

IMUNOMUDULAČNÍ AKTIVITY IZOTONICKÉHO A HYPERTONICKÉHO ROZTOKU QUINTON

I. ČÁST

Studie zaměřená na testování imunomodulační aktivity izotonického a hypertonického roztoku Quinton, a to jak in vitro, tak in vivo, včetně možných účinků obou přípravků in vitro, na lidské mononukleární buňky periferní krve (PBMNC) v kulturách odebraných zdravým jedincům. Jednalo se o posouzení následujících obecných aspektů v průběhu kultivace:

- Mikroskopická studie možných účinků na životaschopnost buněk, morfologii, počet a velikost agregovaných buněk;
- Studie možných účinků na specifickou a obecnou buněčnou proliferaci;
- Studie možných účinků na buněčnou proliferaci leukocytů v různé populaci;
- Účinky na hemoglobin uvolněný do média s cílem zjistit možný účinek ochrany nebo zachování červených krvinek.

V této studii bylo zdravým dobrovolníkům odebráno 10 ml antikoagulační krve (EDTA).

Použitá metoda je následující:

– Buněčné kultury: mononukleární buňky periferní krve (PBMNC) se ve studii izolovaly separací pomocí Ficoll-Hypaque gradientové centrifugace založené na oddělení buněk podle rozdílu v jejich hustotě, upravily se na 1×10^6 ml/l a nechaly se růst v Costar 96 jamkové mikrotitrační deštičce v poměru 200 000 buněk na jamku.

Podmínky pro kultivaci buněk byly následující:

RPMI doplněné o 1% antibiotikum, 1% glutamin a 10% fetální telecí sérum (FCS); pH = 7,3

Samotný izotonický roztok Quinton (ISO-); pH = 7,3

Samotný hypertonický roztok Quinton; pH = 7,3

Izotonický roztok Quinton (ISO+) doplněný o 1% antibiotikum, 1% glutamin 10% (FCS); pH = 7,3

Hypertonický roztok Quinton doplněný o 1% antibiotikum, 1% glutamin 10% (FCS); pH = 7,3

Fyziologický roztok (SS) doplněný o 1% antibiotikum, 1% glutamin 10% (FCS); pH = 7,3

Jako stimulanty pro různé podmínky byly použity, fytohematoglutinin (PHA), estery forbolu a ionomycin (PMA+Io), monoklonální protilátky anti-CD3 a anti-CD28 (CD3+CD28) spolu s nestimulovanými buňkami (negativní kontroly). Kultivační plotěnky byly kultivovány 4 týdny v CO₂ inkubátoru při 37^o C, 95% vlhkosti a 5% CO₂.

– Obrácený/optický mikroskop: Tento byl použit k výpočtu parametrů buněčné životaschopnosti, morfologické změny buněk, počtu a velikosti agregovaných buněk. Životaschopnost buněk se analyzuje pomocí vitálního barviva (trypanové modři).

– Průtoková cytometrie: pro analýzu buněčné profílace byla použita technika pomocí karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl esteru nebo CFSE, nefluoreskující derivát fluoresceinu (Sigma-Aldrich Co).

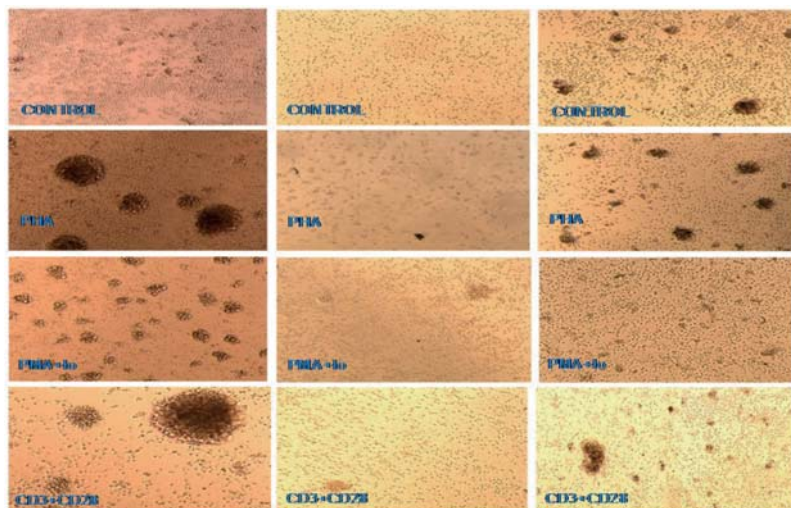
Ve stejné době, a to prostřednictvím metody přímé imunofluorescence, byly PBMNC inkubovány s různými kombinacemi monoklonálních protilátek zaměřených na membránové antigeny CD3, CD4, CD8 a CD25, a v kombinaci s různými fluorofory (FITC, PE, PE – Cy5).

VÝSLEDKY

- S ohledem na ISO + byla životaschopnost buněk 4 dny po jejich kultivaci podobná jako u RPMI a SS. Mírně poklesla, když byl izotonický roztok Quinton použit samostatně. Žádné buněčné morfologické změny nebyly zjištěny v souvislosti s RPMI nebo SS. Pokud jde o Quinton hypertonický roztok samotný nebo doplněný, životaschopnost byla minimální, již po prvních 12 hodinách po kultivaci (neprokázané údaje), což je důvod, proč bylo jeho využití v dalších pokusech vyloučeno.

- S ohledem na počet a velikost agregovaných buněk (obr. 1), bylo patrné, že buněčné kultury s RPMI mají agregované buňky ve všech stimulovaných jamkách. V případě PMA + Io byly malé a početné, a pak větší, ale v menším počtu v případě PHA a CD3 + CD28. Ve druhém případě byly podstatně větší. Když byl použit ISO -, nebyly zjištěny žádné agregované buňky, kromě několika ojedinělých případů u PHA a anti-CD3 + anti-CD28. Nicméně, když byl použit ISO+, stalo se to samé jako v případě RPMI pro různé stimuly, ačkoliv agregáty nebyly tak významné. Sku-

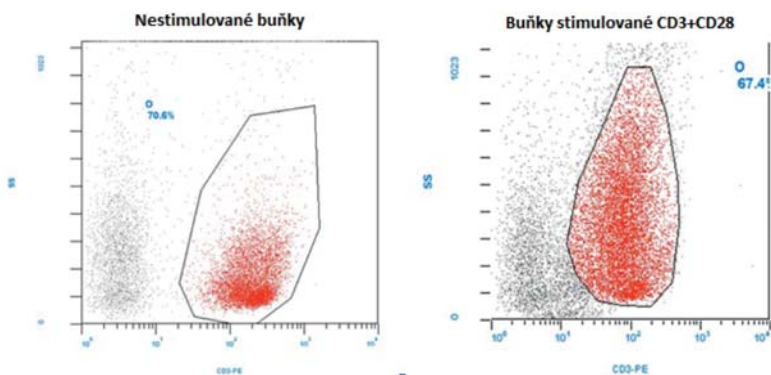
tečnost, že nestimulované agregáty byly zjištěny v kontrolách buněk, je významná. Pokud jde o SS, byly získány stejné agregáty jako v případě ISO+, ačkoli žádné agregáty nebyly zjištěny v nestimulovaných buňkách.



Obr. 1: Kultury PBMNC

– Metoda CFSE byla použita na analýzu buněčné proliferace, aby nebylo nutné použití tritiem označeného tymidinu. Obrázek 2 ukazuje vstupy celkové (CD3+) T-lymfocytů analyzovaných jako nestimulované i stimulované monoklonálními protilátkami anti-CD3 a anti-CD28 (CD3+CD28).

– Tečkový diagram na obrázcích 3 a 5 ukazuje proliferaci (měření v% CFSE+ buňky) a aktivaci lymfocytů (v% CD3+ CD25+ buňky) z nestimulovaných a stimulovaných buněk (CD3+CD28) v různých použitých kultivačních médiích. K maximální proliferaci nebo aktivaci došlo, jak se očekávalo, ve stimulovaných buňkách v RPMI. Proliferace v dalších dvou médiích však byla omezená a nebyl mezi nimi patrný žádný rozdíl. Nicméně, když se k měření proliferace použily histogramy (obr. 4), byly skutečně pozorovány rozdíly. Proliferace (odchylna fluorescence vlevo) stimulovaných buněk v médiu ISO + byla vyšší než proliferace v médiu ISO -, přičemž ve druhém byla proliferace podobná jako u kontrolních buněk. Tato data se také shodují s větší aktivací buněk zjištěnou v buňkách stimulovaných v ISO + (obr. 5), což by mohlo odůvodnit existenci agregovaných buněk v kulturách s tímto médiem.

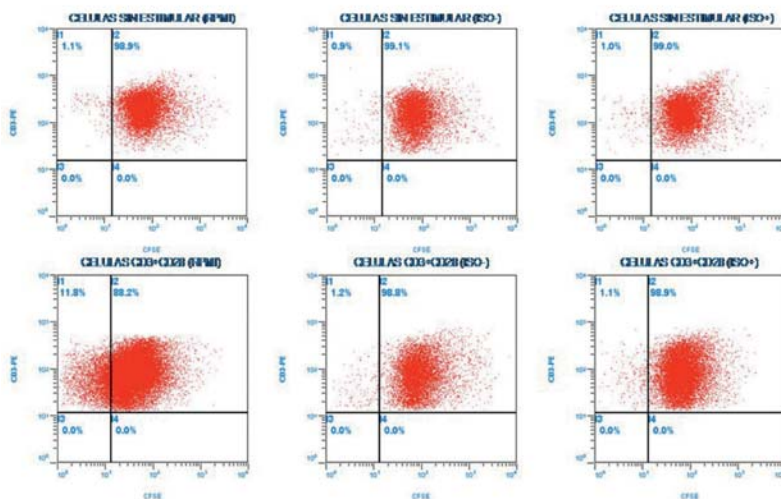


Obrázek 2: Výběr populace

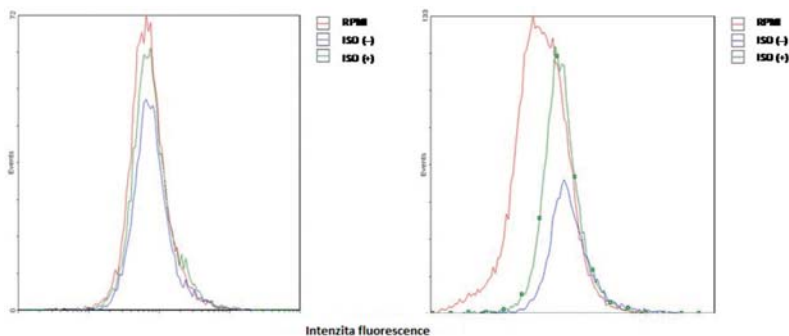
Když byla analyzována proliferace nebo aktivace CD4 + y CD8 + T lymfocytárních subpopulací, výsledky byly podobné těm, které jsou popsány u celkových T lymfocytů (CD3 +). Proto byla aktivace i proliferace zjištěna v obou populacích lymfocytů, i když parametry byly vyšší u populace CD4 + T lymfocytů než u CD8 +. Výsledky týkající se proliferace B lymfocytů a NK buněk nebyly přesvědčivé.

Pro změření účinku hypertonického a izotonického roztoku Quinton na lýzu červených krvinek byla upravena spektrofotometrická metoda využívající Drabkinovo činidlo. Tato metoda se běžně používá k měření celkové hladiny hemoglobinu (volný hemoglobin + hemoglobin vázaný v erythrocytech) v krvi. Upravili jsme metodu pro měření pouze volného hemoglobinu v různých časech v průběhu kultivace (8, 12, 24, 48, 72 a 96 hodin) a s různými médii pro čisté kultury buněk bez přidání (RPMI, SS, izotonického a hypertonického roztoku Quinton). Vhodná kalibrační křivka byla stanovena předem z bovinního hemoglobinu. Tato byla později použita, aby zahrnovala různé absorbance získané ve vzorku, a tímto způsobem byly získány přibližné koncentrace volného hemoglobinu v každém vzorku.

Získané výsledky byly následující:



Obrázek 3: Proliferace buněk (CFSE)



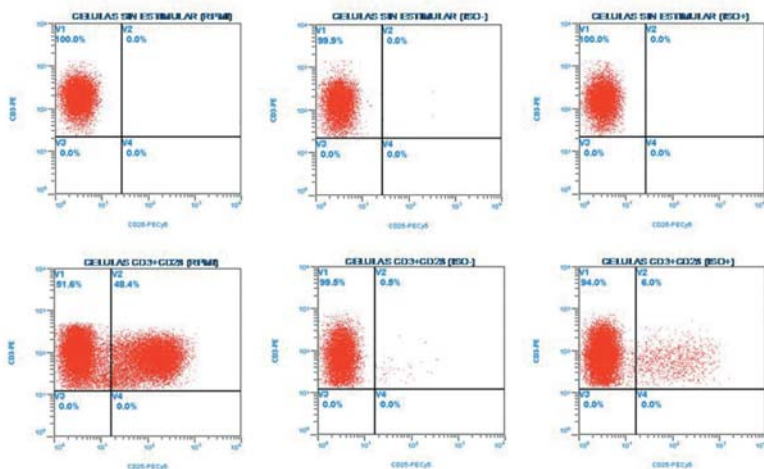
Obrázek 4: Proliferace buněk

Za prvních 8 hodin se zdálo, že všechna média kultur uchovávají červené krvinky v dobrém stavu. Absorbance byla podobná ve všech analyzovaných vzorcích.

Po 8 hodinách kultivace se začala lýza červených krvinek značně a progresivně zvyšovat v hypertonickém roztoku Quinton. Maximální hodnoty absorbance byly zjištěny po 96 hodinách.

Po 48 hodinách se začala lýza červených krvinek rovněž zvyšovat pomalu a postupně s RPMI a SS. Maximální hodnoty absorbance byly zjištěny po 96 hodinách, více pro SS než pro RPMI. V každém případě byly obě hodnoty absorbance nižší než hodnoty zjištěny pro hypertonický roztok Quinton.

U izotonického roztoku Quinton byly podobné hodnoty absorbance konstantní během 96 hodin kultivace a žádné zvýšení nebylo patrné v žádném vzorku. **Důvodem může být ta skutečnost, že izotonický roztok chrání červené krvinky.**



Obrázek 5: Aktivace buněk

Závěry

1. Mononukleární buňky periferní krve (PBMNC) kultivované in vitro v izotonickém roztoku Quinton si uchovávaly svoji morfologii a životaschopnost během čtyř dnů od kultivace, zejména v roztoku ISO+.

2. **Roztok ISO+** se chová jako médium kultivace RPMI, pokud jde o agregaci, proliferaci nebo aktivaci buněk. Navíc, do určité míry, **zdá se, že je schopen sám o sobě aktivovat buňky, což je prokázáno existencí buněčných agregátů v nestimulovaném médiu.**

3. V souladu s výše uvedeným je skutečnost, že téměř nedochází k agregaci, proliferaci nebo buněčné aktivitě v ISO – by mohlo být způsobeno tím, že v médiu nejsou žádné živiny.

4. Izotonický roztok Quinton jasně chrání/uchovává červené krvinky, což je prokázáno i skutečností, že během 96 hodin kultivace nebyl uvolněn téměř žádný hemoglobin.

5. Vysoká tolerance PBMNC in vitro v izotonickém roztoku Quinton je zřejmá, jakož i jeho potenciál aktivovat buňky, což naznačuje, že v ideálních podmínkách by mohl nahradit tradiční média kultivace. Stejně tak kromě potenciálu ochraňovat červené krvinky, získané výsledky mohou být použity jako základ pro budoucí studie in vitro a in vivo, které mohou dokonce zjistit, že může pomoci zachovat orgány.

II. ČÁST

Nedávno jsme dokončili práce na jedné z nejdůležitějších částí úkolu číslo 2 pro rok 2009. Je jím stanovení produkce intracytoplazmatických cytokinů v lymfocytech periferní krve stimulovaných pomocí izotonického roztoku Quinton (ISO), fyziologického roztoku (SS), a konvenčního kulturačního média RPMI.

CÍL: základním cílem této části studie je zjistit, zda existují rozdíly v intracelulární sekreci cytokinů na základě použitého kulturačního média.

METODIKA A PRACOVNÍ PLÁN

Zjištění možných rozdílů v sekreci lymfocytárních intracytoplazmatických cytokinů:

Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10) a interferon gama (INF- γ). Test byl prováděn na všech krevních kulturách odebraných 6 zdravým jedincům, ve dvou fázích. První stimulují produkci cytokinů a druhá pro detekci produkovaných cytokinů, a to pomocí tříbarevného toku a přímé imunofluorescenční cytometrie. K tomu byly použity kombinace následujících protilátek, v kombinaci s různými fluorochromy: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16, anti-CD56, anti-CD19, anti-TNF- α , anti-IL2, anti-IL-4, anti-IL-10 a anti-INF- γ .

– 1. Fáze: produkce intracytoplazmatických cytokinů:

Dejte 1 ml heparinizované krve zředěné 1:2 s RPMI 1640, s izotonickým roztokem Quinton (ISO), s fyziologickým roztokem (SS) do 3 jamek 24-jamkové kulturační misky.

Přidejte Brefeldin (10 μ g) do 3 jamek s jednotlivými médii.

Přidejte PMA (25 ng) a ionomycin (1 μ g) do druhé jamky každého z médií.

Přidejte PHA (20 μ g) a LPS (1 μ g) do třetí jamky každého z médií.

Incubujte po dobu 5 hodin v peci při teplotě 37 °C v 5% CO₂ a nasycenou vlhkostí.

– 2. fáze: Zjištění intracytoplazmatických cytokinů:

Rozdělte 100 μ l krve z 1., 2. a 3. jamky každého média do 6 zkumavek pro měření, každá o velikosti 12 x 75 mm

Do každé zkumavky přidejte 20 μ l MoAb anti-CD4-FITC. Dělejte vše, co je nezbytné pro membránové antigeny CD3, CD8, CD19 a CD16 +

CD56. Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě ve tmě.

Proveďte fixaci a zajistěte propustnost buněk pomocí Fix a Perm (Caltag).

Přidejte 20 μ l MoAb u různých cytokinů v kombinaci s PE: 1. zkumavka: kontrola pomocí izotopů, 2. zkumavka anti-TNF- α , 3. zkumavka anti-IL-2, 4. zkumavka anti-IL-4, 5. zkumavka anti-IL-20, 6. zkumavka: anti-INF- γ . Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě ve tmě.

Omyjte s PBS-1% BSA

Získejte a analyzujte vzorky v průtokovém cytometru (EPICS XL-Coulter)

VÝSLEDKY A DISKUSE

Následující tečkované diagramy ukazují lymfocytární sekrece intra-cytoplazmatických cytokinů, kde byly pozorovány rozdíly v závislosti na použitém kultivačním médiu: TNF- α , IL-2 a INF- γ .

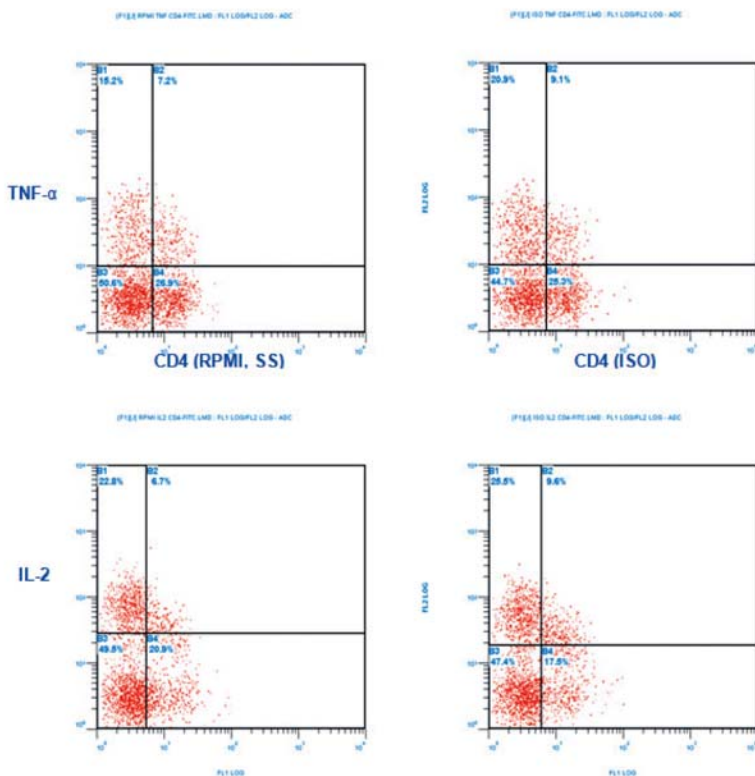
Výrazné rozdíly byly pozorovány u IL-4 a IL-10 v krvi kultivované prostřednictvím různých médií.

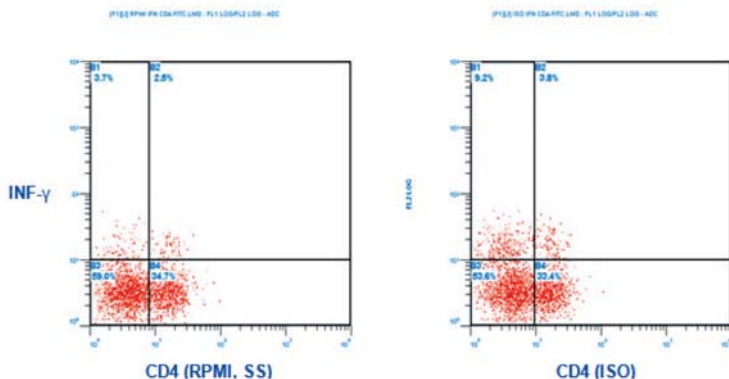
Osa x představuje lymfocyty CD4 + (T helper) a osa y různé cytokiny. Tři tečkované diagramy na levé straně odpovídají buňkám kultivovaným s RPMI nebo SS: ty na pravé straně odpovídají buňkám kultivovaným s izotonickým roztokem Quinton.

Při pohledu na jednotlivé kvadranty tečkovaných diagramů (kvadranty B1, B2, B3 a B4), B1 kvadranty ukazují lymfocyty, které vylučují pouze konkrétní cytokin, ale ne antigen CD4. Lymfocyty, které se objevují v kvadrantech B3, nevylučují ani konkrétní cytokin ani antigen CD4 (jsou negativní pro oba markery). Lymfocyty, které jsou zobrazeny v kvadrantech B4, vylučují antigen CD4, ale ne konkrétní cytokin. Kvadranty B2 obsahují lymfocyty, které vylučují jak antigen CD4 tak konkrétní cytokin (pozitivní pro oba markery).

Rychle je zřejmé, že lymfocyty kultivované v izotonickém roztoku Quinton vykazují větší mezibuněčnou produkci cytokinů TNF- α , IL-2 a INF- γ , pro všechny analyzované kontroly. Celkově lze nejen pozorovat větší procento celkových lymfocytů vylučujících každý z výše uvedených cytokinů (součet kvadrantů B1 a B2), ale také větší procento specifické populace T helperů (CD4 +) lymfocytů vylučujících tytéž cytokiny (kvadrant B3). Tyto výsledky opět ukazují schopnost izotonického roztoku Quinton aktivovat lymfocyty. Je dobře známo, že lymfocytární aktivace s sebou přináší nárůst buněčné proliferace, něco, co jsme již ukázali u izotonického roztoku Quinton v našich předchozích studiích, a diferenciaci. V tomto

konkrétním případě, a s cytokiny, které jsme dnes zkoumali, je účinek ten, že roztok je schopen podporovat diferenciaci T-helperů vůči těm, jež se nazývají Th1, buňky, které jsou charakteristické zejména produkcí profilů cytokinů odpovědných za buněčnou imunitu nebo proinflamatorních cytokinů, z nichž vynikají tři zmíněné cytokiny. Buněčná imunita má velmi důležitou roli v boji proti infekci způsobené patogenním agens s převážně intracelulárním růstem, jako je tomu u některých virů, parazitů a intracelulárních bakterií. Zajímavá je také skutečnost, že to stejné nenastalo v případě dvou cytokinů Th2 profilu měřeném v této studii, jako je IL-4 a IL-10. Tento rozpor naznačuje, že zvýšení produkce cytokinů není výsledkem celkové buněčné aktivace, ale naopak, selektivní aktivace ovlivňující některé populace T helperů. Nicméně, mělo by být měřeno více Th2 cytokinů pro potvrzení tohoto závěru.





V současné době shromažďujeme společně s revmatologií Fakultní nemocnice Elche General Hospital, krev některých pacientů s diagnózou revmatoidní artritidy a některých pacientů s diagnózou systémového lupus erythematosus, abychom prověřili, zda je dosaženo stejného účinku, pokud jde o intracelulární produkci cytokinů, u těchto pacientů, jaký byl prokázán u lymfocytů zdravých jedinců. Předběžné výsledky životaschopnosti, sčítání a proliferace lymfocytů těchto pacientů kultivovaných s izotonickým roztokem Quinton jsou podobné těm, které byly pozorovány u zdravých jedinců. Souběžně s těmito studiemi o intracelulární produkci cytokinů u pacientů jsme rozšířili rozsah buněčné proliferace a aktivace v kultivačních studiích.

ZÁVĚRY

1. Ukazuje se, že izotonický roztok Quinton má stimulační účinek na tvorbu Th1 cytokinů.
2. Vysoká tolerance, kterou v předchozích studiích prokázaly mono-nukleární buňky v periferní krvi kultivované in vitro s izotonickým roztokem Quinton, jejich vysoká tolerance prokázaná in vivo a jejich imunomodulační aktivita je staví do pozice silného kandidáta pro in vivo a in vitro testování na různých běžných onemocněních (infekčních, neurodegenerativních, autoimunitních, atd.), u kterých změna v imunitě může hrát důležitou roli v patogenezi.

José Miguel Sempere Ortells

odborník na imunologii

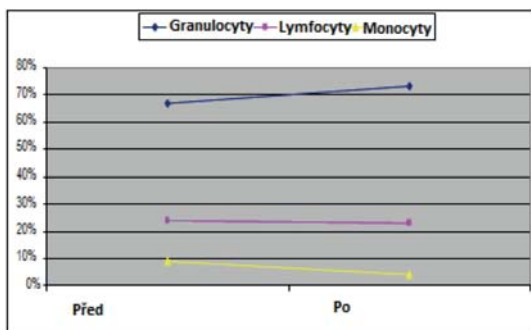
profesor a vedoucí imunologie, ředitel imunologické výzkumné skupiny, biotechnologické oddělení, Univerzita v Alicante

III. ČÁST

V průběhu roku 2010 jsme rozšířili studii in vivo o expresi adhezivní molekuly u zdravých jedinců a provedli jsme in vitro studie, abychom analyzovali expresi introcytoplazmatických cytokinů u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a u pacientů se systémovým lupus erythematodes (SLE).

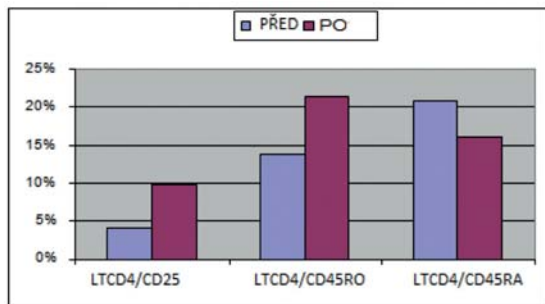
Ve studii in vivo byl hypertonický roztok Quinton (QH) podáván celkem šestnácti skupinám zdravých jedinců, v poměru 6 lahvíček (2 +2 +2) podávaných orálně po dobu 6 hodin. Každému pacientovi jsme odebrali krev (3 ml EDTA) před a po podání lahvičky. Průtoková cytometrie a přímá imunofluorescence byla použita k měření exprese různých buněčných markerů aktivace, a to paměťových markerů a adhezivních molekul na lymfocytech, monocytech a granulocytech, založených na různých kombinacích těchto monoklonálních protilátek: anti-CD3, CD4, CD8, CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD19, CD25, CD28, CD31, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L, CD152 a CD154. Analýzy byly porovnány před podáním a po podání lahvičky a byly získány následující výsledky:

1. Zvýšení podílu granulocytů (65,7% proti 73,5%), zřejmě zejména na úkor snížení podílu monocytů (9,5% proti 4,8%). Počet lymfocytů zůstal téměř stabilní po celou dobu testu.

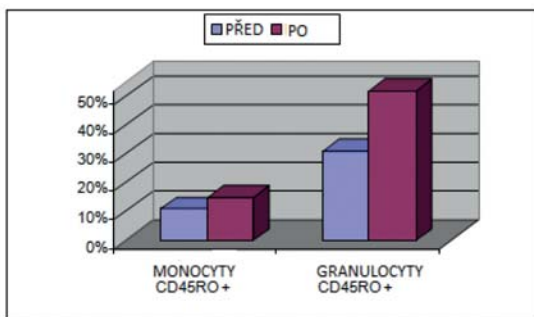


2. Zvýšení aktivačních markerů v T-buňkách, a to zejména v T-helpech nebo spolupracujících buňkách. Stejně jako ve studiích in vitro s izotonickým roztokem Quinton, kdy byl podáván QH in vivo u zdravých jedinců, byl pozorován výrazný nárůst populace CD3 + CD4 + CD25

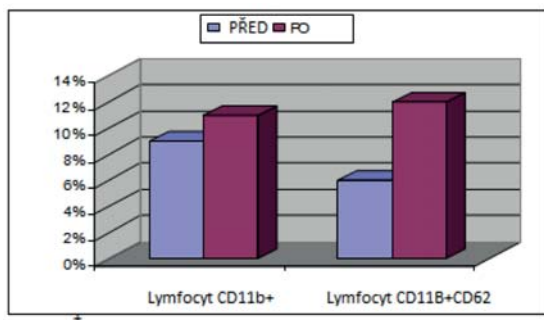
+. U některých jedinců byl tento nárůst populace více než dvojnásobný. Když byl podáván QH in vivo, došlo rovněž obecně ke zvýšení lymfocytů a jiných aktivačních markerů, jako je například CD38 (24,3% proti 29,7%), a zvýšení paměťové populace CD3 + CD4 + CD45RO + (13,4% proti 21,8). U některých zdravých jedinců byl tento nárůst doprovázen souběžným poklesem naivní populace T-buněk CD3 + CD4 + CD45RA +.



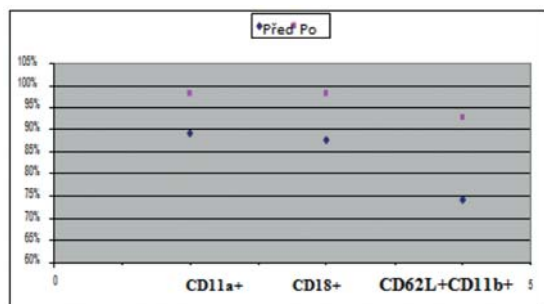
3. Zvýšení aktivačních markerů u monocytů a granulocytů. Když byl podáván QH perorálně, došlo ke zvýšení procenta monocytů a dokonce ještě k většímu zvýšení granulocytů (29,2% proti 49,7%), s koexpresí aktivačního markeru CD45RO.



4. Zvýšení exprese adhezivních molekul na lymfocytech, a to zejména v T-buňkách. Když byl podáván QH orálně, došlo k mírnému zvýšení exprese lymfocytů alfa řetězce $\beta 2$ integrinu CD11b (9,2% proti 10,4%), což představuje nárůst markeru CD62 nebo L-selektinu, (58% proti 63%) a zvýšení počtu lymfocytů společně exprimujících obě adhezivní molekuly (6,4% proti 11,7%). Kromě toho došlo ke zvýšení počtu lymfocytů s expresí CD31 molekuly a větší exprese CD31 na jednotku buněčného povrchu (zvýšení průměrné intenzity fluorescence nebo MFI).



5. Zvýšení exprese adhezivní molekuly granulocytů a monocytů. Po perorálním podání QH bylo pozorováno zvýšení procenta buněk s řetězcem alfa (CD11a) a řetězcem beta (CD18) exprese β 2 integrinu (89,4 proti 98,1% a 87,6 proti 98,1%, v uvedeném pořadí). Došlo ke zvýšení procenta buněk se současnou expresí CD62L a CD11b adhezivních molekul (74,3% proti 92,8%). Kromě toho došlo k zvýšení podílu granulocytů a monocytů s expresí adhezivní molekuly CD31.



Závěrečná studie o expresi adhezivní molekuly opět potvrzuje schopnost QH stimulovat imunitní systém, a to zvýšením in vivo leukocytární exprese různých membránových antigenů, jako jsou CD25, CD38 a CD45RO a různých adhezivních molekul leukocytů patřící k rodině integrinů a selektinů a superrodině imunoglobulinů. Adhezivní molekuly, jako celek, pomáhají buňkám imunitního systému komunikovat navzájem mezi sebou. Působí jako kostimulační molekuly leukocytární aktivace a jsou přímo a definitivně zapojeny do procesu adheze uvedených leukocytů zachycených na cévním endotelu a v jejich následné efuzi a pohybu po extracelulární matrix k různým tkáním.

Některé z těchto molekul, jako jsou selektiny, jsou exprimovány v inaktivním stavu, i když jejich exprese se zvyšuje po aktivaci. Ostatní jsou exprimovány zejména po aktivaci a se zvýšením stupně zánětu. To je i případ integrinů a adhezivní molekuly CD31, které patří do superrodiny imunoglobulinů, jejichž exprese se zvyšuje v leukocytech po užití QH. Tato molekula je zapotřebí pro vytvoření procesu leukocytární efuze přes cévní endotel, aby leukocyty mohly opustit krevní oběh a dostaly se do jiných míst na těle, kde je nějaký druh poranění nebo zánětu. Na druhé straně stupeň zánětu je určený konečnou rovnováhou mezi prozánětlivými a protizánětlivými cytokiny. V předchozích studiích jsme již viděli, že produkt je schopen zvýšit intracelulární expresi Th1 prozánětlivých cytokinů. To znamená, že jeho účinek na modulaci adhezivních molekul může být přímo spojen s tímto zvýšením.

Dosud jsme byli schopni získat pouze 10 pacientů s RA a tři pacienty se SLE, u nichž jsme analyzovali in vitro intracytoplazmatickou leukocytární expresi cytokinů ve studii, která byla velmi podobná té, kterou jsme dělali se zdravými kontrolními skupinami. Hodnocené cytokiny byly opět IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10 a INF- γ , s přidáním TGF- β . RA je klasický model Th1 autoimunitního onemocnění a SLE je klasický model Th2 autoimunitního onemocnění.

Ze všech pacientů s RA měli tři DAS28 vyšší než 5,1 (velmi aktivní pacienti, pokud jde o zánět), čtyři měli DAS28 vyšší než 3,2 a menší než 5,1 (u pacientů s mírným zánětem) a tři měli DAS28 méně než 3,2 (neaktivní pacienti). Fenotypová analýza mononukleárních buněk kultivovaných v izotonickém roztoku Quinton ukazuje zvýšení IL-10 intracytoplazmatické exprese lymfocytů T CD4 + u pěti pacientů a snížení exprese IL-10 u tří pacientů, u dalších dvou pacientů nebyly pozorovány žádné změny v intracytoplazmatické expresi uvedeného cytokinu. Výsledky pro TGF- β , TNF- α a INF- γ byly rovněž různé, ukazují změny, které jsou závislé na daném pacientovi.

K něčemu podobnému došlo u pacientů se SLE. Ze všech analyzovaných cytokinů bylo pozorováno zvýšení pouze u jednoho pacienta, a to INF- γ exprese CD4 + T-lymfocytů a T v CD8 + lymfocytů.

Jako shrnutí dosud provedené studie u pacientů na vyhodnocení exprese intraleukocytárních cytokinů, můžeme potvrdit, že získané výsledky nejsou přesvědčivé. To může být částečně proto, že byly analyzovány dosud pouze u několika pacientů, u kterých stupeň zánětu a léčba, které byly podrobeny, byly různé. Někteří pacienti byli léčeni protilátkami, TNF-inhibitory, jiní methotrexátem, další oběma léky a jiní steroidními a nesteroidními protizánětlivými léky. Různé stupně zánětu pozorované u jednotlivých skupin

pacientů, spolu s různými účinky, které mohou mít různé léky na profily cytokinů spojených s Th1/Th2 způsobily, že bylo velmi obtížné interpretovat dosud získané výsledky. To je důvod, proč si myslíme, že skupiny pacientů, které byly vytvořeny, by měly být co nejvíce homogenní. Zejména s ohledem na dvě výše uvedené proměnné, a to sice stupeň zánětu a léčba. Kdykoliv je to možné, měli by být pacienti, kteří byli diagnostikováni „de novo“, tj. v raném stádiu nemoci, zařazeni do kontrolních skupin.