesta (-70 °C:sta) ja laimennettiin seuraavasti: 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ja 1/32. Seerumia pipetoitiin kuoppiin 20 µl, jolloin pitoisuudet kuopissa olivat 5 %, 2,5 %, 1,25 %, 0,6 %, 0,3 % ja 0,15 %. Kuoppiin pipetoitiin 90 µl bakteerisuspensiota, 100 µl leukosyyttisuspensiota ja 10 µl seerumia. Pipetointi järjestys esitetty kaaviossa 2. Merkinnät kaaviossa ovat kuten edellä. Kuoppalevytä mitattiin bioluminenssi, joka on esitetty ajan suhteen kuviossa 3.

Sopivaksi seerumipitoisuudeksi todettiin 0,3 % pitoisuus, mikä riittää opsonoimaan bakteerisolut, mutta ei yksinään tapa soluja. Oponoinnilla saatiin tehostettua neutrofiilien fagosytoosia.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Seerumin laimennos	1		1/2		1/4		1/8		1/16		1/32	
A	B		B		B		B		B		B	
B												
C	B + N		B + N		B + N		B + N		B + N		B + N	
D												
E	B+s+N		B+s+N		B+s+N		B+s+N		B+s+N		B+s+N	
F												
G	B + s		B + s		B + s		B + s		B + s		B + s	
H	N		N		N		N		N		N	

Kaavio 2. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä 2



Kuvio 3. Optimaalisen seerumpitoisuuden määrittäminen graafisesti

Taulukko 3. Elävien bakteerisolujen määrä seerumipitoisuuden vaihdellessa

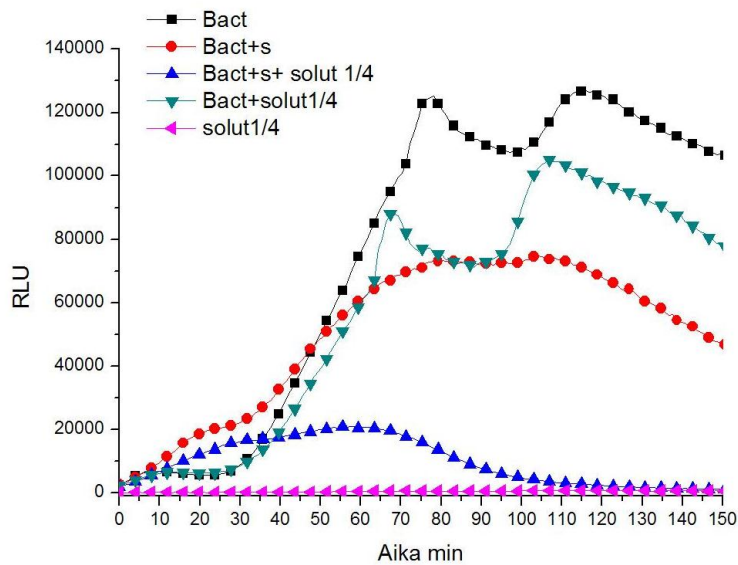
Seerumipitoisuus	5 %		2,5 %		1,25 %		0,6 %		0,3 %	
	RLU x10 ³	solut x10 ³	RLU x10 ³	solut x10 ³	RLU x10 ³	solut x10 ³	RLU x10 ³	solut x10 ³	RLU x10 ³	solut x10 ³
Bakteerit	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
Neutrofiilitappo	30	300	30	300	30	300	30	300	30	300
Seerumitappo	0	0	0	0	25	250	20	200	50	500
Neutrofiili+ seerumitappo	0	0	0	0	0	0	0	0	10	100

Neutrofiilien lukumäärä reaktioissa oli vakio 2000 solua/kuoppa. 5 % ja 2,5 % seerumi on tappanut kaikki bakteerisolut, kuten taulukosta 3 nähdään, jossa elävien bakteerien lukumäärä on laskettu ajan hetkellä 90 minuuttia. Seerumi välitteisestä tappamisesta on vastuussa MAC-kompleksi, jonka komponentit tarttuvat bakteerisolun pintaan.¹⁶ 0,3 % seerumi ei enää tapa soluja, vaan opsonoi komplementin komponenteilla bakteerisolujen pinnalla, tehostaen neutrofiilien tappamista. Elävien bakteerisolujen lukumäärät esitetty taulukossa 3.

4.3 Optimaalinen seerumipitoisuus ja neutrofiilien tappokapasiteetti

Bakteerisoluja kasvatettiin, kuten edellisissäkin ajovalmisteluissa. Kasvatus lopetettiin kunnes OD oli 0,3, jolloin bakteeripitoisuus ml:ssa 10×10^7 . Soluja laimennettiin puskuriin 1/4, jolloin suspension solupitoisuus oli $2,5 \times 10^7$. Bakteerisoluja kuopassa, reaktion alussa oli $2,5 \times 10^4$. Leukosyytit puhdistettiin tälläkin kertaa 2,5 ml:sta EDTA-verta, lysoimalla punasolut verestä. Leukosyytit laskettiin Bürker-Türkin kammiolta, jolloin saatiin leukosyyttipitoisuudeksi $6,5 \times 10^6$ solua/ml verta. Lopullisessa reaktiossa käytetyssä leukosyyttisuspensiossa $16,3 \times 10^6$ solua/ml, josta neutrofiilejä laskettiin olevan 9×10^6 solua/ml. Leukosyyttisuspensio laimennettiin kuten kappaleessa 4.1 on esitetty. Neutrofiilien määrät kuopissa eri laimennoksissa on esitetty taulukossa 4. Bakteerisuspensiota pipetoitiin kuoppiin 90 µl, leukosyyttejä 100 µl ja seerumia (pitoisuus 0,3 %) 10 µl. Pipetointijärjestys esitetty kaaviossa 1.

Kuviosta 5 nähdään miten seerumi ei tapa bakteerisoluja, mutta seerumin lisäys kuoppiin, joissa on bakteerisolujen lisäksi neutrofiilejä, tehostaa fagosytoosia (bakteerisolujen kuolleisuus vähäisempää kuopissa, joissa reagenssina bakteerisolut ja neutrofiilit). Kuviossa 4 on sama seerumipitoisuus (0,3 %) kuin kuviossa 5, mistä nähdään, että eri seerumierissä on laadullisia eroja.



Kuvio 4. Optimaalisen seerumipitoisuuden vaikutus, kun neutrofiilien lukumäärä on 2×10^3

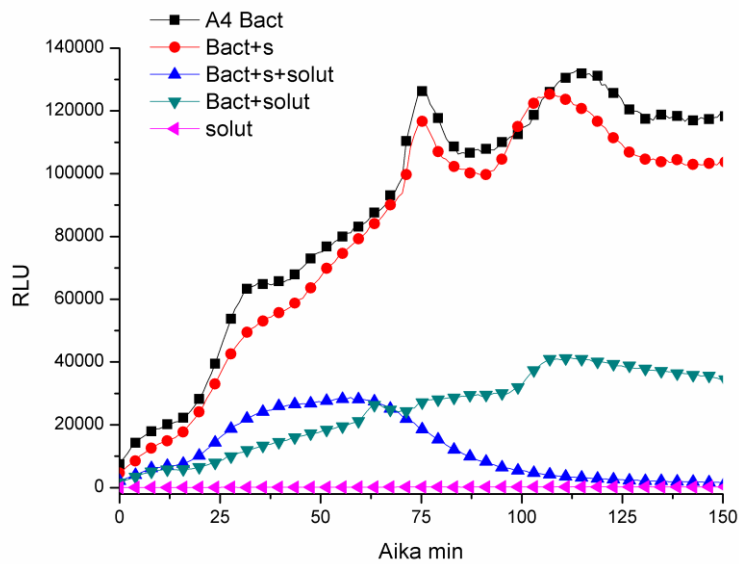
Elävien bakteerisolujen lukumäärät laskettiin käyttämällä seuraavaa muuntokaavaa.

$RLU \times 10 =$ elävien bakteerisolujen lukumäärä

Taulukossa 5 ja 6 on esitetty leukosyytilaimennosta vastaava RLU ja elävien bakteerisolujen lukumäärä, kun reaktio oli jatkunut 90 minuuttia.

Taulukko 4. Neutrofiilien lukumäärä

Laimennos	Neutrofiilejä
1/2	4000
1/4	2000
1/8	1000
1/16	500
1/32	250
1/64	125
1/128	60
1/256	30
1/512	15
1/1024	8
1/2048	4
1/4096	2

Kuvio 5. Optimaalisen seerumpitoisuuden vaikutus, kun neutrofiilien lukumäärä on 4×10^3

Taulukko 5. Elävien bakteerisolujen lukumäärä 1

Leukosyyttien laimennos	1:2		1:4		1:8		1:16		1:32	
	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$
Bakteerit	115	1150	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
Neutrofiilitappo	60	600	70	700	90	900	100	1000	100	1000
Seerumitappo	60	600	60	600	60	600	60	600	60	600
Neutrofiilitappo+ seerumitappo	5	50	10	100	10	100	30	300	40	400

Taulukko 6. Elävien bakteerisolujen lukumäärä 2

Leukosyyttien laimennos	1:64		1:128		1:256		1:512		1:1024	
	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$	RLU $\times 10^3$	solut $\times 10^3$
Bakteerit	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
Neutrofiilitappo	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
Seerumitappo	60	600	60	600	60	600	60	600	60	600
Neutrofiilitappo+ seerumitappo	40	400	40	400	40	400	50	500	60	600

Elävien bakteerisolujen lukumäärät nousevat pääsääntöisesti neutrofiilien lukumäärän pudotessa (taulukot 5 ja 6). Opsonoidut bakteerisolut kuolevat yhä tehokkaimmin. Kaikkien bakteerisolujen kuolemiseen kuluva aika pitenee neutrofiilien lukumäärän vähetessä. Neutrofiilien lukumäärän ollessa 4×10^3 kaikki bakteerisolut ovat kuolleet 100 minuutissa. Kun neutrofiilien lukumäärä on laskenut puolella, aikaa kuluu reaktioon 110 minuuttia. Laimennoksessa 1/32 neutrofiilien lukumäärä on enää 125, jolloin reaktion päättymiseen kuluu jo yli 150 minuuttia.

Tässä koejärjestelyssä käytetyn seerumin tappokapasiteetti oli huomattavasti parempi kuin edellisessä järjestelyssä olevan 0,3 % seerumin tappokapasiteetti. Tässä tapauksessa seerumin komplementti tappoi tehokkaasti bakteerisoluja myös ilman neutrofiilejäkin.

Neutrofiilien lukumäärä, verrattuna bakteerisolujen lukumäärään kuopissa, on hyvin pieni. Esimerkiksi laimennoksessa 1/4 oli 2×10^3 neutrofiilia. Tämä neutrofiilipitoisuuden tappokapasiteetti oli 3×10^5 (RLU=30000) bakteerisolua. Tämä viittaa siihen, että neutrofiilit tappaisivatkin bakteereja solunulkoisesti eksosytoimalla muun muassa vetyperoksidia solujen päälle, ja fagosytoivan näin ollen tehokkaammin kuolleita soluja.

4.4 Reagenssien pipetointijärjestyksen vaihtaminen

Bakteerisoluja kasvatettiin kuten edellä. Bakteerisoluja laimennettiin 1/5, jolloin pitoisuus oli $2,5 \times 10^7$ solua /ml. Bakteerisolujen määrä reaktion alussa $2,5 \times 10^4$ solua/kuoppa. Myös leukosyytit puhdistettiin edellisissä kappaleissa kuvatuilla menetelmillä. Leukosyytti pitoisuudeksi 1 ml:ssä verta saatiin 7×10^6 solua. Neutrofiilejä leukosyyteistä oli 61 %. Lopullisessa laimennoksessa kuoppaa kohden oli 2×10^3 neutrofiilia. Seerumi laimennettiin samaan pitoisuuteen kuin edellisessä koeajossa. Pitoisuus kuopissa oli 0,3 %.

Reagenssit puoleen kuopista (kuopat 1-6) lisättiin seuraavassa järjestyksessä: Neutrofiilit, seerumi ja viimeiseksi bakteerisolut. Toiseen puoleen kuopista lisättiin ensimmäisenä bakteerisolut ja viimeiseksi valkosolut. Pipetointijärjestys on esitetty kaaviossa 3.

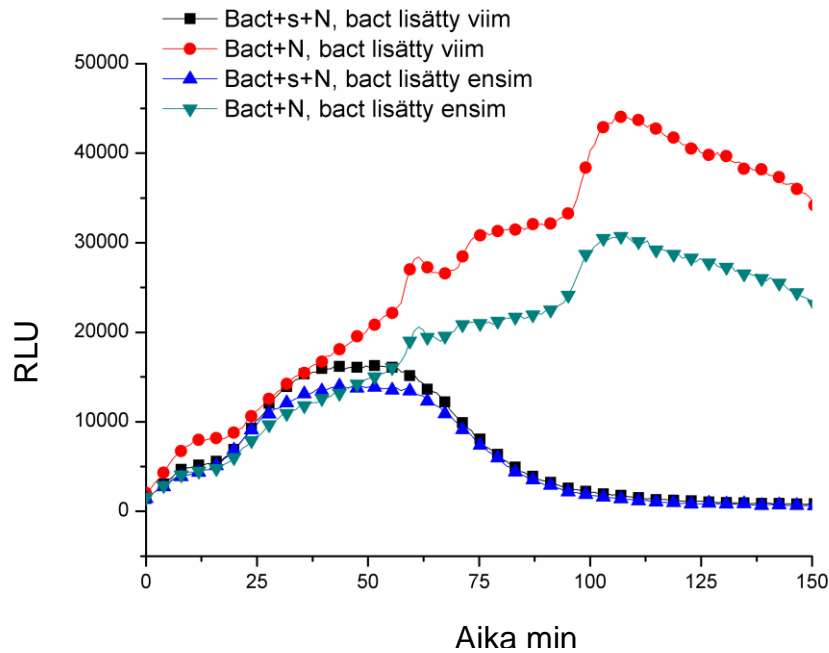
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B												
C	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s
D												
E	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N
F												
G	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N
H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Kaavio 3. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä 3. Sarakkeissa 1-6 pipetoitiin bakteerisolut ensimmäisinä. Sarakkeissa 7-12 pipetoitiin bakteerisolut viimeiseksi.

Reagenssien järjestyksen vaihtamisella oli tarkoitus osoittaa, onko neutrofiilien kiinnittymisellä kuoppien seiniin fagosytointia tehostava vaikutus. Huomattavaa eroa pipetointi järjestyksen vaihtamisella ei kuitenkaan havaittu olevan, mikä viittaisi jälleen solunulkoiseen tappamiseen. Taulukossa 7 on elävien solujen lukumäärää vertailtu eri pipetointijärjestyksien kesken ja tilanne on graafisesti havainnollistettu esimerkkikuviossa 6. Elävien bakteerisolujen lukumäärät on laskettu hetkestä, jolloin reaktio on jatkunut 90 minuuttia.

Taulukko 7. Pipetointijärjestyksen vaihtamisen vaikutus fagosytoosiin

	RLUx10 ³	Elävät <i>E.coli</i> solut x10 ³
Bakteerit(lisätty viimeisenä)	100	1000
Seerumitappo	100	1000
Neutrofiilitappo	30	300
Neutrofiilitappo+seerumi	5	50
Bakteerit(lisätty ensimmäisenä)	100	1000
Seerumitappo	100	1000
Neutrofiilitappo	20	200
Neutrofiilitappo+seerumi	6	60



Kuvio 6. Reagenssien pipetointijärjestyksen muuttamisen vaikutus

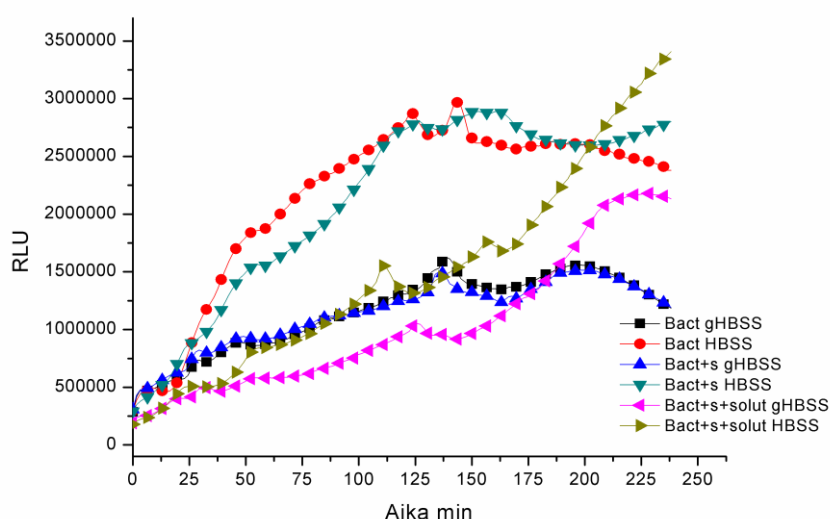
4.5 Puskureiden vaikutus

Bakteerisoluja kasvatettiin kunnes mitattu absorbanssi oli 0,1, jolloin suspension bakteerisolupitoisuus oli $2,5 \times 10^7$ solua/ml. Solut suspensioitiin sekä gHBSS-, että HBSS-puskureihin. Leukosyytit puhdistettiin ja laskettiin, jolloin lopullinen neutrofiilipitoisuus suspensiossa oli $1,9 \times 10^6$ solua /ml. Samoin leukosyyttisolut suspensioitiin sekä gHBSS-, että HBSS-puskureihin. Seerumi laimennettiin 1/16 osaan, jolloin pitoisuus oli 0,3 % eli kappaleessa 4.2 kuvatus koeajan perusteella valittu optimaalinen pitoisuus. Laimennus tehtiin molempiin puskureihin. Puolet reaktioista tehtiin gHBSS puskurissa ja puolet HBSS puskurissa. Kuoppiin pipetoitiin 90 μ l bakteerisuspensiota, 100 μ l leukosyyttisuspensiota ja 10 μ l 0,3 % seerumia. Kuoppiin, joihin ei lisätty bakteeri-, tai leukosyyttisuspensiota korvattiin samalla tilavuudella puskuria. Kaaviossa 4 on esitetty pipetointikaavio, jossa sarakkeet 1-6 puskurina oli gHBSS ja 7-12 puskurina oli HBSS.

HBSS puskurin käyttö näyttää nostavan mitattua signaalia, minkä oletetaan johtuvan solujen kiinnittymisestä kuoppien reunoihin sekä niiden aggregoitumisesta suspensiossa. Kuviossa 7 on esitetty miten puskurit ovat vaikuttaneet signaaliin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B												
C	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s	B + s
D												
E	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N	B+s+ N
F												
G	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N	B + N
H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Kaavio 4. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevyille 4. Sarakkeet 1-6 puskurina gHBSS ja sarakkeissa 1-7 puskurina HBSS.



Kuvio 7. Puskureiden vaikutus signaaliin

4.6 Maljaus

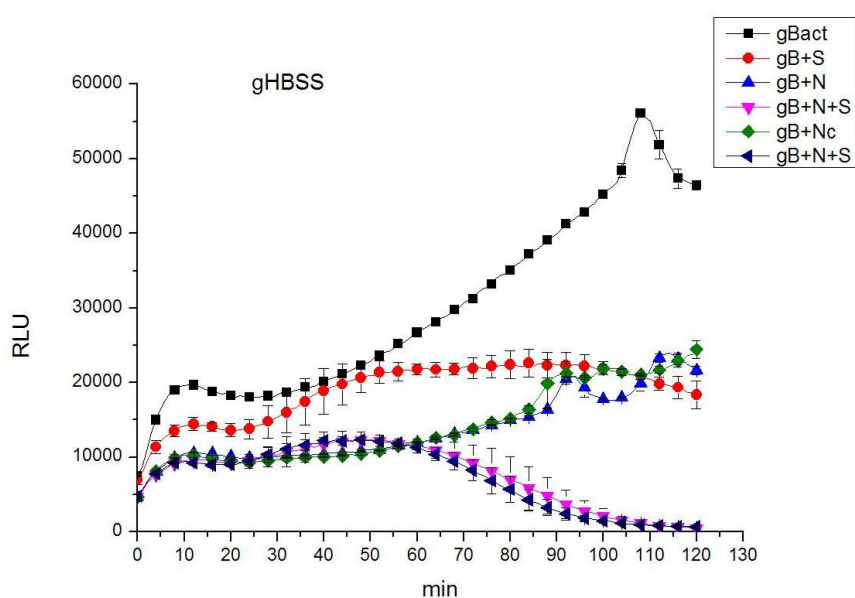
Bakteereja kasvatettiin kunnes OD oli 0,1, jolloin bakteerisolujen pitoisuus oli $2,5 \times 10^7$ solua/ml. Leukosyytit puhdistettiin kahdesta 2,5 ml EDTA-verinäytteestä erillisiin putkiin ja resuspensoitiin 2,5 ml gHBSS puskuria ja 2,5 ml HBSS puskuria. Sytokalasiini D laimennettiin pitoisuuteen 10 $\mu\text{mol/l}$ (10 μl sytokalasiini D ja 150 μl HBSS). Seerumi laimennettiin 1/10 (50 μl ja 450 μl HBSS/gHBSS) ja lisättiin kuoppiin 10 μl , jolloin seerumin pitoisuus reaktioissa 0,4 %. DMSO laimennettiin 1/16, samaan pitoisuuteen kuin sytokalasiini D. Sytokalasiini D oli säilytetty DMSO:ssa pakkasessa. Ennen maljausta reagenssit pipetoitiin 96-

kuoppalevylle taulukon 12 pipetointikaavion mukaisesti, niin että bakteerisuspensiota pipetoitiin 100 µl, leukosyyttisuspensiota 100 µl, seerumia 10 µl, 10 µl sytokalasiinia tai 10 µl DMSO:ta. Kuoppiin, joihin ei lisätty bakteerisuspensiota, leukosyyttisuspensiota tai seerumia, lisättiin tilalle sama tilavuus gHBSS puskuria tai HBSS puskuria. Pipetointijärjestys esitetty kaaviossa 5.

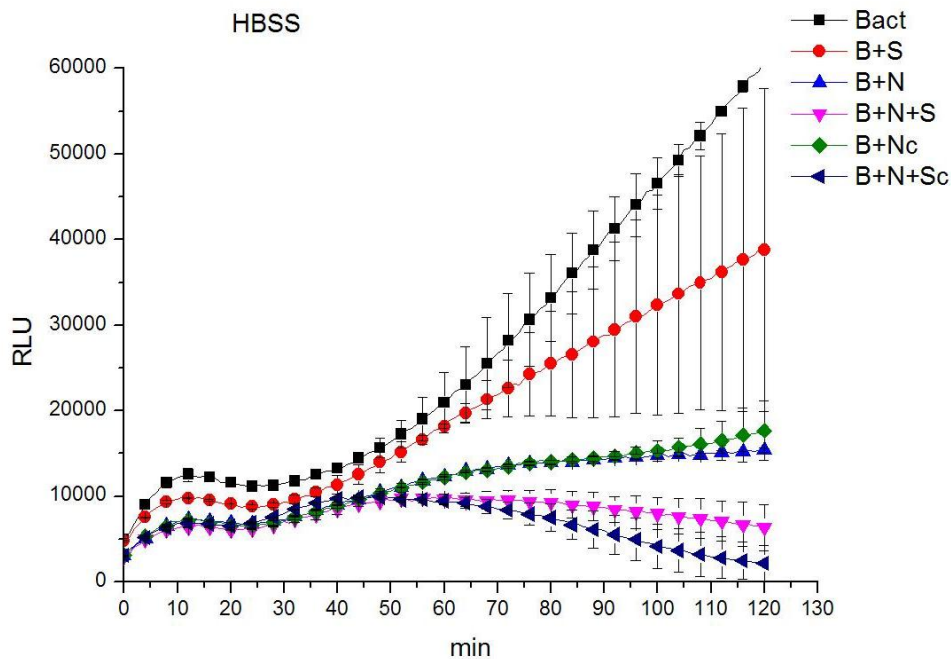
Bioluminesenssi mitattiin bakteerisoluiista, kunnes ajo oli kestänyt 120 minuuttia. Heti ajon keskeytyksen jälkeen kuopista otettiin näytteet ja laimennettiin sekä maljattiin LA-maljoille kappaleessa 3.7 esitetyllä menetelmällä. Kuviossa 8 ja 9 on esitetty maljausta edeltävä ajo gHBSS ja HBSS puskureissa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s	B+s
C	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N	B+N
D	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N	B+s+N
E	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc	B+N+Sc
F	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc	B+N+s+Sc
G												
H												

Kaavio 5. Reagenssien pipetointijärjestys 96-kuoppalevylle 4



Kuvio 8. Maljausajo gHBSS puskurissa



Kuvio 9. Maljausajo HBSS puskurissa

Maljoilta lasketut solumäärät vaihtelivat hyvinkin paljon. Eri laimennuksista saatiin eroavuuksia, jolloin maljauksen tuloksista ei voida suoraan todentaa reaktioissa tapahtuvaa bakteerisolujen kuolemista. Bakteerisolujen kuolemista kyllä tapahtuu, mutta reaktioita ei saada pysäytettyä ennen maljausta, jolloin pitoisuudet eri laimennoksissa vaihtelevat. Tässä koejärjestelyssä näytteet otettiin kahden tunnin kuluttua reaktion aloittamisesta. Reaktiot näytteissä etenevät edelleen maljoilla, mikä vaikeuttaa bakteerisolujen pitoisuuden määrittämistä tietyllä hetkellä. Täysin reaktio saattaa pysähtyä vasta suurissa laimennoksissa. Maljauksen tulokset ovat liitteessä 4.

Maljausreaktioihin lisättiin reagenssina myös sytokalamiini D:tä, joka on sieniperäinen toksiiini. Sytokalamiini D estää aktiinisäikeiden muodostumista ja sitä kautta neutrofiilin kuroutumisen bakteerisolun ympärille. Tämä ilmiö estää neutrofiilejä fagosytoimasta bakteereja. Elävien bakteerisolujen määrä ei kuitenkaan noussut kovinkaan paljon, mikä viittaisi neutrofiilien pääasiassa

tappavan bakteerisoluja solunulkoisesti. Elävien bakteerisolujen lukumäärät ennen maljausta ovat laskettu taulukkoon 8.

Taulukko 8. Elävien bakteerisolujen määrä ennen maljausta

gHBSS	RLUx10³	Elävät <i>E.coli</i> solut x10³
Aika	90 min	90 min
B	40	400
B+s	20	200
B+N	20	200
B+Nc	15	150
B+N+s	5	50
B+N+sc	2,5	25
HBSS		
B	40	400
B+s	25	250
B+N	12,5	125
B+Nc	12,5	125
B+N+s	7,5	75
B+N+sc	5	50

Taulukossa mustalla tekstillä on esitetty gHBSS- ja sinisellä tekstillä HBSS-puskurissa olevien elävien bakteerisolujen lukumäärät.

5 YHTEENVETO

Neutrofiilien sekä seerumin pitoisuus on kääntäen verrannollinen bioluminesoivien (elävien) bakteerisolujen lukumäärään. Veren soluton osa seerumi sisältää komplementin, jonka komponentit joko tappavat bakteerisolun tai opsonoivat sen tarttumalle solun pintaan. Seerumin pitoisuudella reaktioissa oli ratkaiseva merkitys. Suurena pitoisuutena (5 % - 1 %) seerumi tappaa solut ilman neutrofiilejäkin. Jos pitoisuutta lasketaan (0,6 % - 0,3 %) seerumin komplementti opsonoi solut ja neutrofiilien fagosytoosi tehostuu, mutta ei ilman

neutrofiilejä pysty enää tappamaan bakteerisoluja. Tämä huomattiin esimerkiksi seerumikäyristä, jotka nousivat tietyn ajan jälkeen samalle tasolle kuin bakteerisolukäyrät. Reaktioissa, joissa seerumin lisäksi mukana oli myös neutrofiilisolut, käyrät laskivat nollatasoon samassa ajankohdassa, kuin seerumikäyrät alkoivat nousta. Toisaalta, seerumierän laadulla oli myös vaikutusta tappotehokkuuteen.

Eukaryoottisolujen reaktioissa käytetään gHBSS puskuria, joka estää soluaggregaattien syntymistä. Havaittiin, että ilman gelatiinia HBSS puskurissa toteutetut reaktiot nostivat bioluminesenssisignaalia, joka saattaa johtua juuri solujen yhteen ryhmittymisestä.

Neutrofiilisoluja laimennettaessa huomattiin, että solut pystyvät tappamaan korkeita bakteerisolupitoisuuksia. Ainoastaan elävien bakteerisolujen fagosytointi ei olisi riittänyt, joten bakteerisolujen tapon on todennäköisimmin tapahduttava myös solun ulkoisesti. Solunulkoisesti eli ekstrasellulaarisesti neutrofiili pystyy tappamaan bakteerisolun, erittämällä bakteereita tappavia yhdisteitä, kuten vetyperoksidia ja myeloperoksidaasia, ulos bakteerisolun ylle ja fagosytoimalla kuolleen solun.

Reaktioihin lisättiin myös sytokalasiini D:tä, joka on aktiinisäikeiden polymerisaatiota estävä sieniperäinen yhdiste. Neutrofiilit tarvitsevat aktiinisäikeitä liikkumiseen ja kuroutumiseen bakteerisolun ympärille. Sytokalasiini D:n vaikutus ei kuitenkaan ollut reaktioissa huomattavaa. Elävien solujen määrä reaktioissa, joissa sytokalasiini D:tä oli lisätty, ei ollut paljoakaan suurempi, kuin vastaavassa reaktiossa ilman sytokalasiini D:tä. Tämäkin ilmiö viittaisi neutrofiilien bakteerisolujen tappamisen tapahtuvan pääasiassa solunulkoisilla mekanismeilla. Myös koejärjestely, jossa muutettiin reagenssien pipetointijärjestystä, viittaisi ekstrasellulaariseen tappoon. Neutrofiilien tarttuminen kuoppien seinämiin olisi pitänyt nostaa niiden fagosytoosikapasiteettia eli bakteerisolujen tappoa. Huomattavia eroja ei kuitenkaan saatu eri pipetointijärjestysten kesken, jolloin suurin osa bakteerioluista oli todennäköisesti kuollut ennen fagosytointia.

Bakteerisolujen maljauksessa oli tarkoitus todentaa reaktioissa tapahtuva bakteerisolujen kuoleminen. Ongelmana oli reaktioiden jatkuminen maljatuissa näytteissä: Eri laimennoksissa kuolleiden solujen määrät erosivat huomattavastikin. Tulokset eivät kertoneet todellista, kuolleiden bakteerisolujen määrää sillä ajan hetkellä, kun näytteet laimennettiin ja maljattiin. Ainoastaan moninkertaisissa laimennoksissa tulokset saattavat kertoa tietyllä ajan hetkellä kuolleiden solujen todellisen määrän. Tarvitaan menetelmä, joka inaktivoisi neutrofiilit ja seerumin komplementin, mutta ei tappaisi bakteerisoluja, ennen kuin solujen maljaus olisi luotettava menetelmä todentamaan bakteerisolujen kuolemista. Neutrofiilien ja komplementin inaktivointimenetelmän lisäksi tutkimusta voitaisiin jatkaa mittaamalla neutrofiilien solun ulkoisen tapon aikana erittyvän vetyperoksidin määrää sekä määrittämällä hypokloriitin muodostumista katalysoivan myeloperoksidaasin entsyymiaktiivisuus.

6 LÄHTEET

- ¹ Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition. New York. Garland Science.
- ² Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (2005) *Mikrobiologia*. Sixth edition. New York. McGraw-Hill.
- ³ Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. (1994) 2nd edition. Philadelphia. Saunders Company.
- ⁴ Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., Vaara, M. (toim.) (2011) Helsinki. *Immunologia Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 2. Kustannus Oy Duodecim.
- ⁵ Dawson, M. et al. (1993) *Defence Mechanism. Biotechnology by open learning*. Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford. Iso-Britannia.
- ⁶ Solunetti. (2006) Neutrofiili. [Online viitattu 3.5.2011]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.solunetti.fi/fi/histologia/neutrofiili/](http://www.solunetti.fi/fi/histologia/neutrofiili/).
- ⁷ Atosuo, J. (2010) Työohje. Biokemian harjoitustyöt, Immunokemia. Turun yliopisto. Turku.
- ⁸ Helve, O., Forssell, J., Koulumies, R., Åberg, M. Helsinki. Werner Söderström.
- ⁹ de Filjter, C., Oe, L., Heezius, E., Donker, A., Verbrugh, H. (1996) Department of Internal Medicine. Amsterdam. Hollanti. **27(3)**: 409-15. [Online viitattu 26.5.2011]. Saatavilla [www-muodossa: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/88604711](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/88604711).
- ¹⁰ Lilius, E., Nuutila, J. (2006) Particle-induced myeloperoxidase release in serially diluted whole blood quantifies the number and the phagocytic activity of blood neutrophils and opsonization capacity of plasma. Wiley Interscience. *Luminescence* **21**: 148–158.
- ¹¹ University of Maryland Medical Centre. (2011) [Online viitattu 31.05.2011]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.umm.edu/altmed/articles/ethylenediaminetetraacetic-acid-000302.htm](http://www.umm.edu/altmed/articles/ethylenediaminetetraacetic-acid-000302.htm).
- ¹² Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998) *Essential Cell Biology. An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. New York. Garland Publishing.
- ¹³ Santa Cruz Biotechnology Inc. Cytochalasin D. 2011. [Online viitattu 3.6.2011]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.scbt.com/datasheet-201442-cytochalasin-d.html](http://www.scbt.com/datasheet-201442-cytochalasin-d.html).
- ¹⁴ Berthold Technologies. (2002) Operating manual. Wildbad. Saksa.
- ¹⁵ Atosuo, J., Lilius, E. (2009) *Escherichia coli* K12 (luxabcdeamp). A tool for analysis of bacterial killing by complement and myeloperoxidase activities in real-time basis. Turku: Turun yliopisto.
- ¹⁶ Kilpi, M., Atosuo, J., Lilius, E. (2009) Bacteriolytic activity of the alternative pathway of complement differs kinetically from the classical pathway. *Elsevier, Developmental and Comparative Immunology* **33** : 1102–1110.

Giemsan väriliuos

Stokki

3,8 g giemsa powder

250 ml metanolia

250 ml glyserolia

Kuumennetaan liuos 60 °C ja lisätään glyseroli liukseen hitaasti.

Liuos

10 ml stokkia

80 ml vettä

10 ml metanolia

Lämmitetään liuosta 80 °C vesihauteessa.

Puskurit

LB-medium

10 g Tryptonia

5 g Hiivauutetta

5 g NaCl

1 l MQ-vettä

LA-agar

Koostumus sama kuin LB-medium +

16 g Agaria/ 1l

gHBSS

86 ml MQ-vettä

10 ml CMF-HBSSx10 stokki pakkasesta (CMF=kalsium ja magnesium vapaa)

2 ml Ca-stokki

2 ml Mg-stokki

100 mg Gelatiinia

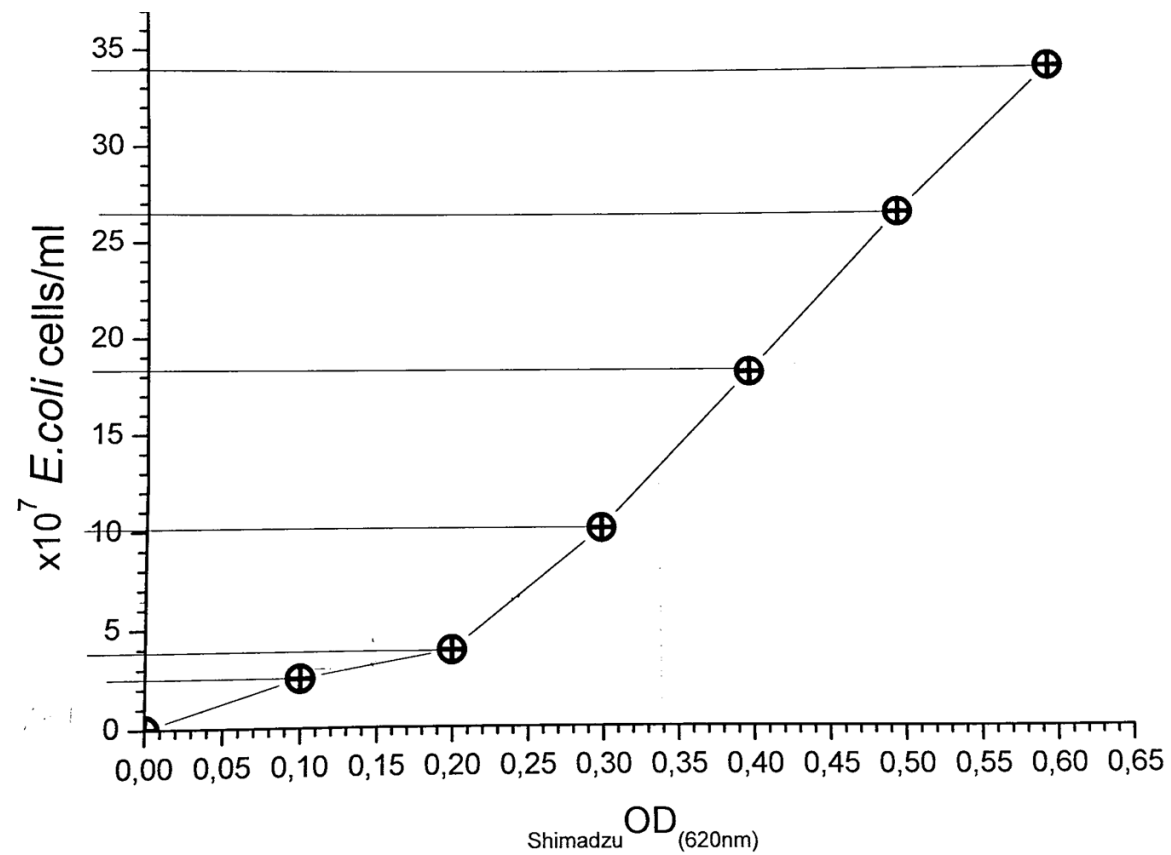
HBSS

Koostumus sama kuin gHBSS ilman gelatiinia

0,8 % Na₄Cl

1 ml NH₄Clx10 stokki

9 ml MQ-vettä

***E. coli* -pitoisuuden määrittäminen absorbanssin (620 nm) avulla**

Maljauslaskut

gHBSS	1(1/10) 2(1/100) 3(1/1000) 4(1/10000) 5(1/100000)	100 µl	Kuopassa	20 µl	Kuopassa	KA	SD	HBSS	100 µl	Kuopassa	20 µl	Kuopassa	KA
Bact	1 2 3 4 5	218000 280000	545000 700000	33000 41000 50000	Kuopassa 416250 512500 625000	559750	108362,8	Bact	170000 230000	425000 575000	17700 29000 30000	221250 362500 375000	391750
B+S	1 2 3 4 5	10	25			25		B+S	30	75			
B+N	1 2 3 4 5	292000 270000 1700000	730000 675000 4250000	59000 110000	737500 1375000	714166,7	34125,99	B+N	89000 380000 300000	222500 950000 750000	20900 38000 50000 1000000	261250 475000 625000 1250000	547291,7
B+N+S	1 2 3 4 5	10	25	20	250	137,5	159,099	B+N+S	60	150			
B+Nc	1 2 3 4 5	563000 770000 1500000	1407500 1925000 3750000	80200 109000 250000 100000	1002500 1362500 3125000 1250000	1974643	1052316	B+Nc	197000 140000 500000	492500 350000 1250000	19800 37000 20000 100000	247500 462500 250000 1250000	360500
B+N+Sc	1 2 3 4 5	1020 1300 10000	2550 3250 25000	230 200	2875 2500	2793,75	346,6356	B+N+Sc	920 700 1000	2300 1750 2500	200 500	2500 6250	3060