Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Monika Tutaj

Mechanizmy negatywnej regulacji reakcji immunologicznych w modelu stwardnienia rozsianego u myszy (EAE)

Praca doktorska

Promotor: **dr hab. n. med. Marian Szczepanik**

Pracę wykonano w Zakładzie Biologii Rozwoju Człowieka CMUJ

Kierownik Zakładu: dr hab. n. biol. Leopold Śliwa

Kraków 2004

Spis treści

Słowniczek użytych skrótów..... 4

1. Wstęp.....6

1.1. Stwardnienie rozsiane.....6

1.2. Udział mechanizmów immunologicznych w patogenezie SM.....7

1.3. Alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia u zwierząt (EAE).....10

1.4. Metody terapii stwardnienia rozsianego.....14

1.4.1. *Stosowane w praktyce klinicznej*.....14

1.4.2. *Eksperymentalne metody terapii stwardnienia rozsianego*.....15

1.5. Mechanizmy zaangażowane w utrzymaniu tolerancji obwodowej.....17

1.5.1. *Tolerancja pokarmowa*.....18

1.6. Skóra jako miejsce indukcji odpowiedzi immunologicznej.....20

2. Cele pracy.....22

3. Materiały i metody.....23

3.1. Zwierzęta doświadczalne.....23

3.2. Odczynniki.....23

3.3. Przeciwciała monoklonalne i dopełniacz.....24

3.4. Aparatura i materiały.....24

3.5. Metoda indukcji EAE.....25

3.6. Indukcja komórek regulacyjnych poprzez naskórną (e.c.) aplikację MBP.....25

3.7. Transfer komórek regulacyjnych do naiwnych biorców.....26

3.8. Charakterystyka fenotypu komórek supresyjnych odpowiedzialnych za stan tolerancji indukowanej przez naskórną immunizację.....26

3.9. Sortowanie CD4+ CD8+ limfocytów T węzłów chłonnych z użyciem sortera komórkowego typu FACS.....27

3.10. Test *in vivo* na swoistość antygenową supresji indukowanej przez skórę.....27

3.11. Test *in vitro* na swoistość antygenową supresji indukowanej przez skórę.....28

3.12. Test proliferacji w obecności komórek regulacyjnych i przeciwciał neutralizujących cytokiny.....28

3.13. Neutralizacja TGF-β w modelu EAE *in vivo*.....29

3.14. Aplikacja MBP na skórę zwierząt chorych na EAE.....29

4. Wyniki..... 30

4.1. Naskórna immunizacja MBP przez skórę chroni przed rozwojem EAE..... 30

4.2. Tolerancję indukowaną przez skórę można przenieść na naiwnych biorców przy użyciu komórek układu immunologicznego..... 33

4.3. Komórki TCR$\gamma\delta$ oraz komórki NKT nie są zaangażowane w tolerancji indukowanej przez aplikację MBP na skórę..... 35

4.4. Za supresję indukowaną przez aplikację MBP na skórę odpowiedzialne są limfocyty T z koreceptorami CD4 i CD8..... 39

4.5. Limfocyty T regulacyjne indukowane przez immunizację *e.c.* MBP należą do populacji CD4+ CD8+..... 40

4.6. Stan tolerancji immunologicznej indukowany przez skórę jest antygenowo nieswoisty 42

4.7. Naskórne podanie antygenu przed aktywną immunizacją hamuje proliferację komórek efektorowych Tef *in vitro*..... 43

4.8. Komórki regulacyjne Ts hamują proliferację komórek efektorowych Tef przez uwalnianie TGF-β..... 44

4.9. Neutralizacja TGF-β *in vivo* znosi efekt tolerancji indukowanej przez skórę..... 44

4.10. Aplikacja MBP na skórę chorych myszy hamuje dalszy rozwój EAE..... 46

4.11. Analiza statystyczna wyników..... 47

5. Dyskusja..... 48

6. Wnioski..... 56

7. Literatura..... 58

8. Streszczenie..... 65

Summary..... 68

Słowniczek użytych skrótów

Ab - (antibody) przeciwciało

Ag - antygen

APC - (antigen presenting cell) komórka prezentująca antygen

CD - (cluster of differentiation) czynnik różnicowania

CFA - (complete Freund's adjuvant) kompletny adjuwant Freunda

CS - (contact sensitivity) nadwrażliwość kontaktowa

DC - (dendritic cell) komórka dendrytyczna

DTH - (delayed-type hypresensitivity) nadwrażliwość typu późnego

EAE - (experimental allergic encephalomyelitis) alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia

FCS - (foetal calf serum) płodowa surowica cielęca

FITC - izotiocyjanian fluoresceiny

GALT - (gut-associated lymphoid tissue) tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego

HEPES - N-(2-hydroksyetyl) piperazyna-N'-2-kwas 2 etanosulfonowy

ICAM - (intercellular adhesion molecule) międzykomórkowa molekuła adhezyjna

IFN - interferon

Ig - immunoglobulina

IEL - (intraepithelial lymphocytes) limfocyty śródnabłonkowe

IL - interleukina

IP - (interferon-inducible protein) białko indukowane przez interferon

KLH - (keyhole limpet hemocyanin) hemocjanina mięczaka skałoczepu

LC - (Langerhans' cells) komórki Langerhansa

LFA - (lymphocyte function-associated antigen) antygen związany z czynnością limfocytów

LN - (lymph node) węzły chłonne

LNC - (lymph node cells) komórki węzłów chłonnych

mAb - (monoclonal antibody) przeciwciała monoklonalne

MBP - (myelin basic protein) zasadowe białko mieliny

MCP - (monocyte chemoattractant protein) białko chemotaksji monocytów

Mf - makrofag

MHC - (major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej

MIG - (monokine-induced by interferon gamma) monokina indukowana przez IFN-γ

MIP - (macrophage inflammatory protein) białko zapalne makrofagów

MOG - (myelin oligodendrocyte glycoprotein) mielinowa glikoproteina oligodendrocytów

MRI - (magnetic resonance imaging) obrazowanie metodą magnetycznego rezonansu

NEAA - (non essential amino acids) niezbędne aminokwasy

NO - (nitric oxide) tlenek azotu

NK - (natural killer- naturalny zabójca) komórka NK

NKT - (natural killer T lymphocyte) - limfocyt NKT

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PBS - pozbawiona jonów wapnia i magnezu, zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna

PE - fikoerytryna

PLP - (proteolipid protein) białko proteolipidowe

PMR - płyn mózgowo rdzeniowy

PTx - (pertussis toxin) toksyna produkowana przez pałeczki *Bordetella pertussis*

R - receptor

RC - (rabbit complement) liofilizowany dopełniacz króliczy

RANTES - (regulation on activation, normal T cell expressed and secreted) regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T

ROIs - (reactive oxygen intermediates) reaktywne związki tlenu

RPMI - RPMI 1640, podłoże do hodowli komórek

SM - (sclerosis multiplex) stwardnienie rozsiane

TCR - (T-cell receptor) receptor limfocytów T

TGF - (transforming growth factor) transformujący czynnik wzrostu

TH - (T helper) limfocyt T pomocniczy

TNF - (tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu

TNP - trójnitrofenyl

Ts/Tr - limfocyt T supresyjny/regulacyjny

Tef - limfocyt T efektorowy

VCAM - (vascular cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji komórkowej naczyń

VLA - (very late antigen) antygen bardzo późny

Indeks + lub – oznacza istnienie (+) lub brak (-) odpowiedniej cechy

Znak –/– oznacza defektywną homozygotę, z niefunkcjonalnym genem danej cechy

1. Wstęp

1.1. Stwardnienie rozsiane

Stwardnienie rozsiane (SM) jest jedną z najczęściej występujących chorób demielinizacyjnych u ludzi, charakteryzującą się przewlekłym stanem zapalnym ośrodkowego układu nerwowego (OUN). SM zaliczane jest do grupy schorzeń autoimmunizacyjnych. Etiopatogeneza SM pozostaje wciąż nierozwiązanym problemem neurologii. Szereg różnych czynników wpływa na rozwój tego schorzenia, ale do najważniejszych należą: genetyczna predyspozycja, infekcje oraz zjawiska o charakterze autoagresji. Obecnie powszechnym uznaniem cieszą się następujące teorie powstawania SM: 1. wirusowa, zakładająca, że czynnikiem inicjującym chorobę jest infekcja wirusowa, 2. immunologiczna, wiązana z aktywacją autoreaktywnych klonów limfocytów T, 3. wirusowo-immunologiczna, stanowiąca wypadkową wspomnianych teorii, gdzie czynnik wirusowy stanowi element inicjujący chorobę, podczas gdy dalszy proces chorobowy ma charakter immunologiczny.

Z badań epidemiologicznych wynika, że również czynniki środowiskowe mają wpływ na zachorowalność na SM, gdyż migracje ludzi do innych stref klimatycznych przed osiągnięciem dojrzałości (przed 15 rokiem życia) mogą zwiększyć lub zmniejszyć ryzyko zachorowania na SM. Ponadto opisano epidemiczne wystąpienie SM wśród izolowanych populacji ludzi (Wyspy Faroe, Islandia) po zetknięciu się z Europejczykami lub mieszkańcami Ameryki Północnej, co sugeruje zakaźny charakter czynnika indukującego SM [1].

Obserwacje kliniczne wskazują na wiele patogenów, które mogą powodować choroby demielinizacyjne obwodowego lub centralnego układu nerwowego. Stwierdzono, że należą do nich: wirus Epstein-Barra (EBV), cytomegalii (CMV), odry, ludzki wirus opryszczki 6 (HHV-6), wirus ludzkiego niedoboru odporności (HIV), jak również mykoplazma i pałeczka *Campylobacter jejuni*. Epizody ostrej demielinizacji mogą wystąpić u ludzi po przejściu licznych infekcji wirusowych i w wielu przypadkach obserwuje się prawie identyczne zmiany w substancji białej OUN. Przypuszczalnie wspólny mechanizm demielinizacji wynika z bezpośredniego uszkadzania oligodendrocytów lub z rozwoju poinfekcyjnych zaburzeń odpowiedzi immunologicznej i niszczenia własnej tkanki nerwowej w rozwijającym się procesie autoagresji [2].

Kolejnym dowodem na udział czynnika infekcyjnego w rozwoju SM mogą być wyniki badań klinicznych wskazujące na korelację miedzy wystąpieniem infekcji wirusowej u pacjentów z SM, a pogorszeniem przebiegu choroby. U chorych odnotowano między innymi

podwyższony poziom interferonu α (IFN-α) i proteiny indukowanej przez IFN-α (MxA), oraz wysoką ekspresję MHC klasy I na oligodendrocytach w trakcie infekcji, co może mieć związek z cytotoksycznością zależną od limfocytów T $CD8^+$. Natomiast podwyższone miano przeciwciał antywirusowych może świadczyć jedynie o zaburzeniu odpowiedzi immunologicznej pacjentów. Z mózgów pacjentów SM izolowano kwasy nukleinowe co najmniej czternastu wirusów, jednak do dzisiaj nie ustalono istotnej zależności między zachorowalnością na SM, a konkretną infekcją wirusową. Nie wykryto również żadnego zewnątrzpochodnego czynnika sprawczego w aktywnych płytkach demielinizacji [3].

W ostatniej dekadzie stwierdzono w wielu przypadkach obecność wirusa opryszczki w miejscach uszkodzeń substancji białej pacjentów, szczególnie odmian wirusa typu I, II i VI. Ponadto, zastosowanie leku antyopryszczkowego (acyklowir) zmniejszało liczbę ataków choroby [4]. Poczynione obserwacje na powrót wzbudziły zainteresowanie infekcyjnymi hipotezami etiologii SM.

1.2. Udział mechanizmów immunologicznych w patogenezie SM

Pierwszy przypadek SM został opisany przez francuskiego neurologa Jean-Martin Charcot'a w 1868 r., który zaobserwował okołonaczyniowe nacieki komórek zapalnych w substancji białej mózgu i rdzenia kręgowego pacjentów z epizodami neurologicznych dysfunkcji [5, 6]. Rozwój nowoczesnych metod badawczych pozwolił stwierdzić, że lokalnie w OUN dochodzi do infiltracji limfocytów T i makrofagów (Mf) z wysoką ekspresją MHC klasy II, do uszkodzenia oligodendrocytów i osłonki mielinowej neuronów w postaci płytek demielinizacyjnych (plak), jak również proliferacji astrocytów. Plaki najczęściej umiejscawiają się w okolicach okołokomorowych, nerwu wzrokowego, pnia mózgu oraz rdzenia kręgowego [1, 5].

Patogeneza i etiologia SM jest wciąż nieznana, jednak stale rośnie liczba dowodów świadczących o autoimmunologicznym podłożu choroby. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się obecność przeciwciał oligoklonalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) oraz ich brak w surowicy pacjentów z SM, co wskazuje na aktywację układu immunologicznego. Z pośrednich obserwacji wynika, że stosowanie w leczeniu czynników immunomodulujących, takich jak: IFN-β czy octan glatirameru, oraz leków immunosupresyjnych: cyklofosfamid, metotrexat, mitoxantron, może spowalniać rozwój choroby interferując z toczącym się procesem zapalnym [2]. Ponadto we krwi obwodowej chorych obserwowano spadek liczby supresyjnych limfocytów T $CD4^+$ $CD45R^+$, jak również zaburzenie ich funkcji supresyjnych po aktywacji *in vitro*, co może sugerować defekt mechanizmów regulacyjnych [1].

Wielu badaczy uważa, że zasadniczą rolę w patogenezie SM odgrywają autoreaktywne limfocyty T. Komórki te izolowane z krwi pacjentów wykazują ekspresję IL-2R (CD25). Jednocześnie stwierdzono, iż limfocyty T swoiste względem MBP stanowią heterogenną populację komórek u chorych na SM w stosunku do ludzi zdrowych [1]. U pacjentów z ostrym napadem choroby izolowano autoreaktywne limfocyty T, które wykazywały produkcję cytokin profilu komórek TH1: IFN-γ i TNF-α, podczas gdy klony komórek izolowane w trakcie remisji wykazywały zwiększoną produkcję IL-10 i TGF-β [7].

Przypuszcza się, że aktywacja autoreaktywnych limfocytów T zachodzi obwodowo i może być wynikiem krzyżowej reakcji w trakcie np.: infekcji wirusowej (mimikra molekularna), stymulacji na zasadzie „przygodnego widza", stymulacji przez superantygeny lub produkty patogenów naśladujące cytokiny, chemokiny bądź receptory chemokin gospodarza [8]. Aktywowane limfocyty T wykazują ekspresję LFA-1 oraz VLA-4, które ułatwiają przyleganie do komórek śródbłonka. U chorych na SM stwierdzono w naczyniach mikrokrążenia mózgu oraz w obrębie plak wysoką ekspresję cząstek MHC klasy II, ICAM-1, VCAM-1, receptora aktywatora urokinazy plazminogenu, E-selektyny [9]. Część spośród wspomnianych molekuł adhezyjnych może uczestniczyć w migracji limfocytów T do miąższu mózgu, a wysoka ekspresja antygenów (Ag) zgodności tkankowej MHC klasy II może prowadzić do aktywacji limfocytów T autoreaktywnych [8]. Po rozpoznaniu autoantygenu limfocyty aktywują Mf, które wydzielają wolne rodniki tlenowe (ROIs), tlenek azotu (NO), enzymy proteolityczne i na drodze bezpośredniej fagocytozy uszkadzają osłonki mielinowe neuronów. Uwalniane przez komórki TH1: IFN-γ i TNF-α uszkadzają oligodendrocyty oraz mogą stymulować astrocyty lub mikroglej do ekspresji molekuł kostymulujących i pełnienia funkcji APC. Jednocześnie istnieją doniesienia, iż w procesie degradacji osłonek mielinowych pewną rolę odgrywają także limfocyty T cytotoksyczne, w tym również limfocyty T$\gamma\delta$ [1, 10]. Obserwowane zmiany demielinizacyjne prowadzą do licznych dysfunkcji OUN.

W 1948 r. E. Kabat odkrył podwyższony poziom oligoklonalnych immunoglobulin w PMR chorych na SM. Parametr ten stanowi do dzisiaj jeden z najczulszych markerów tej choroby (ponad 95% pacjentów pozytywnych), niestety niespecyficzny, gdyż wysokie wartości odnotowano również w innych schorzeniach demielinizacyjnych. Ciekawym spostrzeżeniem było odkrycie, że u wielu pacjentów występowały przeciwciała skierowane przeciwko immunodominującemu peptydowi MBP (85-99), który był preferencyjnie rozpoznawany przez autoreaktywne limfocyty T. Sugeruje to udział limfocytów T w podtrzymywaniu produkcji przeciwciał antymielinowych. Limfocyty B mogą wytwarzać autoprzeciwciała po aktywacji analogicznej do limfocytów T i potęgować destrukcję własnych tkanek w procesie autoagresji. Nie ma jednak wystarczających dowodów na to, by uznać limfocyty B lub autoprzeciwciała za przyczynę rozwoju SM. Istnieją również przeciwstawne

doniesienia, które świadczą o udziale autoprzeciwciał w mediowaniu procesu remielinizacji [8].

Tematem dyskusji pozostaje rola astrocytów i mikrogleju w patogenezie SM i w rozwoju procesu zapalnego w OUN. Istnieją doniesienia o pełnionej przez nie roli efektywnych APC, które podtrzymują toczący się proces zapalny, ale równocześnie sugeruje się, że wykazują aktywność immunosupresyjną. Komórki mikrogleju uznaje się za bardziej kompetentne APC w porównaniu z astrocytami, ze względu na jednoczesną ekspresję MHC klasy II oraz cząstek kostymulujących B-7, których obecności nie stwierdzono na astrocytach w miejscach uszkodzeń substancji białej. Obserwowano również, że astrocyty aktywują *in vitro* limfocyty T tylko po uprzednim kontakcie z mikroglejem. Metodą immunohistochemiczną wykazano, że komórki mikrogleju i astrocyty są zdolne do produkcji szeregu cytokin: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α, TGF-β [8]. Ponadto astrocyty mogą produkować IFN-γ i wykazywać ekspresję molekuły CD1, której obecność stwierdzono w plakach demielinizacyjnych u chorych na SM (szczególnie CD1b) [11].

Uwalnianie cytokin przeciwzapalnych TGF-β i IL-10 przez mikroglej i astrocyty może świadczyć o tym, że komórki te mogą uczestniczyć w negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej w OUN i działać supresyjnie na limfocyty TH1. Ponadto wykazano, że na astrocytach i neuronach ulegają ekspresji molekuły FasL, co może stanowić immunologiczną barierę mózgową, ograniczającą infiltrację komórek zapalnych. Cząsteczki FasL są obecne również na powierzchni limfocytów T i komórkach mikrogleju, jednak w trakcie SM obserwowano obniżoną ekspresję FasL na powierzchni autoreaktywnych limfocytów T, co może wskazywać na zaburzenie zdolności indukowania apoptozy tych komórek u chorych na SM [8].

Ostatnie doniesienia wskazują na zasadniczą rolę komórek dendrytycznych (DC) w patogenezie chorób autoimmunologicznych. Pozyskane z krwi obwodowej chorych na SM komórki dendrytyczne wykazują wysoką ekspresję molekuły CD1a, za pośrednictwem której mogą prezentować lipidowe Ag limfocytom NKT, jak również wytwarzają większe ilości cytokin prozapalnych (TNF-α, IL-6 oraz IL-12) w porównaniu z grupą kontrolną ludzi zdrowych [12]. Jednocześnie uznanym faktem jest, że DC mają najwyższą zdolność prezentacji Ag naiwnym limfocytom T spośród APC, są więc najlepszymi kandydatami do indukowania przełamania tolerancji na autoantygeny. Przypuszcza się, że leczenie IFN-β hamuje zdolność uwalniania IL-12 przez DC, co wpływa supresyjnie na wydzielanie IFN-γ przez limfocyty efektorowe [13].

Do innych zmian towarzyszących SM należy wysoki poziom chemokin obserwowany w PMR pacjentów cierpiących na SM, takich jak: IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9) oraz RANTES (CCL5), przy jednoczesnym spadku MCP-1. Blisko 90% limfocytów T izolowanych z PMR, a tylko 40% komórek krwi obwodowej wykazało wysoką ekspresję receptorów dla IP-

10/MIG (CXCR3). W przypadku receptorów dla RANTES (CCR5) różnica między komórkami PMR i krwi nie była tak wysoka. Przypuszcza się, że ekspresja receptorów chemokin na powierzchni limfocytów, aktywowanych Mf, czy monocytów może mieć bezpośredni związek z patogenezą SM. Same chemokiny prócz roli chemoatraktantów pełnią funkcje regulacyjne w procesach aktywowania limfocytów T, ich różnicowania oraz w wytwarzaniu przez nie cytokin [2]. W modelu zwierzęcym choroby, chemokiny pojawiają się w mózgu wtórnie w stosunku do komórkowego nacieku zapalnego [8].

1.3. Alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia u zwierząt (EAE).

Bogatym źródłem informacji na temat roli układu immunologicznego w patogenezie SM są badania prowadzone na zwierzętach. Rozwój wiedzy o funkcjonowaniu układu odpornościowego, możliwość manipulacji jego komponentami, bezpośrednia ocena składników immunologicznych w obwodowym układzie nerwowym z udziałem nowoczesnych metod badawczych pozwala na lepsze zrozumienie natury zaburzeń odpowiedzi immunologicznej w tym schorzeniu, jak również regulację tej odpowiedzi. Pokłada się ogromne nadzieje w tym, że uzyskana wiedza ułatwi opracowanie skutecznej metody leczenia SM i innych chorób autoimmunizacyjnych.

Powszechnie stosowanym modelem eksperymentalnym imitującym SM jest alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE), które można wywołać u genetycznie predysponowanych szczepów myszy, szczurów czy też małp rhesus poprzez immunizację Ag mieliny podawanymi wraz z kompletnym adjuwantem Freunda (CFA). EAE, podobnie jak SM, jest demielinizacyjną chorobą OUN, a jej przebieg zależy również od czynników genetycznych i środowiskowych. W odróżnieniu jednak od SM etiologia EAE jest zdefiniowana. Za rozwój choroby odpowiedzialne są swoiste dla składników mieliny limfocyty TH1 $CD4^+$, które wytwarzają IFN-γ, IL-2, TNF-β [14]. W patogenezie EAE zaangażowane są również limfocyty TH2, limfocyty T $CD8^+$, Mf, limfocyty B oraz prawdopodobnie komórki NK.

Inspiracją do opracowania modelu zwierzęcego imitującego swym przebiegiem SM były zaburzenia neurologiczne obserwowane u niektórych ludzi, w trakcie pierwszych prób szczepień przeciw wirusowi wścieklizny, wykonywanych pod koniec XIX wieku. Szczepionkę pozyskiwano z homogenatu rdzenia kręgowego królików infekowanych wirusem wścieklizny. Zespół objawów, który nazwano poszczepiennym zapaleniem mózgu i rdzenia, początkowo przypisywano wirusowi, jednak Remlinger wykazał, że za rozwój choroby odpowiedzialne są czynniki zawarte w tkance nerwowej. W 1947 r. E. Kabat z użyciem adjuwantu indukował pierwsze alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) u zwierząt naczelnych. Małpy, które otrzymały homogenat rdzenia kręgowego pozbawiony wirusa, rozwijały po pewnym czasie chorobę demielinizacyjną w identyczny sposób jak zwierzęta immunizowane homogenatem

zawierającym wirus. Z kolei w 1949 r. Olitsky wywołał demielinizacyjną chorobę u myszy i od tego momentu mysie EAE zostało uznane za model zwierzęcy choroby demielinizacyjnej OUN. W 1951 r. odkryto, że mielina zbudowana jest w 50% z proteolipidu (PLP), a w 1962 r. Einstein zidentyfikował zasadowe białko mieliny (MBP) jako Ag OUN wywołujący EAE (30% mieliny). Ostatnim odkrytym składnikiem indukującym EAE była mielinowa glikoproteina oligodendrocytów (MOG) (0,01-0,05% mieliny) [6]. Dalsze badania koncentrowały się nad określeniem mechanizmów leżących u podstaw EAE.

W 1981 r. udowodniono udział swoistych względem Ag mieliny limfocytów T $CD4^+$ w indukcji EAE poprzez adoptywny transfer choroby na naiwnych syngenicznych biorców z udziałem tych komórek [14]. Postać choroby wywołana na drodze adoptywnego transferu komórek efektorowych została określona mianem pasywnej w odróżnieniu od aktywnej postaci EAE, indukowanej samym Ag z adjuwantem. Dalsze badania prowadzone w modelu zwierzęcym SM wykazały obecność autoreaktywnych limfocytów T swoistych dla antygenów mieliny także w organizmie zdrowych osobników.

Po odkryciu w 1986 r. subpopulacji limfocytów pomocniczych TH1 i TH2 różniących się profilem wytwarzanych cytokin [15], naukowcy podjęli badania w celu ustalenia, do której populacji należą komórki efektorowe EAE. Wykazano, że autoreaktywne MBP-swoiste komórki odznaczały się produkcją cytokin typowych dla limfocytów TH1, a transfer tych komórek indukował EAE u naiwnych biorców.

Obecnie alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia jest charakteryzowane jako reakcja nadwrażliwości typu późnego (DTH), która rozwija się wskutek infiltracji OUN przez limfocyty TH1 uwalniające cytokiny prozapalne (IFN-γ, TNF-β, IL-2) oraz Mf. Autoreaktywne komórki T rozpoznają Ag mieliny, które mogą być prezentowane przez okołonaczyniowe Mf bariery krew-mózg [2]. Po aktywacji limfocyty T uwalniają cytokiny i chemokiny, które zmieniają ekspresję molekuł adhezyjnych na otaczających komórkach, zwiększa się przepuszczalność bariery krew-mózg i dochodzi do rekrutacji komórek z krążenia do miąższu mózgu.

Rolę poszczególnych cytokin w rozwoju EAE badano podając egzogenne cytokiny, ich inhibitory, wykorzystując w doświadczeniach szczepy myszy z odpowiednim defektem genetycznym (myszy typu „knock-out") oraz oceniano poziom mRNA cytokin metodami biologii molekularnej. Dzięki wymienionym badaniom uzyskano wiele informacji o mechanizmach regulacyjnych odpowiedzi immunologicznej.

Stwierdzono między innymi, że podanie zwierzętom INF-γ, wbrew oczekiwaniom, redukuje objawy EAE, natomiast podanie przeciwciał neutralizujących INF-γ (mAb anty-IFN-γ) zaostrza proces chorobowy. Uważa się, że IFN-γ wywołujący wielokierunkowe efekty nie jest niezbędny w rozwoju EAE. U pacjentów z SM obserwowano, że podanie INF-γ prowadzi do pogorszenia przebiegu choroby, co może sugerować odmienną funkcję tej cytokiny u różnych gatunków [16]

W badaniach nad rolą TNF-α w EAE wykazano, że iniekcja TNF-α stymuluje rozwój EAE i proces demielinizacji u zwierząt, natomiast mAb anty-TNF-α znacznie redukują proces zapalny w OUN i uniemożliwiają rozwój pasywnej postaci choroby. Zadowalające wyniki leczenia EAE uzyskano stosując również rozpuszczalną formę receptora TNF-α (sTNF-R) [17]. Z kolei badania z wykorzystaniem defektywnych szczepów myszy TNF-α -/- dostarczyły sprzecznych wyników.

W badaniach nad rolą IL-6 wykazano, że podawanie zwierzętom tej cytokiny zaostrza przebieg EAE, a blokowanie działania IL-6 hamuje rozwój choroby. Myszy defektywne IL-6 -/- są odporne na indukcję EAE, jednak iniekcja IL-6 w fazie przedklinicznej przywraca możliwość rozwoju choroby u tych zwierząt. Adoptywny transfer aktywowanych *in vitro* limfocytów T z defektem produkcji IL-6 nie stymuluje rozwoju choroby, zarówno u biorców z defektem produkcji IL-6, jak i bez defektu. Transfer limfocytów T wydzielających IL-6 prowadzi z kolei do rozwoju EAE u biorców defektywnego szczepu myszy IL-6 -/- [18]. Przedstawione obserwacje na temat roli IL-6 w EAE świadczą o jej krytycznym udziale w fazie indukcyjnej EAE.

W badaniach nad mechanizmami immunologicznymi w EAE obserwowano, że szereg chemokin oraz ich receptory pełnią istotną rolę w przebiegu choroby. Zmiany w poziomie chemokin: MCP-1, RANTES, MIP-1α, IP-10 należących do rodziny C-C i C-X-C odnotowano w fazie początkowej choroby oraz w czasie remisji EAE. W trakcie ataku choroby, w OUN stwierdzono wysoką ekspresję receptorów chemokin: CCR1, CCR2 i CCR5. Podawanie zwierzętom mAb neutralizujących poszczególne chemokiny wykazało, że krytyczna w fazie indukcyjnej EAE jest MIP-1α, natomiast mediatorem nawrotu choroby jest MCP-1 [19]. Stwierdzono, że źródłem chemokin mogą być autoreaktywne limfocyty T, które po rozpoznaniu Ag mieliny w OUN same uwalniają chemokiny lub stymulują komórki miąższu mózgu do ich wydzielania, co prowadzi do rekrutacji Mf i limfocytów T z krążenia. Natomiast w badaniach *in vitro* wykazano, że chemokiny mogą być produkowane przez astrocyty, mikroglej, pericyty i komórki śródbłonka [2].

Poza pozytywną regulacją odpowiedzi immunologicznej w przebiegu EAE przez cytokiny prozapalne, wspomniana reakcja zapalna jest również regulowana negatywnie przez przeciwzapalne cytokiny: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 oraz TGF-β. Z wielu obserwacji wynika, że cytokiny IL-4, IL-10 oraz TGF-β odpowiadają za proces remisji choroby i zdrowienia zwierząt. Podawanie IL-4 redukuje objawy choroby u zwierząt, a znaczny wzrost stężenia tej cytokiny odnotowano po podawaniu Ag mieliny drogą pokarmową lub wysokich dawek Ag dootrzewnowo [20]. Z kolei u myszy defektywnych IL-4 -/- obserwowano EAE o ciężkim przebiegu klinicznym, z nasiloną infiltracją komórek zapalnych do OUN. Warto tutaj zaznaczyć, iż u myszy IL-4 -/- w fazie zdrowienia odnotowano zwiększony poziom IL-10 w OUN [2].

IL-10 wytwarzana przez limfocyty TH2, limfocyty T regulacyjne, Mf, astrocyty, mikroglej, może blokować produkcję cytokinową komórek TH1 oraz hamować prezentację Ag i produkcję NO przez Mf. Podając IL-10 *in vivo* w trakcie rozwoju EAE uzyskiwano niejednoznaczne wyniki, natomiast podając mAb anty-IL-10 obserwowano normalny lub tylko nieznacznie cięższy przebieg choroby. Z kolei myszy defektywne IL-10-/- są bardziej podatne na EAE i rozwijają cięższą postać choroby [21]. Ciekawej obserwacji dokonano w doświadczeniach z użyciem transgenicznych myszy zdolnych do produkcji ludzkiej IL-10. Zwierzęta te wykazywały niską zachorowalność oraz łagodniejszy przebieg EAE, jednak stwierdzono u nich proliferację limfocytów TH1. Przypuszczalnie IL-10 hamuje funkcje efektorowe limfocytów TH1, natomiast cytokina ta nie ma wpływu na różnicowanie się komórek [22].

TGF-β jest cytokiną wytwarzaną przez liczne komórki organizmu, która posiada plejotropowy wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego. Liczne badania wskazują na to, że cytokina ta ma istotny wpływ na przebieg EAE. Podawanie *in vitro* TGF-β do hodowli komórek swoistych względem Ag mieliny redukuje ich zdolność do przeniesienia EAE na biorców, natomiast podawanie *in vivo* łagodzi przebieg choroby. Aplikowanie mAb anty-TGF-β w początkowej fazie choroby zaostrza kliniczne objawy EAE i powoduje bardziej rozległe uszkodzenia. Ponadto obserwowano, że TGF-β hamuje objawy innych eksperymentalnych chorób autuimmunologicznych, co wskazuje na immunoregulacyjną rolę tego czynnika [2]. W innych badaniach wykazano, że wytwarzanie TGF-β1 miejscowo, w miąższu mózgu przez komórki gleju prowadzi do nasilenia infiltracji komórek zapalnych, powstawania uszkodzeń oraz zwiększa podatność na choroby OUN mediowane przez komórki układu immunologicznego [23]. Wobec powyższego wydaje się, że lokalna ekspresja TGF-β w OUN nie przyczynia się do zahamowania rozwoju EAE, a nawet może potęgować rozwój choroby. Istotnym zagadnieniem przyszłych badań staje się ustalenie, czy miejscem protekcyjnego działania TGF-β jest OUN, czy obwodowe narządy limfatyczne.

Mimo wielu podobieństw między stwardnieniem rozsianym a alergicznym zapaleniem mózgu i rdzenia, należy również pamiętać o istotnych różnicach tych dwóch procesów. Metody, które u zwierząt prowadziły do zahamowania rozwoju lub nawet wyleczenia EAE, u ludzi mogą pozostawać bez wpływu na SM, bądź nawet pogarszać przebieg choroby. W próbach klinicznych IFN-γ, który w EAE wykazywał efekt protekcyjny, powodował zaostrzenie choroby u pacjentów ze SM [16].

Stosowanie w trakcie leczenia Lenerceptu – dimeru białkowego zbudowanego z dwóch cząstek zewnątrzkomórkowej domeny receptora TNF i łańcucha ciężkiego IgG1 – prowadziło u pacjentów do zaostrzenia przebiegu klinicznego SM, podczas gdy analogiczny kompleks stosowany u zwierząt zapobiegał rozwojowi EAE [24]. Podobnie nie uzyskano żadnej poprawy stanu pacjentów leczonych Ag mieliny podawanymi doustnie. Pomimo

pewnych różnic pomiędzy SM i jego modelem zwierzęcym, EAE dostarcza wielu informacji o mechanizmach regulacji odpowiedzi immunologicznej, jest pomocny w opracowaniu nowych metod terapii, jak również umożliwia przewidzieć niekorzystne efekty terapii.

1.4. Metody terapii stwardnienia rozsianego

1.4.1. Leczenie stosowane w praktyce klinicznej

Współcześnie metody leczenia stwardnienia rozsianego polegają na leczeniu rzutu choroby, łagodzeniu objawów oraz leczeniu modyfikującym przebieg choroby. Kortykosteroidy są lekami szeroko stosowanymi w okresie rzutu choroby, skracają okres niesprawności, likwidują objawy rzutu lub znacznie je łagodzą, ale nie wykazują korzystnego wpływu na długofalowy przebieg choroby, natomiast wiążą się ze znacznymi objawami niepożądanymi [25, 26].

Wśród leków modyfikujących przebieg SM dostępne są trzy preparaty o odmiennym mechanizmie działania: interferon β, glatiramer oraz poliwalentne immunoglobuliny. Rekombinowany interferon β 1-b zmniejsza częstość i ciężkość rzutów oraz ilość nowych ognisk obserwowanych w obrazie MRI. Interferon korzystnie modyfikuje odporność komórkową poprzez zwiększenie produkcji przeciwzapalnej cytokiny IL-10 oraz zmniejszenie produkcji IFN-γ. Jednak u 30% pacjentów leczonych tym preparatem powstają przeciwciała neutralizujące, obniżające jego aktywność i zmniejszające efekt terapeutyczny. Z kolei Interferon β 1-a to również rekombinowany interferon, ale od IFN-β 1-b różni się większą stabilnością biologiczną [25].

Glatiramer jest syntetycznym polimerem L-alaniny, kwasu L-glutaminowego, L-lizyny oraz L-tyrozyny [27]. Dokładny mechanizm jego działania nie jest znany. W licznych badaniach wykazano, iż substancja ta może konkurować z wieloma antygenami OUN (MBP, PLP, MOG) o miejsce wiązania w obrębie MHC klasy II, zaburzając fazę indukcyjną i efektorową odpowiedzi immunologicznej. Co więcej stwierdzono, że kompleksy glatiramer–MHC klasy II preferencyjnie indukują limfocyty supresyjne zdolne do produkcji cytokin profilu limfocytów TH2, a tym samym zdolnych do hamowania procesu zapalnego mediowanego przez komórki TH1 [28]. Do leków zmniejszających postęp choroby należą też poliwalentne immunoglobuliny, których podawanie zmniejsza ilość rzutów [29].

Stosowane w przeszłości w leczeniu SM leki immunosupresyjne, antymitotyki nie są obecnie zalecane, ze względu na silne działanie toksyczne i rozliczne objawy niepożądane. Natomiast leczenie objawowe SM odgrywa ważną rolę w praktyce [25, 26, 29]. Obejmuje

ono zwalczanie objawów składających się na obraz kliniczny tej jednostki chorobowej, takich jak: niedowłady, spastyczność, upośledzenie poruszania się, niezborność, drżenie mięśniowe, zawroty głowy, zaburzenia funkcji zwieraczy, funkcji seksualnych, zespoły zmęczenia, napadowe kurcze, parestezje, zaburzenia widzenia, zaburzenia psychiatryczne, zaparcia.

Ze względu na charakter doświadczalny niniejszej pracy, zagadnienia terapii SM są jedynie sygnalizowane.

1.4.2. Eksperymentalne metody terapii stwardnienia rozsianego

Od szeregu lat w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie próbuje się opracować metodę terapii SM pozwalającą w sposób swoisty hamować proces zapalny w OUN. Do eksperymentalnych metod terapii SM należą, m. in. następujące strategie:

i. Immunizacja zwierząt laboratoryjnych peptydami obszarów zmiennych V receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) pochodzących z komórek T autoreaktywnych. Niestety badania wykazały, iż ten sposób leczenia EAE nie jest efektywny [30].

ii. Szczepienie atenuowanymi autoreaktywnymi limfocytami T, które indukuje wytwarzanie przeciwciał anty-klonotypowych prowadzących w konsekwencji do delecji swoistych autoreaktywnych limfocytów T i zahamowania rozwoju EAE [31].

iii. „Odczulanie" syntetycznymi analogami peptydów łańcucha β Ag MHC klasy II. Zahamowanie rozwoju EAE u zwierząt doświadczalnych tłumaczy się powstawaniem przeciwciał auto-anty-MHC II, co interferuje z procesem rozpoznania Ag przez limfocyty T [32]. Jednak u ludzi ze względu na dużą złożoność kompleksu MHC ten sposób terapii jest znacznie utrudniony.

iv. Metoda terapii genowej, będąca w fazie badań doświadczalnych, wykorzystuje autoreaktywne, antygenowo swoiste limfocyty T jako nośnika odpowiednich genów. Efekt terapeutyczny polegać ma na uwalnianiu w miejscu toczącego się procesu zapalnego cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 lub IL-4 hamujących działanie patogennych limfocytów TH1. Ponadto genetycznie zmodyfikowane limfocyty T mogą dostarczać do miejsca odczynu zapalnego substancje ułatwiające regenerację oligodendrocytów. Możliwe, że w przyszłości metoda ta zostanie wykorzystana w leczeniu chorych na SM [33].

v. Możliwość zastosowania estrogenu w terapii schorzeń autoimmunizacyjnych. Wykazano, że podanie 17 β-estradiolu łagodzi przebieg EAE, a podanie półsyntetycznej pochodanej 17 β-estradiolu, stosowanej w doustnych środkach antykoncepcyjnych, znacznie redukuje objawy kliniczne choroby u myszy. Mechanizm działania leku jest wynikiem zmniejszenia

produkcji cytokin prozapalnych takich jak IFN-γ, TNF-α oraz IL-6 przez aktywowane komórki T, redukcji syntezy chemokin oraz autoprzeciwciał, przy jednoczesnym wzroście syntezy TGF-β. Obserwuje się również hamowanie powstawania nacieku zapalnego w OUN [34].

vi. Blokowanie napływu antygenowo swoistych limfocytów T do OUN poprzez podawanie zwierzętom mAb anty-VLA-4 prowadzi do znacznego złagodzenia objawów chorobowych u myszy. Obecnie podobny efekt obserwowano po zastosowaniu *in vivo* syntetycznego antagonisty VLA-4 [35]. Badania kliniczne skuteczności działania terapeutycznego przeciwciał anty-VLA-4 wykazały redukcję ognisk zapalnych w mózgu oraz mniejszą ilość nawrotów choroby w przeciągu sześciu miesięcy kuracji [36].

vii. Zwiększona zapadalność na SM na obszarach o mniejszym nasłonecznieniu, jak również w regionach o niskim spożyciu witaminy D, pozwoliły na stworzenie hipotezy, że wytwarzany w naszym organizmie hormon kalcytriol [1,25 $(OH)_2D_3$] może działać zapobiegawczo w rozwoju SM u genetycznie predysponowanych osobników. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że podawanie 1,25 $(OH)_2D_3$ znacznie redukowało przebieg kliniczny EAE, co było związane z syntezą IL-4, TGF-β oraz hamowaniem migracji komórek zapalnych do OUN. W innych badaniach wykazano, że bezpośrednim punktem działania 1,25 $(OH)_2D_3$ mogą być limfocyty T CD4 [37, 38].

viii. Możliwość wykorzystania populacji komórek dendrytycznych zdolnych do indukowania stanu tolerancji w leczeniu schorzeń o podłożu autoimmunizacyjnym. W badaniach laboratoryjnych wykazano, iż podskórne podanie zwierzętom DC traktowanych uprzednio *in vitro* IFN-γ lub TGF-β prowadziło do znacznego złagodzenia przebiegu klinicznego EAE. Przypuszcza się, że u podłoża tolerancji indukowanej przez DC leży między innymi zjawisko apoptozy komórek T. Obserwacje poczynione w badaniach *in vitro* ludzkich DC są bardzo obiecujące. Wykazano, że hodowla *in vitro* prekursorów ludzkich DC w obecności odpowiednich cytokin prowadzi do generacji populacji DC, które stymulują komórki T do produkcji cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-4 oraz IL-10 [12].

ix. W ciągu ostatnich lat wiele nadziei wiązano z terapią polegającą na wywołaniu tolerancji przez podanie Ag na śluzówki. W warunkach doświadczalnych zjawisko protekcji obserwowano po tolerancji zwierząt zasadowym białkiem mieliny (MBP) wprowadzonym *per os* lub na błonę śluzową nosa. Wykazano, iż za obserwowany stan tolerancji były odpowiedzialne limfocyty Ts produkujące cytokiny przeciwzapalne, takie jak: IL-4, IL-10 oraz TGF-β. Pozytywne wyniki badań uzyskane na zwierzętach laboratoryjnych niestety nie znalazły potwierdzenia w próbach klinicznych podczas leczenia pacjentów z SM [39, 40].

1.5. Mechanizmy zaangażowane w utrzymaniu tolerancji obwodowej

W klasycznym ujęciu stan tolerancji był rozumiany, jako brak odpowiedzi immunologicznej na własne Ag organizmu, będący wynikiem eliminacji w okresie noworodkowym „zakazanych" klonów komórek B i T. Obecnie wiadomo, że za stan tolerancji odpowiadają złożone mechanizmy regulacyjne związane z delecją, anergią klonalną oraz z aktywną supresją mediowaną przez komórki regulacyjne. Autoreaktywne limfocyty zdolne do rozpoznania własnych Ag, np.: mózgu, tyreoglobuliny czy kolagenu, występują u zdrowych osobników i pozostają nieszkodliwe w normalnych warunkach, a co więcej, mogą pełnić ważną funkcję w utrzymaniu tkankowej homeostazy [41].

W związku z tym, że proces selekcji negatywnej nie prowadzi do eliminacji wszystkich potencjalnie groźnych limfocytów, muszą istnieć mechanizmy nie dopuszczające do ich aktywacji na obwodzie. Przypuszcza się, że już na poziomie selekcji w grasicy powstają tzw. naturalne limfocyty T regulacyjne (Tr), określane w literaturze także jako supresyjne (Ts). Do takich komórek zalicza się limfocyty T o fenotypie $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD25^+$, które hamują odpowiedź immunologiczną *in vivo* i *in vitro* na drodze antygenowo nieswoistej. Komórki regulacyjne stanowią populacje względnie krótko żyjące, dlatego stale poszukuje się metod pozwalających na ewentualną ich aktywację, co mogłoby w pewnych przypadkach znaleźć zastosowanie w terapii pozwalając na manipulowanie odpowiedzią immunologiczną.

Odpowiedź immunologiczna poza regulacją przez naturalne, antygenowo nieswoiste komórki Ts ($CD4^+$ $CD25^+$) znajduje się również pod negatywną kontrolą antygenowo swoistych limfocytów Ts. Mechanizmy negatywnej regulacji mediowanej przez antygenowo swoiste komórki Ts najlepiej zostały poznane w badaniach nadwrażliwości kontaktowej (CS). W układzie tym wykazano, że odpowiedź TH1-zależna znajduje się pod negatywną kontrolą dwóch różnych populacji komórek Ts o fenotypie $TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$, jak również antygenowo swoistych limfocytów $TCR\gamma\delta^+$ [42, 43].

Warto również zaznaczyć, że w trakcie nabytej odpowiedzi immunologicznej powstają populacje komórek regulacyjnych, które przypuszczalnie mogą się różnicować z $CD4^+$ $CD25^-$, jak również z $CD4^+$ $CD25^+$ [44]. Opisano kilka subpopulacji limfocytów $CD4^+$ o aktywności supresyjnej, mediowanej głównie przez uwalniane cytokiny. Należą do nich komórki: Tr1 produkujące głównie IL-10, TH3 produkujące TGF-β, oraz klasyczne TH2 wydzielające IL-4, IL-10 oraz IL-13. Jak się obecnie uważa, główną rolą komórek Ts jest prawdopodobnie utrzymanie obwodowej tolerancji i homeostazy.

1.5.1. Tolerancja pokarmowa

Podawanie antygenów drogą pokarmową jest klasyczną metodą indukowania swoistej immunosupresji stosowaną już przez starożytnych władców, którzy przyjmowali niewielkie dawki trucizn w obawie przed otruciem. Bliższe poznanie mechanizmu tolerancji pokarmowej zawdzięcza się badaniom laboratoryjnym na zwierzętach, opisanych po raz pierwszy przez Wells'a w 1911 r. Jednak dopiero w 1946 r. natura tolerancji pokarmowej została wyjaśniona przez Chase'a i Salzberger'a [45]. Naukowcy od lat badają mechanizmy regulacyjne związane z fenomenem tolerancji pokarmowej, których wyjaśnienie stwarza nadzieje na opracowanie nowych metod leczenia, w tym również terapii chorób autoimmunologicznych.

W wielu modelach zwierzęcych, stanowiących odpowiedniki ludzkich chorób autoimmunizacyjnych, bada się wpływ podawania autoantygenów drogą pokarmową na rozwój choroby. Podanie odpowiednich antygenów *per os* prowadzi do złagodzenia przebiegu klinicznego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia, eksperymentalnego zapalenia stawów, syndromu antyfosfolipidowego, insulinozależnej cukrzycy, zapalenia nerwów obwodowych [46]. Określenie jednolitego mechanizmu tolerancji pokarmowej jest jednak utrudnione przez różnice związane z podłożem genetycznym, wiekiem zwierząt, funkcjonowaniem mikroflory bakteryjnej, integralnością bariery nabłonkowej, profilem lokalnie wydzielanych cytokin, odmienną ekspresją molekuł adhezyjnych, czy też dawką i strukturą Ag [45].

Komórki regulacyjne generowane w trakcie karmienia szczurów Lewis niskimi dawkami MBP, które hamują funkcje komórek efektorowych TH1, należą do populacji limfocytów T $CD8^+$. W podobnym schemacie badań prowadzonych na myszach transgenicznych, karmionych MBP lub PLP, za aktywną supresję są odpowiedzialne prócz limfocytów T $CD8^+$ również limfocyty T $CD4^+$. Opisane klony komórek Ts są identyczne pod względem budowy TCR oraz restrykcji MHC do komórek Tef, jednak po stymulacji Ag wydzielają supresyjne cytokiny (TGF-β, IL-4, IL-10), które hamują proliferację i uwalnianie cytokin przez komórki Tef, natomiast efekt supresji zostaje zniesiony w obu przypadkach po wstrzyknięciu mAb anty-TGF-β [47, 48].

Inne badania wykazały, że niskie dawki Ag podawane drogą pokarmową zwierzętom bez adjuwantu, prowadzą do generowania populacji limfocytów T $CD4^+$ $CD25^+$ w tkankach obwodowych, przypuszczalnie alternatywnie do grasiczej drogi ich powstawania. Obwodowe komórki T $CD4^+$ $CD25^+$ po stymulacji są zdolne produkować TGF-β oraz IL-10, wykazują wysoką ekspresję CTLA-4 i fenotyp komórek pamięci [49].

Zaobserwowano jednocześnie, że po zastosowaniu niskich dawek Ag dochodzi do różnicowania naiwnych komórek T $CD4^+$ w limfocyty TH3, które nie wykazują ekspresji

CD25, są oporne na delecję i wydzielają duże ilości TGF-β. W przypadku supresji mediowanej przez limfocyty TH3 może być ona zniesiona *in vitro* przez podanie mAb anty-TGF-β, natomiast efekt supresji indukowanej przez $CD4^+$ $CD25^+$ jest nieodwracalny. Przypuszcza się, że komórki $CD4^+$ $CD25^+$ posiadają zdolność wiązania TGF-β na swojej powierzchni i wykorzystywania go w bezpośrednim kontakcie komórek, co wskazuje na odmienny mechanizm działania opisanych populacji komórek supresyjnych [50].

Z kolei wysokie dawki Ag podane drogą pokarmową w odróżnieniu od niskich dawek przenikają do krążenia w postaci nieprzetworzonej, bądź jedynie częściowo zmienionej, w wyniku czego dochodzi do ekspozycji obwodowych limfocytów T na dany Ag. Tolerancja obserwowana u myszy traktowanych wysokimi dawkami OVA jest głównie wynikiem delecji klonalnej antygenowo swoistych limfocytów T. Istnieją również doniesienia na temat generowania pod wpływem wysokich dawek Ag komórek Ts $CD4^+$, nieswoistych względem Ag i cechujących się wysoką ekspresją FasL oraz sekrecją IL-4, IL-10, TGF-β. Przypuszcza się, że komórki te powstają w wątrobie lub układzie GALT [48, 51].

Podsumowując, należy zaznaczyć, że istnieje wiele sprzecznych doniesień dotyczących generowania komórek regulacyjnych w układzie immunologicznym błon śluzowych. Poza istnieniem klasycznych komórek T regulacyjnych ($CD4^+$ $CD25^+$) oraz limfocytów regulacyjnych Tr1 i TH3, funkcję komórek supresyjnych mogą również pełnić limfocyty niekonwencjonalne: CD8αα, podwójnie negatywne $CD4^-$ $CD8^-$, podwójnie pozytywne $CD4^+$ $CD8^+$, pochodzenia pozagrasiczego z receptorami TCRαβ, jak również limfocyty TCRγδ. Aktywność supresyjna tych komórek jest wynikiem bezpośredniego kontaktu z komórkami efektorowymi oraz uwalniania cytokin, głównie: IL-4, IL-10, TGF-β [45]. Z przytoczonych informacji na temat mechanizmów tolerancji pokarmowej wynika, że jest to proces bardzo złożony, w którym zaangażowane jest wiele populacji komórek regulacyjnych i których powstawanie uwarunkowane jest wieloma czynnikami.

1.6. Skóra jako miejsce indukcji odpowiedzi immunologicznej

Skóra, podobnie jak błony śluzowe, jest stale eksponowana na licznie antygeny znajdujące się w otoczeniu. Układ odpornościowy skóry (SIS), który obejmuje komórki naskórka i skóry właściwej stanowiące tkankę limfatyczną związaną ze skórą (SALT), na skutek szkodliwego działania mikroorganizmów, alergenów, alloantygenów czy też antygenów nowotworowych, aktywuje mechanizmy zmierzające do eliminacji zagrożenia.

Najbardziej efektywnymi komórkami APC w ustroju są znajdujące się w naskórku komórki Langerhansa (LC), które posiadają konstytutywnie Ag MHC klasy II na swej powierzchni i słabe właściwości fagocytarne. Funkcja LC polega na wychwytywaniu i przetwarzaniu Ag w obrębie skóry, aktywacji limfocytów T pamięci oraz migracji do lokalnych węzłów chłonnych, gdzie prezentują Ag naiwnym limfocytom T. Zaburzenie prawidłowej funkcji LC (np.: poprzez działanie promieniowania UV) może prowadzić do rozwoju alergii lub tolerancji na dany Ag.

Istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej pełnią keratynocyty, komórki naskórka zdolne do fagocytozy i ekspresji Ag MHC klasy II po odpowiedniej stymulacji (podobnie jak komórki śródbłonka naczyń), jak również do wydzielania wielu cytokin o działaniu immunostymulującym (cytokiny pozapalne) i immunosupresyjnym. Niedostateczna stymulacja limfocytów T pochodząca od nieprofesjonalnych APC, jak keratynocyty czy fibroblasty może wpływać hamująco nie tylko na dojrzewanie naiwnych komórek T, ale również aktywację dojrzałych limfocytów. W przeciwieństwie do śródbłonka naczyń keratynocyty nie posiadają wystarczającej do aktywacji limfocytów T ekspresji molekuł kostymulujących i mogą prowadzić do anergii lub delecji klonalnej limfocytów.

Limfocyty T występujące w naskórku stanowią prawie wyłącznie populacje komórek pamięci, a większość wykazuje ekspresję koreceptora CD8. W odróżnieniu od myszy, u których wykryto obecność dendrytycznych komórek naskórkowych (DETC) będących populacją limfocytów TCR$\gamma\delta$, w ludzkiej skórze dominuje populacja limfocytów TCR $\alpha\beta$ (w stosunku 10:1) [52].

W skórze właściwej występują w podobnych proporcjach limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$, makrofagi koncentrujące się głównie w pobliżu błony podstawnej, komórki tuczne i populacja komórek dendrytycznych (różniąca się od LC ekspresją molekuł powierzchniowych) skupiające się wokół naczyń krwionośnych. Dodatkowo komórki śródbłonka, fibroblasty oraz zakończenia nerwowe współpracują z komórkami immunokompetentnymi w procesie amplifikacji sygnału zagrożenia i rekrutacji komórek z krążenia do miejsca toczącego się procesu zapalnego.

Modelem doświadczalnym, który pozwala badać odpowiedź immunologiczną w skórze, jest nadwrażliwość kontaktowa (CS), która jest formą nadwrażliwości typu późnego (DTH). CS rozwija się po aplikacji na skórę lub błony śluzowe substancji niskocząsteczkowych (haptenów), które wiążą się trwale z białkami ustroju tworząc neoantygeny. W przebiegu CS i DTH wyróżnia się fazę indukcyjną i efektorową. W trakcie pierwszej fazy, wskutek immunizacji Ag, dochodzi do aktywacji i klonalnej ekspansji limfocytów T antygenowo swoistych, jak również stymulacji limfocytów B1 do produkcji swoistych przeciwciał IgM, w którym to procesie zaangażowane są również limfocyty NKT. W ciągu 2 h od momentu drugiego kontaktu z Ag powstają kompleksy Ag-IgM, które wyzwalają kaskadę reakcji związanych z odpowiedzią wrodzoną: aktywację dopełniacza na drodze klasycznej, stymulację komórek tucznych i płytek krwi do wydzielania serotoniny i TNF-α. W wyniku działania tych czynników na śródbłonek naczyń dochodzi do rekrutacji limfocytów T efektorowych (Tef) późnej fazy DTH i CS, należących do populacji komórek TH1 [53].

Z przytoczonych faktów wynika, że w skórze można stosunkowo łatwo wywołać silną odpowiedź immunologiczną, podczas gdy niewiele wiadomo na temat tego narządu jako miejsca indukcji tolerancji. Ze względu na duże podobieństwo funkcji błon śluzowych oraz skóry można przypuszczać, iż podobnie jak ma to miejsce w przypadku śluzówek, podanie antygenu na skórę, przy spełnieniu odpowiednich warunków, mogłoby prowadzić do indukcji stanu tolerancji. Badania przeprowadzone przez M. Szczepanika i wsp. wykazały, iż faktycznie aplikacja antygenu białkowego na skórę przed wywołaniem reakcji CS prowadzi do silnego zahamowania reakcji mediowanej przez limfocyty TH1. Ponieważ komórki TH1 odgrywają kluczową rolę w rozwoju procesu zapalnego szeregu schorzeń autoimmunizacyjnych, w tym również SM, na bazie wyników uzyskanych w modelu CS powstał projekt mający na celu zbadanie czy skórna immunizacja MBP pozwoli na hamowanie procesu zapalnego powstałego w modelu zwierzęcym SM.

2. Cele pracy

1) Indukowanie stanu tolerancji obwodowej na białko MBP nowatorską metodą dotychczas nieznaną i nie wykonywaną w modelu EAE, poprzez deponowanie antygenu na skórę zwierząt przed aktywną immunizacją MBP z CFA, przy uwzględnieniu optymalnej dawki użytej do wywołania supresji.

2) Podjęcie próby przeniesienia stanu tolerancji obwodowej wywołanej drogą skórną, na naiwnych syngenicznych biorców, z wykorzystaniem komórek węzłów chłonnych (LNC) uczulanych MBP dawców, a następnie indukowanie EAE.

3) Identyfikacja fenotypu komórek odpowiedzialnych za zjawisko supresji indukowanej przez skórę, jak również określenie mechanizmu ich działania z wykorzystaniem metod selekcji komórek w badaniach prowadzonych w układzie *in vivo* oraz testów *in vitro*.

4) Ocena wpływu podawania białka MBP na skórę zwierząt chorych na EAE, po wystąpieniu pierwszych symptomów choroby.

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

W doświadczeniach użyto samice szczepu myszy B10.PL (H-2^u), genetycznie predysponowanego do rozwoju postaci chronicznej zwierzęcego modelu stwardnienia rozsianego (EAE). Ponadto w pracy użyto defektywne szczepy myszy TCRδ-/- (myszy pozbawione limfocytów T z receptorem antygenowym TCR$\gamma\delta$), CD1d-/- (nie posiadające CD1-zależnych komórek NKT), β_2m -/- (nie posiadające limfocytów $CD8^+$) wyprowadzone z linii myszy szczepu B10.PL (H-2^u). Wymienione szczepy myszy otrzymał dr hab. Marian Szczepanik w grudniu 2000 r. w darze od Prof. Charles`a Janeway'a z Department of Immunobiology, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine. Myszy B10.PL (H-2^u) pochodziły z Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA.

Każda badana grupa eksperymentalna zwierząt składała się z średnio 5 myszy w wieku 6-8 tygodni, a doświadczenia powtarzano co najmniej 3 razy. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej w Zakładzie Biologii Rozwoju Człowieka Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w warunkach jałowych, z użyciem zamkniętych klatek z odpowiednim systemem filtrów. Myszy karmione były autoklawowaną paszą „Murigran" oraz pojone autoklawowaną wodą.

Badania były prowadzone zgodnie z wymogami Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3.2. Odczynniki

Białko zasadowe mieliny (MBP) z rdzenia kręgowego świnki morskiej, mitomycyna C, owalbumina (OVA) (grade V), toksyna bakterii *Bordetella pertussis* (Pertusis toxin), kompletny adjuwant Freunda (CFA), bufor HEPES, aminokwasy NEAA, kwas pirogronowy (PA, pyruvic acid), [(Sigma), St. Louis, MO, USA], zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna bez jonów Ca^{++} i Mg^{++} (PBS) (P.O.Ch.S.A., Gliwice, Polska), płodowa surowica cielęca (FCS) [Life Technologies (Grand Island, N.Y., USA)], podłoże hodowlane RPMI 1640, L-glutamina (Gobco, Grand Island, N.Y., USA), kwas 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonowy (TNP) [(Kodak, Rochester, NY, USA)], hemocjanina mięczaka skałoczepu (Keyhole limpet hemocyanin - KLH) [(Calbiochem, San Diego, CA, USA)], ^{3}H-tymidyna (Lacomed, Rez, RC, USA), krem Nivea (Beiersdorf, Hamburg, Niemcy).

Ponadto w niektórych doświadczeniach użyto mysie immunoglobuliny, wyizolowane z surowicy myszy szczepu CBA/J metodą McKinney'a i Parkinson'a, i znakowane TNP metodą wg Eisena'a [54]. Uzyskane w ten sposób Ig, wyznakowane TNP (TNP-Ig) posiadały współczynnik podstawienia 40 cząsteczek TNP na jedną molekułę Ig (TNP_{40}-Ig), a zostały wytworzone przez Dr Krzysztofa Bryniarskiego z Katedry Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3.3. Przeciwciała monoklonalne i dopełniacz

W doświadczeniach użyto przeciwciała monoklonalne (mAb): anty-IL-4 (klon 11B11), anty-IL-10 (klon SXC1) oraz anty-TGF-β (klon HB 9849) oczyszczane na białku G metodą chromatografii powinowactwa. Przeciwciała te były darem Prof. Charles`a Janeway'a z Department of Immunobiology, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine. Działanie IL-13 blokowano proteiną będącą rozpuszczalną składową receptora dla IL-13 (IL-13Rα-Fc) [R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)]. Do selekcji negatywnej użyto supernatanty odpowiednich linii komórkowych wydzielających mAb: anty-CD4 (TIB 207), anty-CD8 (TIB 105.3), wyprodukowane przez Dr Marię Ptak z Katedry Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Uzyskane supernatanty zawierały co najmniej 10 μg/ml odpowiedniego mAb. Do znakowania komórek w badaniach cytometrycznych użyto mAb anty-CD4-FITC i anty-CD8-PE (Pharmingen, San Diego, CA, USA). W doświadczeniach stosowano także liofilizowany dopełniacz króliczy (RC) [Pel-Freeze Biologicals (Brown Deer, WI, USA)].

3.4. Aparatura i materiały

Wytrząsarka (GFL Burgwedel, Niemcy), wirówka, komora laminarna, inkubator z przepływem 5% CO_2 (Heraeus, Hanau, Niemcy), MicroBeta TriLux – wielofunkcyjny licznik z detektorami promieniowania β i luminescencji, filtry z włókna szklanego typu Printed Filtermat A (wielkości 90x120 mm), β-scyntylatory (wielkości 73x109 mm, średniej wagi 4g), samoprzylepna taśma ochronna (Wallac Oy Turku, Finland), Filtermate Harvester (Packard BioScience Co., Groningen, The Netherland), cytofluorymetr przepływowy „Cytoronabsolute" (Ortho Diagnostic Systems, Johnson & Johnson Company, Raritan, USA) oraz sorter komórkowy FACS (Dako Cytomation, Fort Collins, CO, USA), płytki Petriego o średnicy 100 mm, butelki hodowlane o pojemności 50 i 200 ml, próbówki plastykowe o pojemności 15 i 50 ml, płytki 96-dołkowe (Costar, Cambridge, MA, USA), parafilm „M" (American National

CanTM, Greenwich, CT, USA), igły jednorazowe 26G x $^1/_2$, strzykawki szklane – 1ml, 2ml, 5ml [(Becton Dickinson (Rutheford, NJ, USA)], sitka nylonowe (wielkość porów 100 μl) [(Sigma, St. Louis, MO, USA)], sączki 0,2 μl (Pall Corporation, MI, USA), żyletki (surgical carbon steel) [VWR Scientific Co. (West Chester, PA, USA)].

3.5. Metoda indukcji EAE

Myszy B10.PL (H-2^u) oraz defektywne szczepy TCRδ -/-, CD1d -/-, β_2m -/- o haplotypie H-2^u były aktywnie immunizowane w celu indukowania EAE metodą standardową poprzez podanie białka mieliny MBP w ilości 200 μg na mysz, zawieszonego w 100 μl kompletnego adjuwantu Freunda (CFA), wzbogaconego liofilizatem *Mycobacterium tuberculosis* o koncentracji 4mg/ml. Antygen w adjuwancie podawano podskórnie (*s.c.*) na powierzchni brzusznej zwierząt, w dwóch miejscach. Dodatkowo w dniu immunizacji oraz dwa dni później podawano dożylnie 200 ng toksyny *Bordetella pertussis* (PTx) w 200 μl buforu PBS.

Zwierzęta były obserwowane codziennie pod kątem objawów neurologicznych EAE. Oceny klinicznej dokonywano według pięciostopniowej skali wyrażającej stopień porażenia korelujący z zaawansowaniem choroby: 0 – brak objawów, 1 – osłabienie ogona, 2 – niedowład przednich lub tylnych kończyn, 3 – całkowite porażenie przednich lub tylnych kończyn, 4 – porażenie przednich i tylnych kończyn, 5 – choroba ze skutkiem śmiertelnym. Wyniki uzyskane we wszystkich doświadczeniach przedstawiono jako uśrednione dane z każdej grupy badanej.

3.6. Indukcja komórek regulacyjnych poprzez naskórną (*e.c.*) aplikację MBP

W dniu „0” myszom aplikowano na ogoloną skórę grzbietu 100 μl MBP w PBS o stężeniu 1mg/ml (grupa badana) lub sam PBS (kontrola pozytywna) w postaci opatrunku z gazy o powierzchni 1 cm^2. Opatrunki mocowano plastrem (3M Viscoplast S.A., Polska) i pozostawiano przez 4 dni, następnie usuwano i powtarzano aplikację MBP lub PBS analogicznie do procedury w dniu „0”. W dniu „+7” opatrunki usuwano, a zwierzęta były immunizowane MBP z CFA metodą standardową opisaną w punkcie 3.5. i codziennie oceniane pod względem wystąpienia symptomów EAE. Wykonano dodatkowo doświadczenie, w którym zwierzętom grup badanych podawano różne rozcieńczenia Ag wykonane z roztworu MBP w PBS o stężeniu 10 mg/ml. Do badań dołączono również grupę

zwierząt immunizowanych wyłącznie przez naskórną aplikację MBP bez następowej aktywnej immunizacji MBP z CFA.

3.7. Transfer komórek regulacyjnych do naiwnych biorców

U myszy B10.PL indukowano stan tolerancji na antygeny mieliny poprzez *e.c.* immunizację MBP, opisaną w punkcie 3.6. W dniu „+7" usuwano opatrunki z Ag, pobierano pachowe i pachwinowe węzły chłonne, które mechanicznie rozdrabniano i zawieszano w PBS. Komórki węzłów chłonnych (LNC), uwolnione mechanicznie z macierzy międzykomórkowej, oddzielano od resztek tkanki za pomocą gazy nylonowej (średnica oczek 100 μm), a następnie płukano trzykrotnie w jałowym PBS (10 minut, 1200 obrotów/min, temperatura 4°C). Po ocenie mikroskopowej pozyskanych komórek pod względem ilości i żywotności (metodą barwienia błękitem trypanu), zawieszano komórki w buforze PBS i podawano dożylnie (*i.v.*) naiwnym, syngenicznym biorcom w ilości $2x10^7$/mysz zawieszonych w 200 μl PBS. Bezpośrednio po transferze komórek zwierzęta były aktywnie immunizowane MBP z CFA wg metody opisanej w punkcie 3.5. i codziennie obserwowane. Grupie kontrolnej myszy podawano *i.v.* LNC pozyskane od zwierząt traktowanych *e.c.* PBS analogicznie do grupy toleryzowanej *e.c.* MBP.

Dodatkowo wykonano doświadczenie, w którym naiwnym biorcom podawano różne ilości LNC pozyskane od dawców toleryzowanych *e.c*. MBP.

3.8. Charakterystyka fenotypu komórek supresyjnych odpowiedzialnych za stan tolerancji indukowanej przez naskórną immunizację

Oceny fenotypu komórek odpowiedzialnych za stan tolerancji indukowany przez skórę dokonano z wykorzystaniem dwóch modeli doświadczalnych, tj. aktywnego wywołania tolerancji oraz adoptywnego jej transferu. W pierwszym z nich myszy defektywnych szczepów TCRδ -/-, CD1 -/-, β_2m -/- o haplotypie H-2^u oraz myszy B10.PL (H-2^u) jako grupa kontrolna, były immunizowane przez *e.c.* aplikację odpowiednio MBP i PBS, a następnie aktywnie immunizowane MBP z CFA i obserwowane.

W drugim modelu komórki supresyjne, które izolowano z węzłów chłonnych myszy B10.PL immunizowanych uprzednio metodą *e.c.* aplikacji MBP opisaną w punkcie 3.6., poddano selekcji negatywnej z zastosowaniem mAb anty-CD4 lub anty-CD8 wraz z dopełniaczem (inkubacja w temperaturze 37°C, 60 minut). Po zakończeniu inkubacji komórki płukano jałowym PBS z 2% FCS, a następnie liczono ilość oraz oceniano żywotność jak w

punkcie 3.7. Po selekcji negatywnej, komórki zawieszone w PBS, podawano *i.v.* naiwnym, syngenicznym biorcom w ilości $2x10^7$/mysz w 200 μl PBS, których następnie poddawano aktywnej immunizacji MBP z CFA. W kontroli supresji grupie zwierząt podawano *i.v.* $2x10^7$/mysz komórek węzłów chłonnych traktowanych samym RC przed indukcją EAE. W grupie kontrolnej myszy otrzymywały *i.v.* sam PBS przed aktywną immunizacją MBP z CFA. Następnie zwierzęta wszystkich grup badanych obserwowano i oceniano wg skali przedstawionej w punkcie 3.5.

3.9. Sortowanie $CD4^+$ $CD8^+$ limfocytów T węzłów chłonnych z użyciem sortera komórkowego typu FACS

Myszy immunizowano *e.c.* MBP metodą opisaną w punkcie 3.6., następnie pobierano pachowe i pachwinowe węzły chłonne, rozdrabniano mechanicznie, a po oddzieleniu od resztek tkanki LNC zawieszano w PBS w koncentracji 10^7/ml i znakowano przeciwciałami anty-CD4-FITC i anty-CD8-PE przez 30 minut na lodzie chroniąc przed światłem. Następnie komórki płukano w buforze PBS z 2% FCS (3 min., 2000 obrotów/min., w temperaturze 4° C). Wyznakowane komórki poddano sortowaniu na cytofluorymetrze przepływowym FACS w celu uzyskania subpopulacji limfocytów T $CD4^+$ $CD8^+$. Wysortowane komórki T $CD4^+$ $CD8^+$ w ilości $2x10^3$/mysz, zawieszone w 200 μl PBS, przenoszono na naiwnych biorców. W kontroli supresji zwierzętom podawano w 200 μl PBS $2x10^7$/mysz niesortowanych komórek LNC od myszy toleryzowanych MBP. Następnie biorców transferu aktywnie immunizowano MBP z CFA. Grupie myszy kontroli pozytywnej podano *i.v.* sam PBS przed indukcją EAE.

3.10. Test *in vivo* na swoistość antygenową supresji indukowanej przez skórę

Myszy szczepu B10.PL przed aktywną immunizacją były golone na grzbietach, następnie w dniu „0" zwierzętom aplikowano *e.c.* odpowiednio po 100 μl roztworów białek MBP, TNP-Ig lub OVA sporządzonych w buforze PBS, lub sam PBS (kontrola pozytywna) w postaci zamkniętych opatrunków z gazy. Koncentracja roztworu każdego Ag wynosiła 1mg/ml. Opatrunki pozostawiano przez 4 dni, następnie powtarzano aplikację białek w sposób analogiczny do procedury w dniu „0". W dniu „+7" po usunięciu opatrunków zwierzęta poddawano aktywnej immunizacji MBP z CFA i obserwowano przebieg kliniczny EAE we wszystkich grupach badanych.

3.11. Test *in vitro* na swoistość antygenową supresji indukowanej przez skórę

Myszy szczepu B10.PL toleryzowano przez *e.c.* aplikację 100 μl roztworów białek: MBP, TNP-Ig, KLH lub OVA w PBS o stężeniu 1mg/ml, a w grupie kontrolnej podawano sam PBS według procedury opisanej w punkcie 3.10. W dniu „+7" zwierzęta immunizowano MBP z CFA bez podania PTx, a po upływie 10 dni od immunizacji pobierano pachowe i pachwinowe węzły chłonne. Po mechanicznym rozdrobnieniu tkanki przygotowano zawiesinę LNC w jałowych warunkach, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.7. LNC zwierząt toleryzowanych *e.c.* różnymi Ag oraz grupy kontrolnej były inkubowane w okrągłodennych 96-dołkowych płytkach hodowlanych w ilości $3x10^5$ komórek/dołek, w malejących rozcieńczeniach MBP. Końcowa objętość hodowli wynosiła 200 μl/dołek. Stężenie MBP w poszczególnych rozcieńczeniach wynosiło: 300 μg/ml, 100 μg/ml, 30 μg/ml, 10 μg/ml, 3 μg/ml, 1 μg/ml, 0,3 μg/ml. Dodatkowo dołączono kontrolę proliferacji przez inkubację komórek LNC bez MBP („tło"). Podłoże hodowlane RPMI 1640 zawierało 100 U/ml penicyliny, 100 μg/ml streptomycyny, 2mM L-glutaminy, 25 mM buforu HEPES, $5x10^{-5}$M 2-merkaptoetanolu i 10% FCS. Hodowlę prowadzono w 37°C, w atmosferze 5% CO_2 przez 48 h. Następnie do wszystkich dołków hodowli dodano 0,5 μCi/dołek [^{3}H]-tymidyny w 20 μl RPMI 1640 i inkubowano komórki przez kolejne 18 h. Intensywność proliferacji komórek oceniano przez odczyt inkorporacji [^{3}H]-tymidyny z użyciem licznika scyntylacyjnego promieniowania β. Wyniki pomiarów przedstawiono na rycinach w postaci średnich arytmetycznych ± odchylenie standardowe ($\bar{x}$ ± SD) po odjęciu „tła" (proliferacja komórek w nieobecności antygenu).

3.12. Test proliferacji w obecności komórek regulacyjnych i przeciwciał neutralizujących cytokiny

W celu zbadania mechanizmu, przez jaki działają komórki Ts indukowane przez skórę, komórki uczulone hodowano wraz z komórkami Ts w obecności mAb neutralizujących odpowiednie cytokiny. Komórki uczulone (komórki Tef EAE) stanowiły LNC pobrane od myszy immunizowanych *s.c.* MBP z CFA bez podania PTx. Komórki supresyjne pochodziły z węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych wyizolowanych od myszy toleryzowanych *e.c.* MBP. W celu zahamowania proliferacji komórek Ts komórki LNC traktowano roztworem mitomycyny C o stężeniu 30 μg/ml, następnie trzykrotnie płukano w PBS i zawieszano w podłożu hodowlanym. W hodowli komórek stosowano koncentracje limfocytów Tef $3x10^5$/dołek, a limfocytów Ts $6x10^4$/dołek, które hodowano z dodatkiem malejących rozcieńczeń MBP. Warunki hodowli oraz stosowane rozcieńczenia Ag były zgodne z

przedstawionymi w punkcie 3.11. Prowadzono łączną hodowlę komórek T efektorowych i T regulacyjnych oraz oddzielną hodowlę wspomnianych komórek w celu kontroli proliferacji i działania mitomycyny C. Ponadto w poszczególnych grupach łącznej hodowli komórek efektorowych i regulacyjnych dodano mAb anty-IL-4, anty-IL-10, anty-TGF-β lub IL-13Rα-Fc, w ilościach 10 μg/ml. Inkorporację [^{3}H]-tymidyny odczytano na liczniku scyntylacyjnym promieniowania β.

3.13. Neutralizacja TGF-β w modelu EAE *in vivo*

Myszy szczepu B10.PL immunizowano przez aplikację *e.c*. 100 μg MBP w PBS w dniu „0" i w dniu „+4". W dniu „+6" połowie myszy toleryzowanych *e.c.* MBP podano *i.v.* 500 μg/mysz mAb anty-TGF-β, a pozostałym kontrolę izotypową. W dniu „+7" usunięto opatrunki z MBP i powtórnie podano *i.v.* 500 μg/mysz mAb anty-TGF-β lub kontrolę izotypową, a następnie zwierzęta były aktywnie immunizowane MBP z CFA i codziennie oceniany był ich stan kliniczny według skali opisanej w punkcie 3.5. Kontrolę pozytywną stanowiły zwierzęta traktowane *e.c.* samym PBS, a następnie immunizowane MBP z CFA.

3.14. Aplikacja MBP na skórę zwierząt chorych na EAE

Myszy szczepu B10.PL immunizowano aktywnie przez podskórne podanie 200 μg MBP z CFA i dwukrotną iniekcją PTx zgodnie z metodą opisaną w punkcie 3.5., a następnie podzielono na dwie grupy: badaną i kontrolną. Dodatkowo zwierzęta regularnie golono na powierzchni grzbietowej. Obserwacje zwierząt prowadzono codziennie. Po wystąpieniu pierwszych symptomów choroby w grupie badanej, w odsłoniętą skórę myszy wcierano do momentu wchłonięcia MBP, zawieszone w neutralnym kremie Nivea. W pierwszym dniu podano 100 μg MBP w 100 μl kremu, a przez kolejne 13 dni 10 μg/100 μl. W grupie kontrolnej na odsłoniętą skórę zwierząt aplikowano sam krem Nivea. Dodatkowo dołączono grupę zwierząt, która była dwukrotnie toleryzowana MBP (dzień „0" oraz „+4") przed aktywną immunizacją MBP z CFA, jako kontrolę supresji.

4. Wyniki

4.1. Naskórna immunizacja MBP przez skórę chroni przed rozwojem EAE

Nasze wcześniejsze badania prowadzone w modelu reakcji nadwrażliwości kontaktowej (CS) wykazały, że aplikacja Ag białkowego na skórę prowadzi do zahamowania TH1-zależnej odpowiedzi komórkowej. W niniejszym doświadczeniu podjęto próbę sprawdzenia czy w modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego EAE, podobnie jak w reakcji CS podanie Ag białkowego na skórę doprowadzi do zahamowania rozwoju reakcji zapalnej.

W tym celu myszy szczepu B10.PL (H-2^u) (rozwijające postać chroniczną EAE) immunizowano MBP *e.c*. dawką 100 μg/mysz (dawka Ag wykazana jako optymalna w modelu CS) lub PBS w dniu „0" i „+4". W dniu „+7" zwierzęta obu grup były aktywnie immunizowane MBP z CFA, a następnie oceniane pod względem ciężkości objawów EAE. Wyniki przedstawione na Ryc. 1A oraz w Tabeli 1 wskazują, że naskórna aplikacja MBP przed immunizacją prowadzi do opóźnienia wystąpienia choroby o około 9 dni w stosunku do kontroli pozytywnej (zwierzęta traktowane jedynie PBS na skórę przed wywołaniem EAE), a różnica między grupami jest statystycznie znamienna (p=0,007). Dodatkowo stwierdzono mniejszą zachorowalność w grupie toleryzowanej - 58% przypadków, podczas gdy w kontroli pozytywnej - 90%. Uzyskano także efekt znacznego obniżenia natężenia objawów klinicznych, o około 50% w stosunku do kontroli pozytywnej, na co wskazuje średnia objawów klinicznych z 55 dni obserwacji od momentu wystąpienia symptomów choroby (p=0,02). Średnia skumulowana objawów klinicznych wszystkich myszy w badanych grupach, oraz średnia skumulowana objawów klinicznych wyłącznie chorych zwierząt różni się istotnie statystycznie między grupą badaną i kontrolną (odpowiednio p=0,002 i p=0,04). Stwierdzono również mniejszą śmiertelność myszy w grupie toleryzowanej MBP w stosunku do kontroli pozytywnej. Dodatkowo wykazano, że aplikowanie MBP na skórę zwierząt według identycznego schematu, ale bez aktywnej immunizacji MBP z CFA, nie prowadzi do rozwoju choroby (wyniki nie uwzględnione na Ryc. 1A).

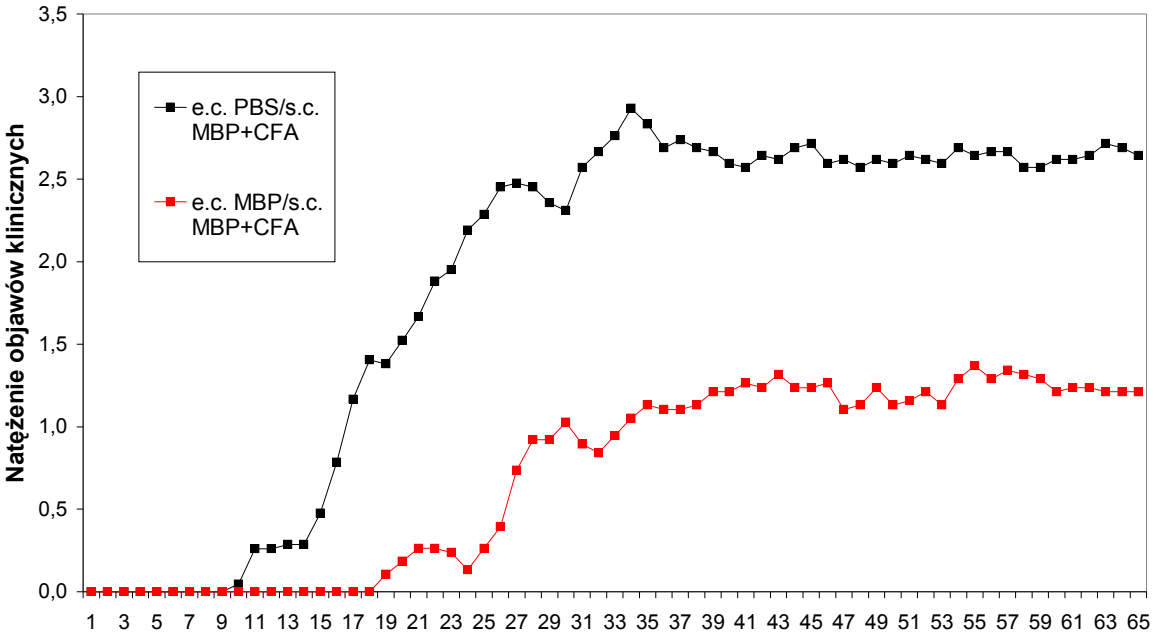
W kolejnym etapie badań określono optymalną dawkę MBP, która podana na skórę maksymalnie hamuje rozwój oraz przebieg EAE. Wyniki przedstawione na Ryc. 1B wskazują, że dawki 100 μg i 1000 μg MBP najsilniej opóźniają i hamują rozwój EAE w porównaniu do niższych dawek Ag. Należy wspomnieć, że wszystkie zastosowane dawki: 3 μg, 10 μg, 30 μg, 100 μg, 1000 μg MBP zostały podane dwukrotnie i traktowanie każdą z nich prowadzi do obniżenia natężenia objawów klinicznych EAE w stosunku do kontroli pozytywnej (dwukrotna aplikacja PBS). Jednak tylko w przypadku najwyższych dawek: 100

μg i 1000 μg MBP, dochodzi do opóźnienia manifestacji klinicznej choroby. Biorąc pod uwagę podobny efekt działania dawek 100 μg i 1000 μg MBP oraz znaczne różnice w kosztach badań zdecydowano się na stosowanie w dalszych eksperymentach dawki 100 μg MBP/mysz.

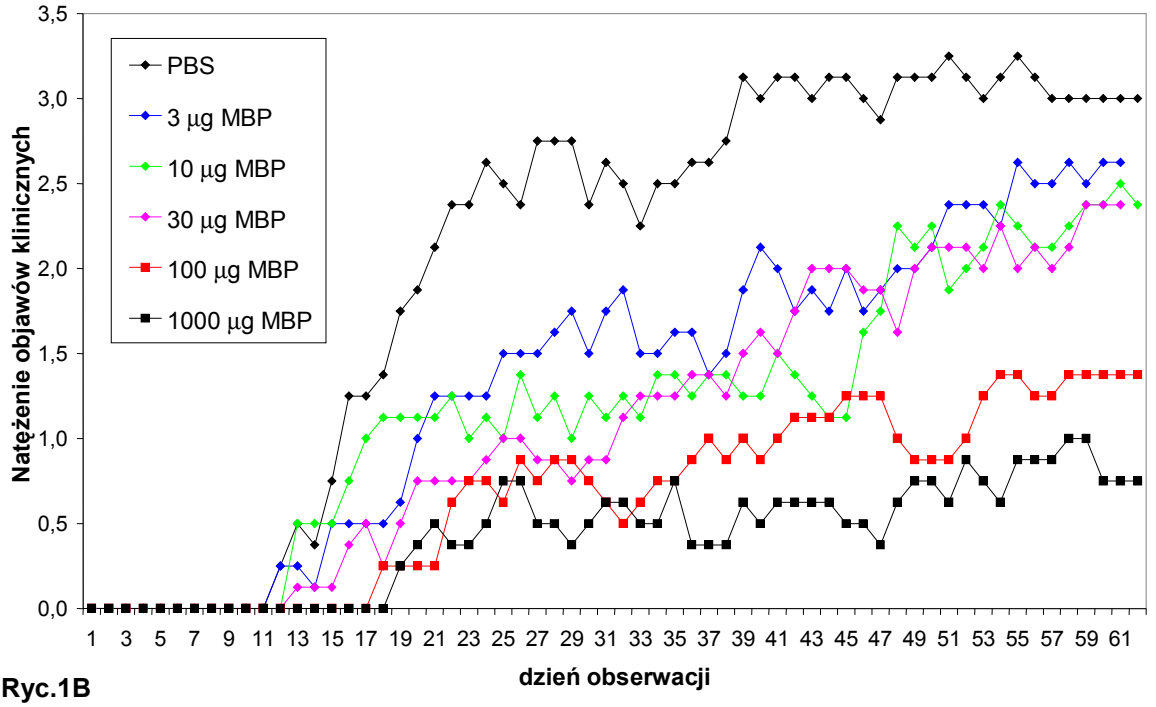
Prezentowane wyniki pokazują, że immunizacja *e.c*. MBP zwierząt przed aktywnym indukowaniem EAE (MBP z CFA) prowadzi do opóźnienia rozwoju choroby, jak również do znacznego złagodzenia przebiegu klinicznego EAE. Równolegle do badań na myszach B10.PL wykonano eksperymenty, gdzie posłużono się myszami pierwszego pokolenia F1 szczepów SJL x B10.PL, rozwijających postać nawracającą EAE i uzyskano wyniki podobne do przedstawianych (dane nie uwzględnione w niniejszej pracy).

Tabela 1. Przebieg EAE u myszy szczepu B10.PL toleryzowanych *e.c.* MBP w stosunku do grupy kontrolnej (*e.c.* PBS)

	PBS	MBP
Liczba myszy	21	19
Zachorowalność (%)	90	58
Średni czas wystąpienia objawów EAE od dnia aktywnej immunizacji ± SE	21,1±1,8	30±2,9
Średnia objawów klinicznych w czasie 55 dni obserwacji ± SE	2,6±0,4	1,4±0,4
Średnia skumulowana objawów klinicznych wszystkich myszy ± SE	97±15	34±9
Średnia skumulowana objawów klinicznych chorych myszy ± SE	106,8±14,3	59,1±11,2
Śmiertelność (%)	29	10,5


e.c. PBS/s.c. MBP+CFA
e.c. MBP/s.c. MBP+CFA
Natężenie objawów klinicznych
dzień obserwacji

Ryc.1A


PBS
3 µg MBP
10 µg MBP
30 µg MBP
100 µg MBP
1000 µg MBP
Natężenie objawów klinicznych
dzień obserwacji

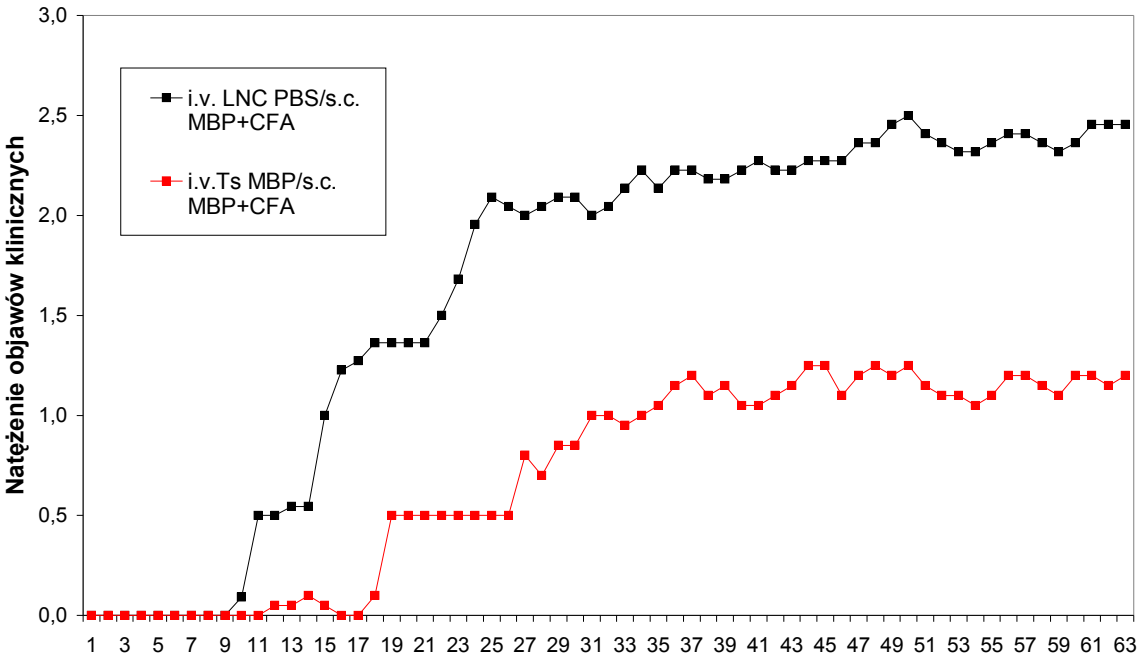
Ryc.1B

4.2. Tolerancję indukowaną przez skórę można przenieść na naiwnych biorców przy użyciu komórek układu immunologicznego

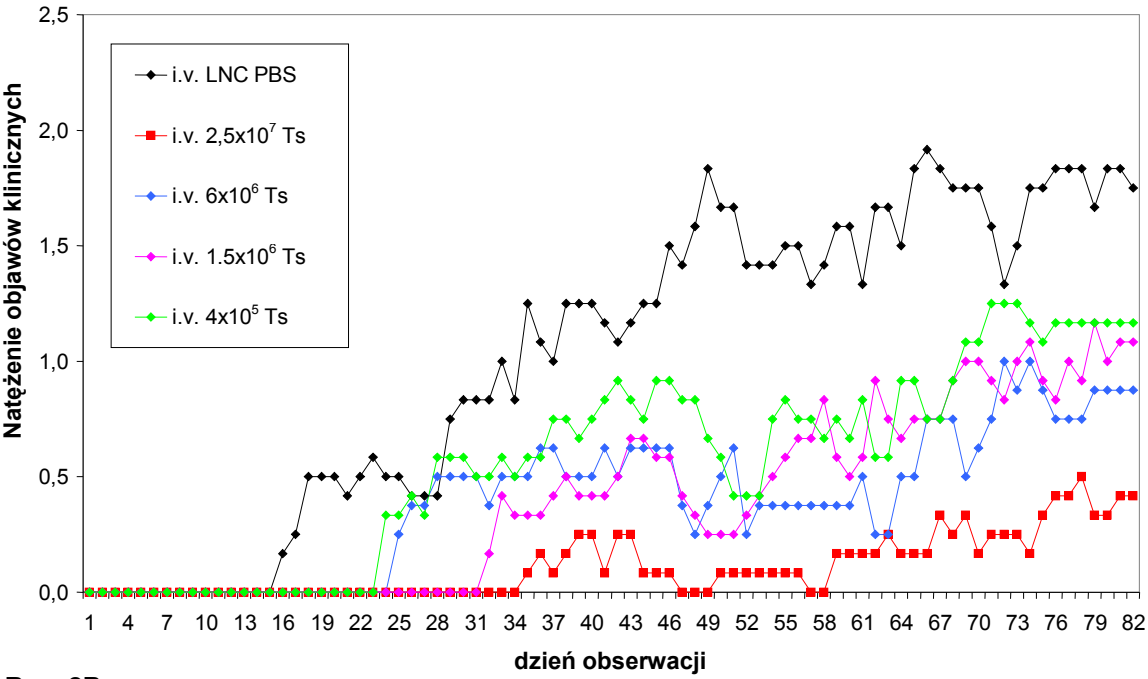
Założeniem niniejszego eksperymentu było sprawdzenie czy obserwowane zjawisko supresji EAE można przenieść na naiwnych biorców za pośrednictwem komórek układu odpornościowego. W tym celu przeniesiono LNC, wyizolowane z węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych myszy B10.PL immunizowanych *e.c*. MBP lub traktowanych PBS, do naiwnych syngenicznych biorców w ilości $2x10^7$ komórek/mysz. Następnie zwierzęta poddano standardowej immunizacji i oceniano w kierunku wystąpienia objawów EAE. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 2A i w Tabeli 2. Biorcy komórek regulacyjnych, podobnie jak zwierzęta immunizowane *e.c.* MBP, wykazują istotne statystycznie (p=0,005) opóźnienie wystąpienia objawów choroby oraz łagodniejszy przebieg EAE w stosunku do grupy kontrolnej, której podano *i.v.* LNC pozyskane od myszy traktowanych *e.c.* PBS. Różnica między uśrednionymi objawami klinicznymi z 55 dni obserwacji grupy badanej i kontrolnej jest istotna statystycznie (p=0,05), podobnie jak różnica średnich skumulowanych objawów klinicznych wyłącznie chorych myszy (p=0,04). Stwierdzono również mniejszą śmiertelność myszy w grupie biorców komórek supresyjnych w stosunku do kontroli pozytywnej. Natomiast średnia skumulowana objawów klinicznych wszystkich myszy w badanych grupach nie wykazała statystycznej znamienności (p>0,05) ze względu na zbyt małą liczebność zwierząt w poszczególnych grupach.

Z kolei wyniki przedstawione na Ryc. 2B wskazują, że minimalna ilość komórek $4x10^5$/mysz zastosowana w danym transferze jest zdolna do hamowania rozwoju choroby i opóźnienia jej klinicznej manifestacji. Przy czym największe zahamowanie rozwoju choroby i opóźnienie wystąpienia objawów klinicznych obserwowano po podaniu biorcom $2,5x10^7$ komórek/mysz. Ponadto transfer komórek śledzionowych, które pozyskano od myszy toleryzowanych *e.c.* MBP przed aktywną immunizacją MBP z CFA, również prowadził do hamowania rozwoju choroby u naiwnych syngenicznych biorców (dane nie uwzględnione w niniejszej pracy).

Przedstawione na Ryc. 2A i 2B oraz w Tabeli 2 wyniki wskazują na to, że za zahamowanie rozwoju EAE odpowiedzialne są komórki układu chłonnego i zaledwie $4x10^5$ LNC, pozyskanych od zwierząt immunizowanych MBP przez skórę, może wywierać wspomniany efekt protekcyjny.


3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Natężenie objawów klinicznych
i.v. LNC PBS/s.c. MBP+CFA
i.v.Ts MBP/s.c. MBP+CFA
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63
dzień obserwacji

Ryc. 2A


2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Natężenie objawów klinicznych
i.v. LNC PBS
i.v. 2,5x10^{7} Ts
i.v. 6x10^{6} Ts
i.v. 1.5x10^{6} Ts
i.v. 4x10^{5} Ts
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61 64 67 70 73 76 79 82
dzień obserwacji

Ryc. 2B

Tabela 2. Przebieg EAE u myszy B10.PL po transferze LNC myszy toleryzowanych *e.c.* MBP w stosunku do grupy kontrolnej (*e.c.* PBS)

	PBS	MBP
Liczba myszy	10	10
Zachorowalność (%)	80	70
Średni czas wystąpienia objawów EAE od dnia aktywnej immunizacji ± SE	17,2±2,3	32,7±3,7
Średnia objawów klinicznych w czasie 55 dni obserwacji ± SE	2,6±0,6	1,1±0,5
Średnia skumulowana objawów klinicznych wszystkich myszy ± SE	109,5±30	44,9±19
Średnia skumulowana objawów klinicznych chorych myszy ± SE	116,6±28	50,4±20
Śmiertelność (%)	30	10

4.3. Komórki TCR$\gamma\delta$ oraz komórki NKT nie są zaangażowane w tolerancji indukowanej przez aplikację MBP na skórę

W celu oceny fenotypu komórek supresyjnych, indukowanych przez naskórną immunizację, wykorzystano w badaniach defektywne szczepy myszy: TCRδ -/-, CD1d -/-, β_2m -/- o podłożu genetycznym B10.PL (H-2^u). Wszystkie zwierzęta typu „knock out" poddano naskórnej ekspozycji na MBP lub PBS zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Metody i Materiały". W „+7" dniu, po usunięciu opatrunków każda grupa była aktywnie immunizowana przez podskórną iniekcję MBP z CFA, a następnie prowadzono obserwację zwierząt.

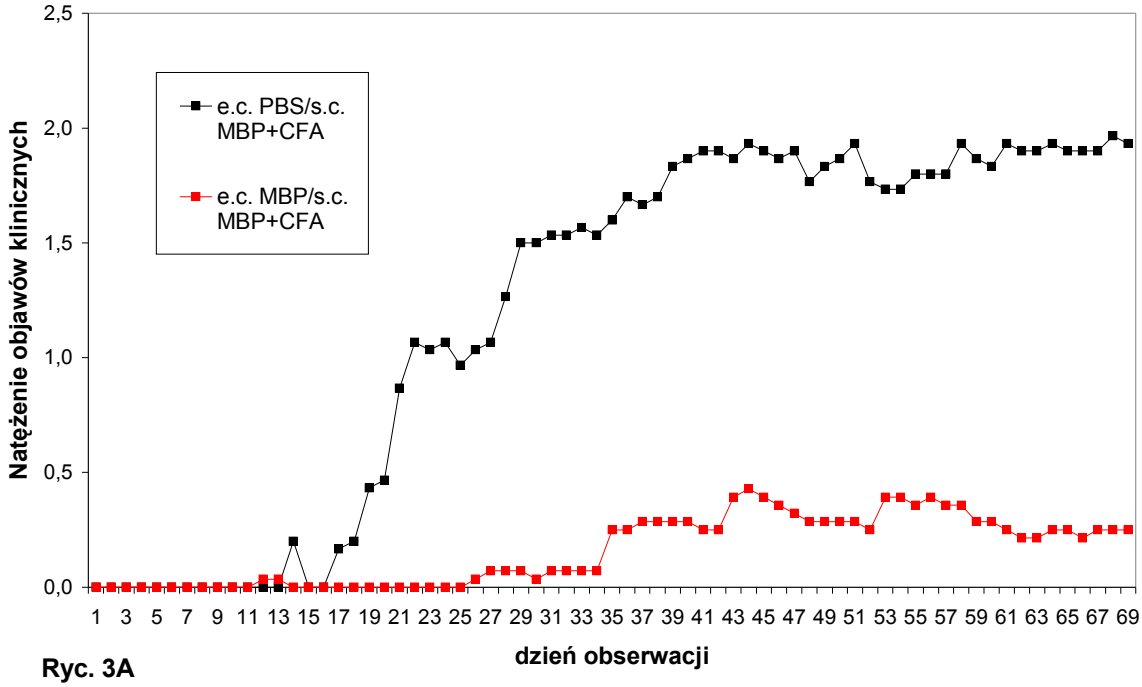
Wyniki prezentowane na Ryc. 3A pokazują, że myszy szczepu CD1d -/-, podobnie do myszy kontrolnych B10.PL po *e.c* immunizacji MBP, wykazują łagodniejszy przebieg choroby w odróżnieniu od grupy zwierząt traktowanych samym PBS na skórę, co świadczy o tym, że CD1d-zależne komórki NKT nie są zaangażowane w tolerancji indukowanej przez skórę. W omawianym doświadczeniu objawy kliniczne w grupie zwierząt toleryzowanych były niższe o

blisko 70%, a początek choroby był opóźniony o 10 dni w stosunku do kontroli pozytywnej. Zachorowalność w grupie kontrolnej wyniosła 80%, natomiast w grupie toleryzowanej 22%.

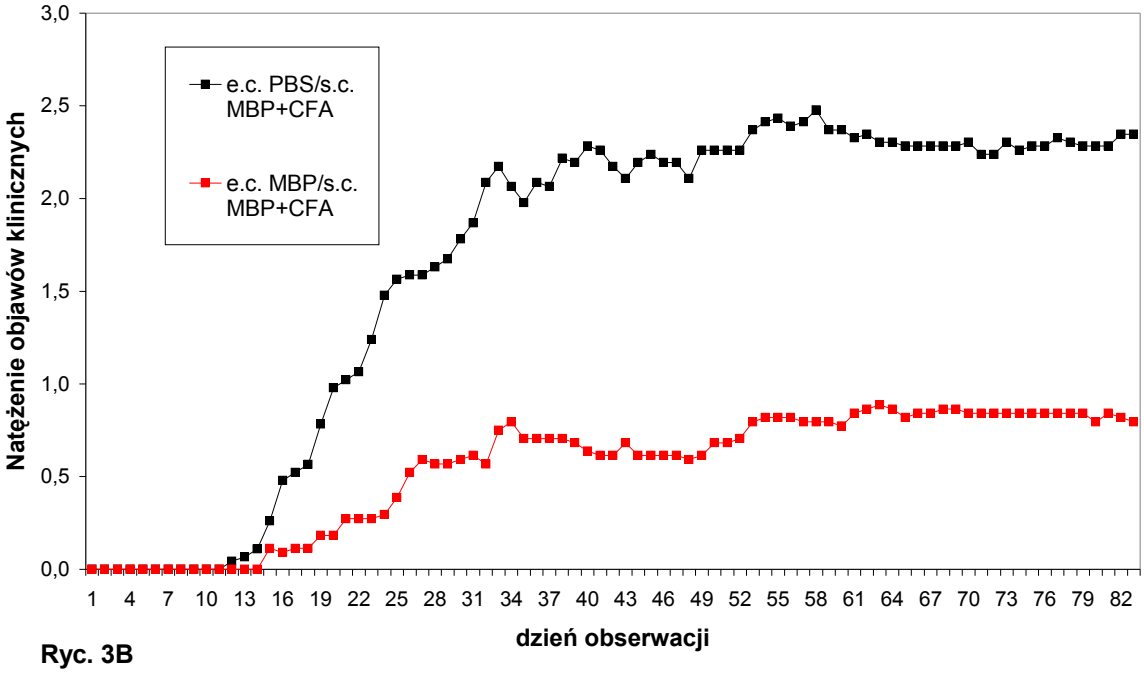
Ryc. 3B przedstawia wyniki doświadczenia, gdzie dokonano próby wywołania tolerancji przez naskórne podanie MBP u myszy szczepu TCRδ -/-. W doświadczeniu tym zaobserwowano zmniejszone natężenie objawów choroby o 62% u myszy toleryzowanych w stosunku do grupy zwierząt traktowanych samym PBS przed immunizacją MBP z CFA. Początek wystąpienia symptomów EAE był opóźniony o 3 dni w stosunku do grupy kontrolnej. Zachorowalność w grupie kontrolnej wyniosła 82%, natomiast w grupie toleryzowanej 37%. Prezentowane wyniki pokazują, że w tolerancji indukowanej przez skórę nie biorą udziału limfocyty TCRγδ.

Ryc. 3C przedstawia wyniki doświadczenia, gdzie porównano przebieg choroby u myszy szczepu β_2m -/- traktowanych MBP lub PBS na skórę przed wywołaniem EAE. W niniejszym doświadczeniu nie wystąpiło opóźnienie choroby w zestawieniu grupy toleryzowanej z grupą kontrolną, a obniżenie natężenia objawów EAE wyniosło 8%. Częstotliwość zachorowań była porównywalna w obu grupach i wyniosła: 73% w grupie kontrolnej, a 60% w grupie toleryzowanej. Uzyskane wyniki doświadczenia pokazują brak supresyjnego efektu *e.c*. immunizacji MBP u zwierząt szczepu β_2m -/-, co może świadczyć o tym, że za supresję indukowaną przez skórę są odpowiedzialne komórki T posiadające na swej powierzchni koreceptor CD8. Liczebność zwierząt oraz zachorowalność przedstawiono w Tabeli 3.

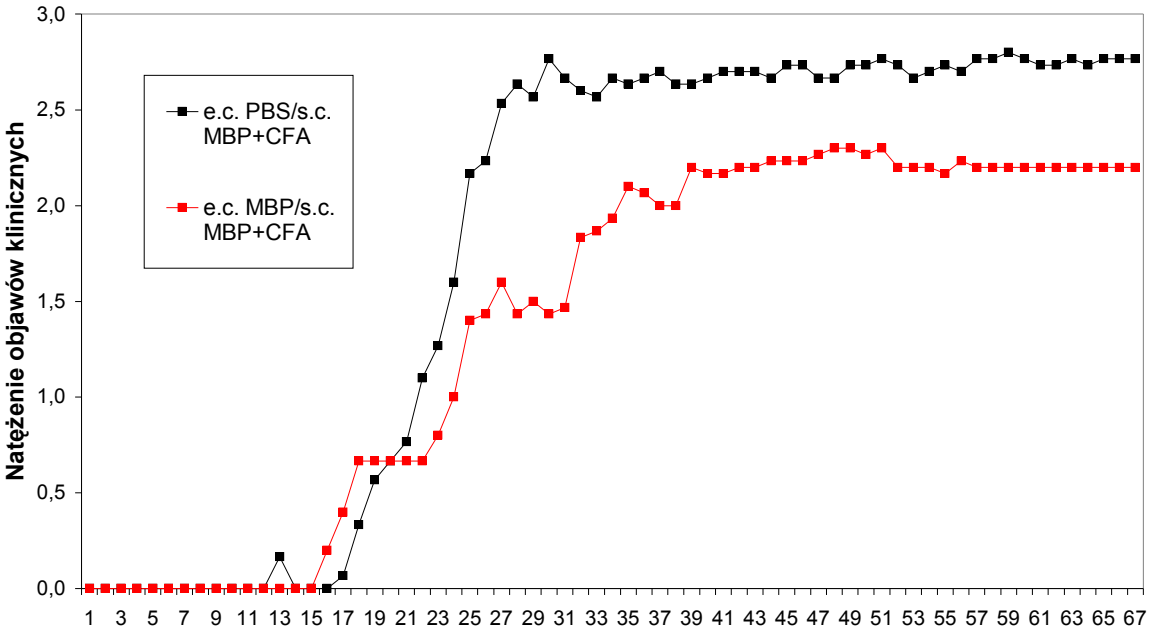
Podsumowując, uzyskane wyniki powyższych eksperymentów z wykorzystaniem trzech szczepów myszy typu „knock out" wskazują na to, że komórki NKT oraz limfocyty TCRγδ nie są zaangażowane w tolerancji indukowanej przez skórę, podczas gdy brak supresji obserwowany u myszy szczepu β_2m -/- sugeruje udział limfocytów T $CD8^+$ w powstaniu opisanego zjawiska supresji.


2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Natężenie objawów klinicznych
e.c. PBS/s.c. MBP+CFA
e.c. MBP/s.c. MBP+CFA
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69
dzień obserwacji

Ryc. 3A


3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Natężenie objawów klinicznych
e.c. PBS/s.c. MBP+CFA
e.c. MBP/s.c. MBP+CFA
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61 64 67 70 73 76 79 82
dzień obserwacji

Ryc. 3B



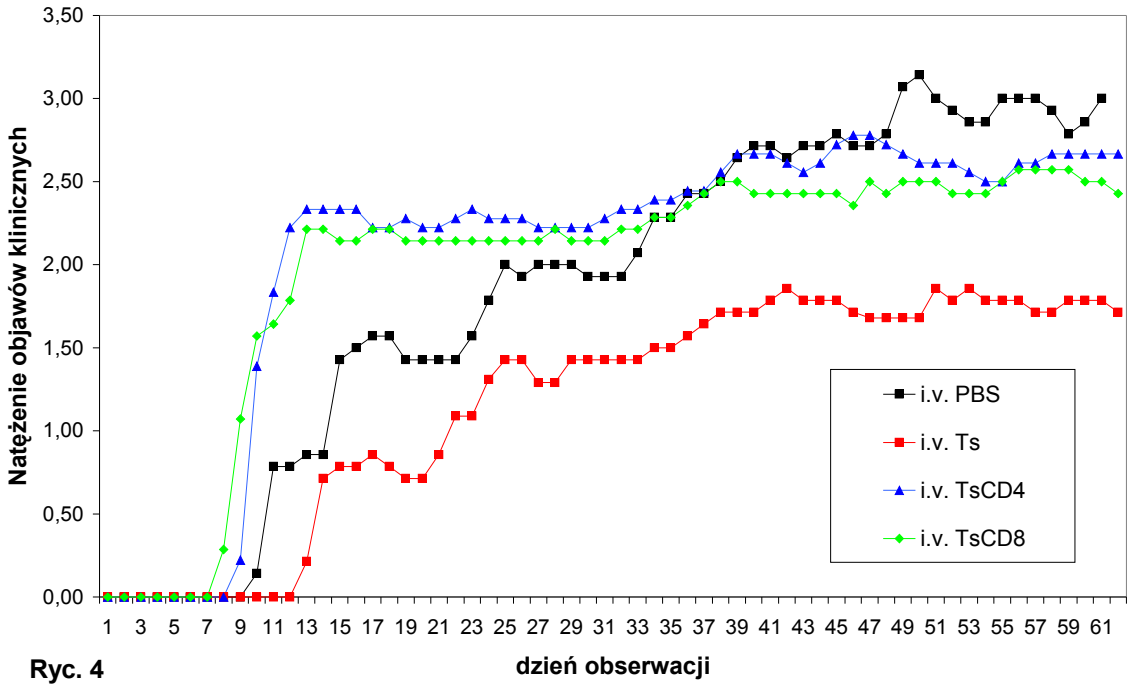
Ryc. 3C

Tabela 3. Zachorowalność defektywnych szczepów myszy toleryzowanych *e.c.* MBP w stosunku do grupy kontrolnej (*e.c.* PBS)

Szczep myszy	PBS		MBP	
	Liczba myszy w grupie	Ilość osobników chorujących [%]	Liczba myszy w grupie	Ilość osobników chorujących [%]
TCRδ -/-	28	82	27	37
CD1 -/-	15	80	14	22
β_2m -/-	15	73	15	60

4.4. Za supresję indukowaną przez aplikację MBP na skórę odpowiedzialne są limfocyty T z koreceptorami CD4 i CD8

W celu dokładniejszej oceny fenotypu komórek regulacyjnych indukowanych przez skórę, LNC pozyskane od myszy immunizowanych *e.c.* MBP traktowano mAb anty-CD4 lub anty-CD8 wraz z RC, bądź samym dopełniaczem (kontrola supresji). Po odpowiednim przygotowaniu komórek, ocenie ich ilości i żywotności (rozdział „Materiały i Metody"), dokonano transferu na naiwnych syngenicznych biorców B10.PL, których aktywnie immunizowano MBP z CFA w celu wywołania EAE. Wyniki przedstawione na Ryc. 4 pokazują, że podanie LNC pozyskanych od myszy toleryzowanych MBP na skórę, chroni biorców transferu przed rozwojem EAE. Dochodzi do opóźnienia pierwszych symptomów choroby w stosunku do kontroli pozytywnej oraz redukcji natężenia objawów klinicznych o prawie 50%. W dwóch grupach badanych, przed aktywną immunizacją podano zwierzętom *i.v.* LNC, które izolowano od myszy toleryzowanych MBP i które zostały dodatkowo pozbawione w selekcji negatywnej populacji komórek CD4 lub CD8. Zwierzęta tych grup nie wykazały opóźnienia choroby, wręcz przeciwnie, objawy początkowe EAE wystąpiły wcześniej niż w kontroli pozytywnej. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że w supresji indukowanej przez skórę mogą być zaangażowane limfocyty T $CD4^+$ i T $CD8^+$.



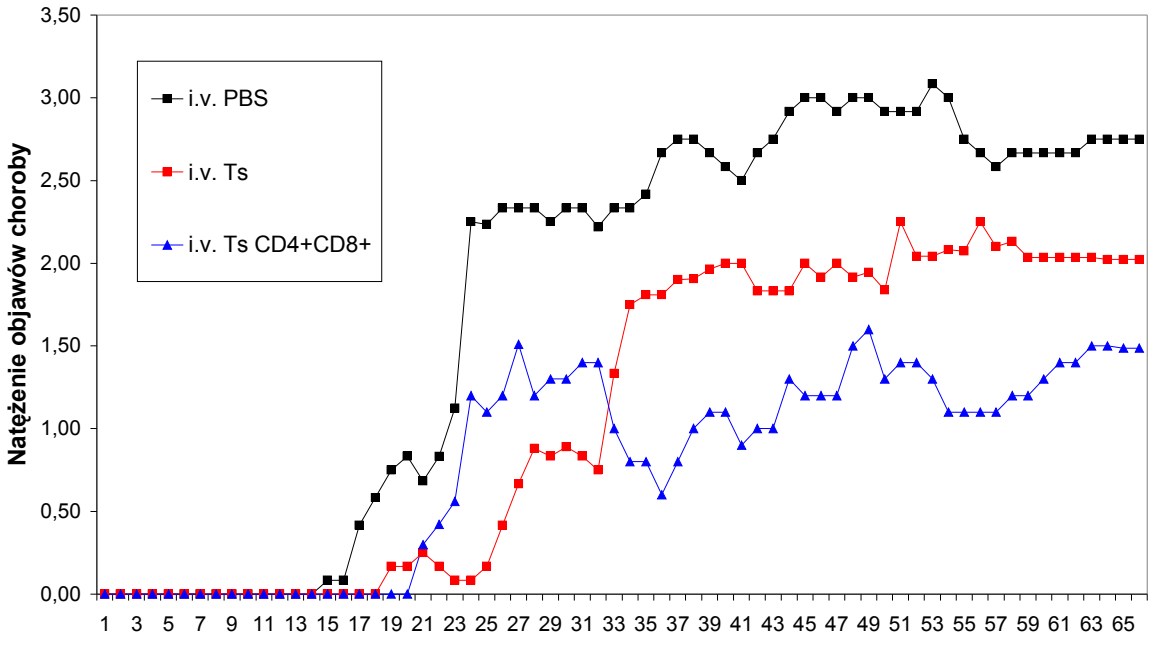
Ryc. 4

4.5. Limfocyty T regulacyjne indukowane przez immunizację *e.c.* MBP należą do populacji $CD4^+$ $CD8^+$.

Nasze wcześniejsze badania w układzie CS wykazały, iż *e.c.* immunizacja TNP-Ig prowadzi do indukcji komórek Ts o fenotypie $CD4^+$ $CD8^+$.

W celu sprawdzenia czy komórki regulacyjne indukowane przez naskórne podanie MBP należą do limfocytów T $CD4^+$ $CD8^+$, naiwnym biorcom podano *i.v.* wysortowane z użyciem cytofluorymetru przepływowego komórki $CD4^+$ $CD8^+$ w ilości $2x10^3$/mysz. W kontroli supresji podawano *i.v.* niesortowane (pełną pulę LNC) komórki regulacyjne w ilości $2x10^7$/mysz. Obie badane grupy wraz z kontrolą pozytywną, traktowaną *i.v.* samym PBS, poddano immunizacji MBP z CFA w celu indukcji EAE. Wyniki przedstawione na Ryc. 5 wskazują na to, że komórki T $CD4^+$ $CD8^+$ są zdolne do hamowania rozwoju EAE, podobnie jak komórki pełnej puli LNC pozyskane od myszy traktowanych MBP na skórę. W obu grupach badanych obserwowano istotne statystycznie ($p<0,02$) opóźnienie wystąpienia choroby o średnio 5 dni, jak również istotną statystycznie redukcję objawów klinicznych ($p<0,01$), obliczanych z 55 dni obserwacji względem kontroli pozytywnej. Różnica średnich skumulowanych objawów klinicznych wszystkich myszy w badanych grupach jest istotna statystycznie ($p<0,03$), natomiast średnia skumulowana objawów klinicznych wyłącznie chorych myszy nie wykazała statystycznej znamienności ($p>0,05$).

Podsumowując, uzyskane wyniki świadczą o tym, że aplikacja MBP na skórę indukuje powstanie komórek T regulacyjnych, które należą do populacji limfocytów T $CD4^+$ $CD8^+$.



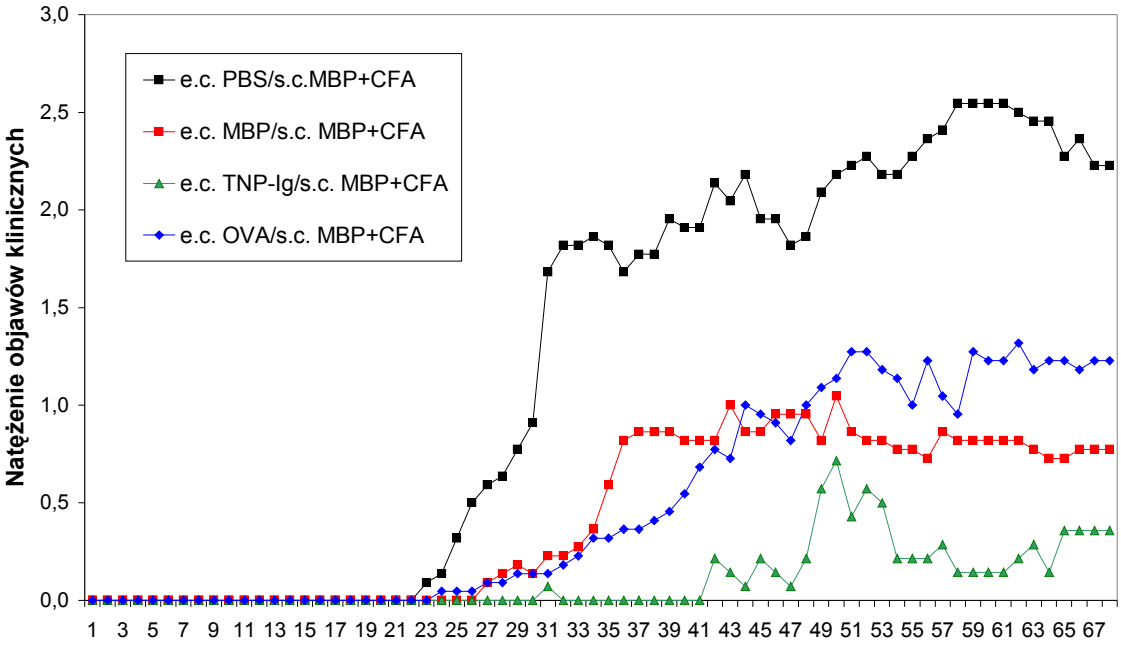
Ryc. 5

Tabela 4. Przebieg EAE u biorców wysortowanych komórek Ts $CD4^+$ $CD8^+$ w stosunku do grupy kontrolnej.

	PBS	Ts $CD4^+$ $CD8^+$
Liczba myszy	12	10
Zachorowalność (%)	83	60
Średni czas wystąpienia objawów EAE od dnia aktywnej immunizacji ± SE	18,8±1,7	24,3±2,1
Średnia objawów klinicznych w czasie 55 dni obserwacji ± SE	2,5±0,3	1,3±0,2
Średnia skumulowana objawów klinicznych wszystkich myszy ± SE	88,7±14,2	42,1±7
Średnia skumulowana objawów klinicznych chorych myszy ± SE	106±16	70,2±12
Śmiertelność (%)	33	0

4.6. Stan tolerancji immunologicznej indukowany przez skórę jest antygenowo nieswoisty

W celu sprawdzenia czy supresja indukowana przez aplikacją Ag na skórę wykazuje swoistość antygenową, myszy B10.PL traktowano w dniach „0" oraz „+4" MBP, OVA, TNP-Ig bądź samym PBS, a następnie w dniu „+7" zwierzęta te immunizowano MBP z CFA w celu wywołania EAE. Wyniki przedstawione na Ryc. 6 świadczą o tym, że immunizacja *e.c.* zarówno MBP, jak i antygenami nie reagującymi krzyżowo: TNP-Ig oraz OVA chroni przed rozwojem EAE. Rezultatem aplikacji na skórę myszy MBP lub OVA było opóźnienie choroby o około 9 dni, w przypadku TNP-Ig opóźnienie wyniosło 20 dni w stosunku do kontroli pozytywnej. Immunizacja *e.c.* MBP powoduje złagodzenie objawów klinicznych o 50%, podczas gdy toleryzacja TNP-Ig lub OVA powoduje redukcję symptomów o 60% względem kontroli pozytywnej. Z powyższego doświadczenia wynika, że tolerancja indukowana przez skórę jest antygenowo nieswoista.



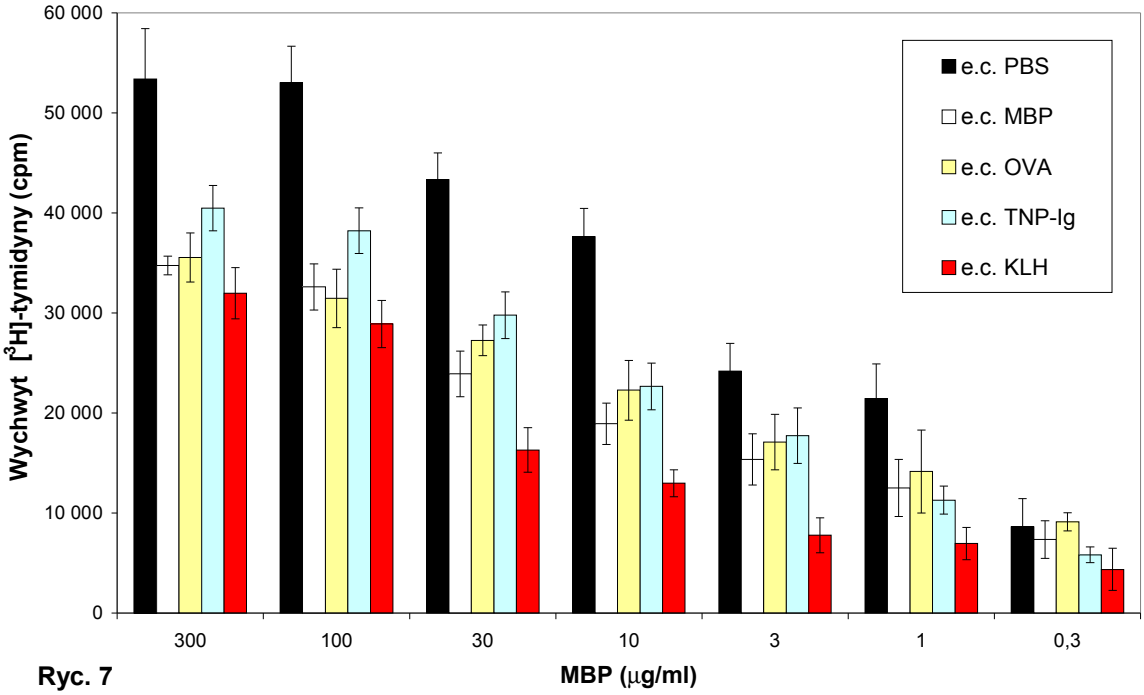
Ryc. 6

4.7. Naskórne podanie antygenu przed aktywną immunizacją hamuje proliferację komórek efektorowych Tef *in vitro*

W celu potwierdzenia wyników badań *in vivo* nad swoistością antygenową supresji indukowanej przez skórę wykonano dodatkowo test *in vitro*, w którym oceniano wpływ *e.c.* immunizacji na proliferację komórek LNC.

W niniejszym eksperymencie myszy szczepu B10.PL immunizowano *e.c.* MBP, OVA, TNP-Ig lub KLH, a w grupie kontrolnej aplikowano sam PBS jak w punkcie 4.6. W dniu „+7" po usunięciu gazowych opatrunków z Ag, zwierzęta immunizowano MBP z CFA. Po upływie 10 dni pobrano węzły chłonne pachowe i pachwinowe, następnie przeprowadzono test proliferacji opisany w punkcie 3.11. Wpływ naskórnej immunizacji antygenami: MBP, OVA, TNP-Ig i KLH przed aktywną immunizacją MBP z CFA przedstawia Ryc. 7.

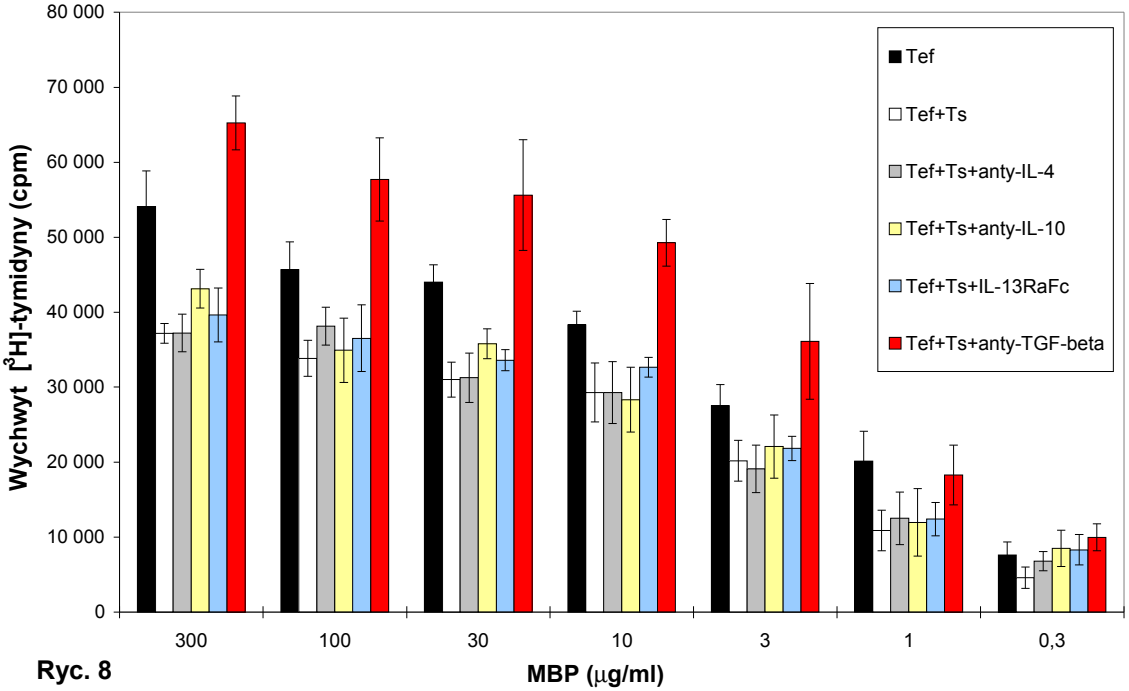
Prezentowane wyniki wykazują statystycznie znamienne ($p<0,03$) zahamowanie proliferacji LNC, pochodzących od myszy toleryzowanych wszystkimi testowanymi Ag w odniesieniu do LNC grupy kontrolnej (LNC myszy traktowanych *e.c.* PBS przed aktywną immunizacją), które oceniano poprzez pomiar inkorporacji [^{3}H]-tymidyny. Wyniki uzyskane *in vitro* w pełni potwierdzają brak swoistości antygenowej tolerancji indukowanej przez skórę w badaniach prowadzonych *in vivo*.



Ryc. 7

4.8. Komórki regulacyjne Ts hamują proliferację komórek efektorowych Tef przez uwalnianie TGF-β

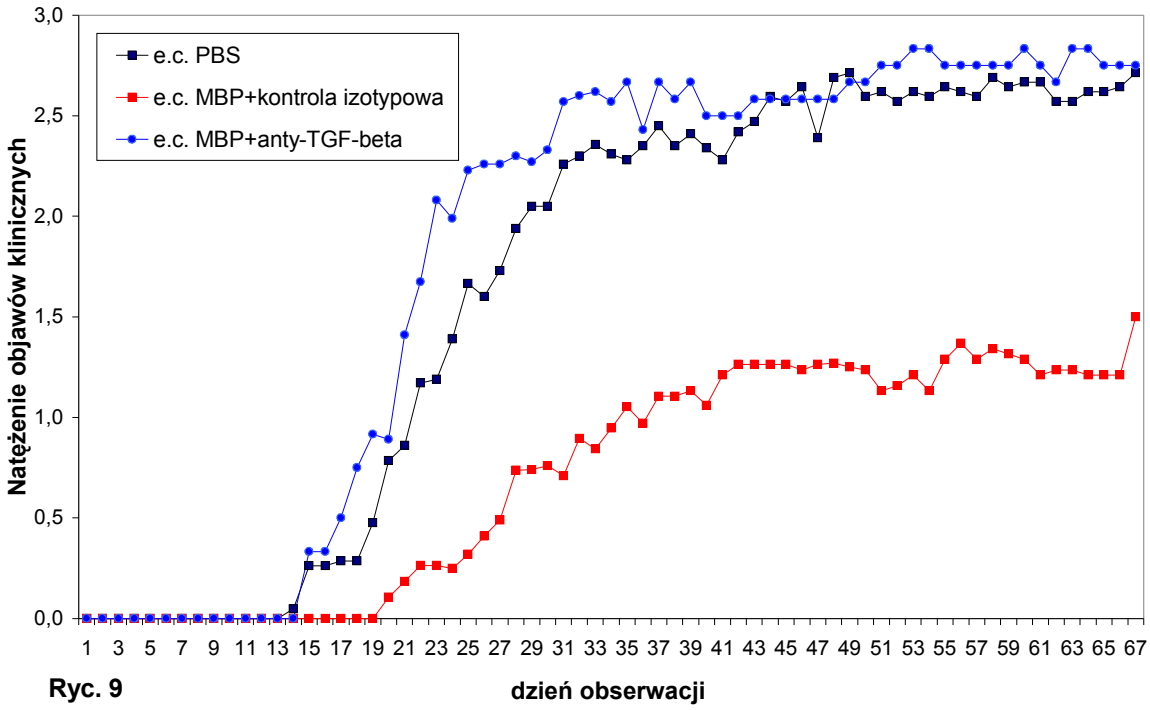
W celu zbadania mechanizmu, poprzez jaki komórki T regulacyjne hamują odpowiedź immunologiczną w przebiegu EAE, posłużono się testem proliferacji komórek efektorowych *in vitro*. Komórki efektorowe LNC pozyskane od zwierząt aktywnie immunizowanych MBP z CFA, w ilości $3x10^5$ hodowano same lub w obecności $6x10^4$ LNC od myszy immunizowanych *e.c.* MBP. LNC zwierząt toleryzowanych MBP traktowano mitomycyną C (kontrola supresji). Dodatkowo w pewnych grupach do hodowli łącznej komórek efektorowych i regulacyjnych dodawano neutralizujące mAb: anty-IL-4, anty-IL-10, anty-TGF-β lub IL-13Rα-Fc. Wyniki przedstawione na Ryc. 8 wskazują na to, że komórki regulacyjne izolowane od myszy toleryzowanych MBP, których własna proliferacja została zahamowana przez działanie mitomycyny C, hamują proliferację komórek efektorowych *in vitro*. Obserwowana supresja była zniesiona po dodaniu mAb neutralizujących TGF-β do hodowli łącznej obu populacji komórek. Neutralizacja cytokin: IL-4, IL-10 oraz IL-13 z użyciem odpowiednich mAb nie wpływała na stopień zahamowania proliferacji komórek T efektorowych przez limfocyty T regulacyjne.



Ryc. 8

4.9. Neutralizacja TGF-β *in vivo* znosi efekt tolerancji indukowanej przez skórę

W badaniach *in vitro* wykazano, że komórki T regulacyjne indukowane przez aplikację Ag na skórę hamują proliferację komórek efektorowych za pośrednictwem uwalnianego TGF-β. W niniejszym eksperymencie podjęto próbę sprawdzenia, czy TGF-β produkowany przez wspomniane komórki T regulacyjne jest również odpowiedzialny za hamowanie objawów EAE. W tym celu zwierzętom dwukrotnie aplikowano na skórę MBP (dzień „0" i dzień „+4"), w dniu „+6" i „+7" dokonano iniekcji 500 μg/mysz mAb anty-TGF-β każdorazowo lub przeciwciał kontrolnych (kontrola izotypowa), a następnie zwierzęta aktywnie immunizowano MBP z CFA. Myszy w grupie kontroli pozytywnej były traktowane *e.c.* PBS przed aktywną indukcją EAE. Wyniki przedstawione na Ryc. 9 wskazują na to, że podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach podanie MBP na skórę prowadzi do redukcji objawów klinicznych (około 50%) i opóźnienia wystąpienia symptomów EAE względem kontroli pozytywnej (6 dni). Natomiast przebieg choroby u zwierząt immunizowanych *e.c.* MBP, którym podano *i.v.* mAb anty-TGF-β przed aktywną immunizacją MBP z CFA, był porównywalny do EAE rozwijanego u myszy kontroli pozytywnej. Dodatkowo w grupie myszy traktowanych mAb anty-TGF-β nie obserwowano opóźnienia początku choroby względem grupy kontrolnej. Rezultaty badań prowadzonych *in vivo* w pełni potwierdzają wyniki uzyskane metodą *in vitro*, gdzie podanie MBP na skórę zwierząt indukuje populację komórek regulatorowych, które hamują rozwój procesu zapalnego w EAE poprzez uwalnianie TGF-β.

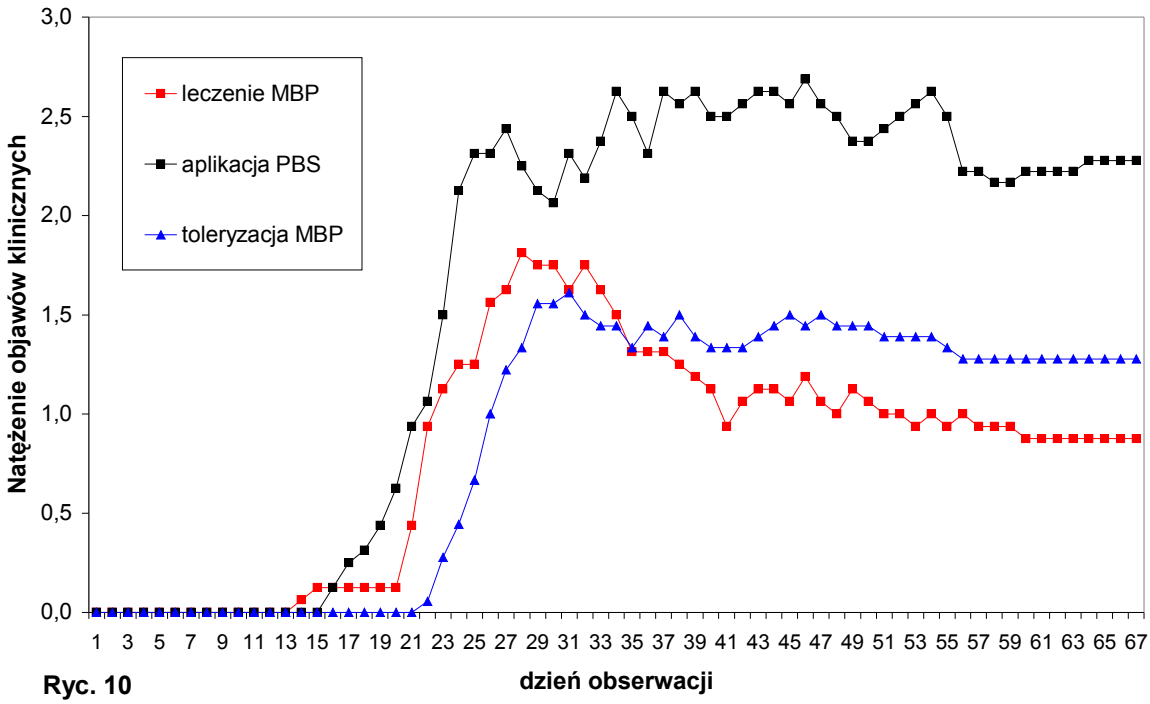


Ryc. 9

4.10. Aplikacja MBP na skórę chorych myszy hamuje dalszy rozwój EAE

W końcowym etapie badań podjęto próbę hamowania rozwoju EAE u zwierząt szczepu B10.PL aktywnie immunizowanych MBP z CFA, u których zaobserwowano pierwsze objawy choroby. W tym celu zwierzęta po aktywnej indukcji EAE podzielono na 2 grupy: kontrolę pozytywną, której po wystąpieniu symptomów choroby aplikowano na skórę sam PBS i grupę badaną, której podawano MBP. Pierwszego dnia, w którym zauważono symptomy choroby, stosowano w grupie badanej dawkę 100 μg MBP/mysz w 100 μl kremu, a przez następne 13 dni aplikowano dawkę podtrzymującą indukcję supresji 10 μg MBP/mysz w 100 μl kremu. W grupie kontrolnej podawano sam krem z PBS. Kontrolę supresji stanowiły zwierzęta toleryzowane przed wywołaniem choroby. Wyniki przedstawione na Ryc. 10 i Tabeli 5 wskazują na istotną statystycznie (p=0,002) redukcję objawów EAE w grupie zwierząt traktowanych MBP w trakcie rozwoju choroby w stosunku do kontroli pozytywnej. Różnica średnich skumulowanych objawów klinicznych między porównywanymi grupami jest znamienna statystycznie (p=0,01). Natomiast śmiertelne przypadki odnotowano jedynie w kontroli pozytywnej.

Podsumowując, uzyskane wyniki świadczą o tym, że aplikacja MBP na skórę chorych zwierząt może prowadzić do zahamowania dalszego rozwoju choroby, a co więcej, obserwowano cofanie się objawów i polepszenie ogólnej kondycji zwierząt.



Ryc. 10

Tabela 5. Przebieg EAE w grupie leczonej *e.c.* MBP ocenianej względem grupy kontrolnej (*e.c.* PBS).

	PBS	MBP
Liczba myszy	8	8
Średnia objawów klinicznych w czasie 55 dni obserwacji ± SE	2,3±0,2	1,1±0,3
Średnia skumulowana objawów klinicznych chorych myszy ± SE	84±17	44±11
Śmiertelność (%)	22	0

4.11. Analiza statystyczna wyników

Analizy statystycznej wyników doświadczeń prowadzonych *in vivo* dokonano przy użyciu dwustronnego testu U Manna-Whitnneya, natomiast wyników testów proliferacji przy użyciu dwustronnego testu t-Studenta. W obliczeniach posłużono się programem komputerowym Statistica w wersji 5.1. Wartość p=0,05 została przyjęta jako próg istotności statystycznej.

W tabelach przedstawiono parametry jakościowe eksperymentów w modelu EAE, zgodnie z analizami przedstawianymi powszechnie w literaturze naukowej.

5. Dyskusja

Alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) jest zwierzęcym modelem stwardnienia rozsianego (SM), schorzenia o podłożu autoimmunizacyjnym występującym u ludzi. EAE można wywołać u genetycznie predysponowanych szczepów myszy, szczurów czy też małp rhesus. Model zwierzęcy pozwala badać mechanizmy immunologiczne zaangażowane w patogenezie SM, jak również ułatwia opracowanie nowych metod terapii. Od wielu lat poszukuje się skutecznej metody pozwalającej na opanowanie procesu zapalnego rozwijającego się w SM. Podejmowano między innymi próby indukowania obwodowej tolerancji przez ekspozycję błon śluzowych na antygeny mieliny drogą pokarmową lub inhalacyjną.

W 1988 roku Higgins i Weiner donieśli, że EAE może być hamowane u szczurów Lewis przez doustne podawanie MBP [55]. Od tego czasu poczyniono wiele obiecujących odkryć w badaniach nad tolerancją indukowaną przez błony śluzowe u zwierząt, co zachęciło klinicystów do użycia tej metody w leczeniu pacjentów z SM. Podobnie jak w modelu zwierzęcym chorym podawano *per os* bydlęce MBP, a następnie badano populacje limfocytów T izolowane z krwi obwodowej pacjentów z postacią nawrotową SM. Wykazano, że w rezultacie przyjmowania MBP drogą pokarmową powstają linie komórkowe wydzielające większe ilości TGF-β [56]. Mimo uzyskania obiecujących wyników *in vitro*, kliniczne próby leczenia bydlęcym MBP zakończyły się niepowodzeniem, nie wykazano bowiem żadnych efektów korzystnych w stosunku do grupy placebo [57]. W związku z powyższym nadal prowadzone są intensywne badania zmierzające do opracowania skutecznej metody pozwalającej na regulację procesu zapalnego w SM.

Powszechnie wiadomo, że podanie Ag na śluzówki prowadzi do lokalnej odpowiedzi immunologicznej przy jednoczesnym wywołaniu tolerancji na obwodzie, co próbowano wykorzystać między innymi w terapii SM. Skóra podobnie jak błony śluzowe stanowi istotną barierę przed wnikającymi z otoczenia patogenami i pełni funkcję ochronną ustroju. Ze względu na pewne podobieństwa funkcjonalne błon śluzowych oraz skóry można przypuszczać, iż w obu tych narządach działają podobne mechanizmy immunologiczne. Zatem wydaje się być prawdopodobne, że podanie Ag na skórę, poza wywołaniem lokalnej odpowiedzi immunologicznej, może prowadzić do wystąpienia tolerancji na obwodzie.

Skóra przez wiele lat była traktowana jako organ, przez który można łatwo indukować odpowiedź immunologiczną, a której klasycznym przykładem jest reakcja nadwrażliwości kontaktowej (CS). Natomiast niewiele uwagi poświęcono skórze jako miejscu, poprzez które

można by wywołać stan tolerancji. Z końcem lat 90-tych ubiegłego stulecia Wang i wsp. wykazali, że podanie na skórę Ag białkowego, jakim jest owalbumina (OVA) prowadzi do produkcji przeciwciał IgE oraz IgG1. Syntezie wspomnianych izotypów przeciwciał towarzyszyła produkcja cytokin typowych dla limfocytów TH2. Kilka lat później Herrick i wsp. wykazali, że aplikacja Ag białkowego na skórę pozwala na indukcję TH2-zależnego modelu astmy u myszy [58, 59].

Przytoczone wyniki badań z dwóch różnych ośrodków naukowych pozwoliły na stworzenie hipotezy, iż podobnie jak ma to miejsce w przypadku błon śluzowych, również podanie Ag białkowego na skórę przy spełnieniu odpowiednich warunków może prowadzić do przesunięcia odpowiedzi immunologicznej z TH1 w kierunku TH2, co z kolei mogłoby pozwolić na negatywną regulację odpowiedzi TH1-zależnej. Badania prowadzone przez M. Szczepanika w modelu CS wykazały, że istotnie podanie Ag białkowego na skórę przed wywołaniem reakcji CS prowadzi do znacznego zahamowania odpowiedzi TH1-zależnej [60, 61, 62].

W niniejszej pracy podjęto próbę indukowania supresji odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialnej za patomechanizm EAE poprzez aplikację na skórę zasadowego białka mieliny (MBP). Wyniki przedstawione na Ryc. 1 oraz w Tab. 1 wskazują na to, że podanie MBP na skórę w postaci opatrunku z gazy prowadzi do indukcji stanu tolerancji przejawiającej się zmniejszoną zachorowalnością, łagodniejszym przebiegiem choroby oraz opóźnieniem objawów klinicznych w stosunku do zwierząt traktowanych samym PBS na skórę, a optymalna dawka Ag wywołująca maksymalne zahamowanie choroby znajduje się pomiędzy 100 μg a 1 mg (Ryc. 1B). W kolejnych doświadczeniach wykazano, że indukowany stan tolerancji można przenieść na naiwnych syngenicznych biorców za pośrednictwem komórek układu chłonnego. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość indukowania tzw. tolerancji zakaźnej, którą można przenieść za pośrednictwem komórek regulacyjnych generowanych przez aplikację Ag na skórę. Bardziej wnikliwe badania nad supresją indukowaną przez skórę wykazały, że powstałe komórki regulacyjne posiadają znaczną aktywność supresyjną, gdyż zaledwie $4x10^5$ całkowitej puli komórek węzłów chłonnych (nieseparowanych) hamowało rozwój choroby u biorców transferu.

W badaniach wykonanych na defektywnych szczepach myszy TCRδ -/- i CD1 -/- stwierdzono, że zarówno limfocyty Tγδ, jak również komórki NKT nie odgrywają istotnej roli w rozwoju opisywanej tolerancji, pomimo że obie wspomniane populacje komórek T mogą pełnić funkcje regulacyjne w innych badanych układach. Z kolei doświadczenia z wykorzystaniem myszy szczepu β_2m -/- wskazywały na to, że w supresji indukowanej przez skórę mogą być zaangażowane limfocyty T $CD8^+$. Dalsze badania, w których dokonano

negatywnej selekcji limfocytów T $CD4^+$ lub $CD8^+$ przy użyciu odpowiednich mAb i RC wykazały zniesienie aktywności supresyjnej komórek węzłów chłonnych pochodzących od myszy uprzednio toleryzowanych przez skórę. Uzyskane wyniki sugerują, że zarówno limfocyty T $CD4^+$, jak też limfocyty T $CD8^+$ pełnią funkcję komórek supresyjnych w badanym modelu. Jednakże inne badania w układzie CS wykazały, że rekonstytucja populacji komórek $CD4^-$ limfocytami T $CD8^-$ nie przywracała aktywności supresyjnej komórkom regulacyjnym indukowanym przez podanie Ag białkowego na skórę [63], co może sugerować, że omawiana komórka supresyjna posiada na swojej powierzchni zarówno koreceptor CD4 jak i CD8. Wyniki te zostały poparte badaniami cytometrycznymi, gdzie obserwowano pojawienie się około 2-3% komórek $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ w obwodowych węzłach chłonnych oraz śledzionie w stosunku do wartości kontrolnej <1% [64]. Podwyższony poziom komórek $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ obserwowano w dniu „+7" od naskórnej immunizacji i stan ten utrzymywał się przez okres jednego tygodnia. Następnie odsetek komórek $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ powracał do wartości obserwowanej u myszy traktowanych samym PBS na skórę.

W celu sprawdzenia hipotezy, że podanie Ag białkowego na skórę prowadzi do powstania komórek supresyjnych należących do populacji podwójnie pozytywnych limfocytów T $CD4^+$ $CD8^+$, naiwnym biorcom podawano $2x10^3$ komórek T $CD4^+$ $CD8^+$ wyizolowanych od myszy toleryzowanych tuż przed aktywnym wywołaniem EAE. Komórki te pozyskano metodą izolacji przy użyciu sortera komórkowego FACS z całej puli komórek węzłów chłonnych toleryzowanych zwierząt. Niniejsze doświadczenie wykazało, iż faktycznie naskórna immunizacja MBP prowadzi do powstania populacji komórek T supresyjnych należących do rzadkiej populacji limfocytów T $CD4^+$ $CD8^+$. Uzyskane wyniki są podobne do rezultatów badań nad tolerancja pokarmową, gdzie wykazano obecność limfocytów śródnabłonkowych (IEL), należących do populacji komórek $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ i produkujących cytokiny typowe dla limfocytów TH2 [65].

Z kolei wyniki innych badań wskazują na zdolność komórek IEL $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ do sekrecji cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-10 oraz TGF-β, co może wskazywać na ich aktywność supresyjną [66]. Jak dotąd rola komórek $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ w obwodowych narządach chłonnych nie jest znana. Istnieją doniesienia, że odsetek komórek $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ wzrasta u myszy oraz ludzi na obwodzie w okresie płodowym, jak również w przypadku określonych typów zakażeń, schorzeń autoimmunizacyjnych i nowotworowych, u biorców przeszczepu oraz w procesie starzenia się organizmu [67, 68]. Limfocyty T $CD4^+$ $CD8^+$ u ludzi zdrowych oraz u gryzoni (myszy i szczurów) stanowią tylko nieznaczny procent

limfocytów T krwi obwodowej, poniżej 1%, podczas gdy u wielu gatunków zwierząt (małp, świń, kurczaków) mogą stanowić dominującą populację komórek T. Komórki te wykazują fenotyp komórek pamięci, ekspresję powierzchniową molekuły CD8$\alpha\alpha$, a ich odsetek wzrasta z wiekiem zwierząt [69].

W 1985 r. Blue i wsp. metodą cytofluorymetrii przepływowej wykryli po raz pierwszy obecność około 3% komórek CD4+ CD8+ w krwi obwodowej zdrowych ludzi. Jednoczesna ekspresja T4 i T8 dotyczyła głównie dużych limfocytów, podobnych do blastów i wydawała się korelować ze stanem aktywacji komórek. W innych badaniach wykazano, że stymulacja *in vitro* limfocytów krwi obwodowej konkawaliną A prowadzi także do koekspresji T4 i T8 na powierzchni około 60% limfocytów [70]. Jednak jak dotąd funkcja wspomnianej populacji komórek nie jest poznana.

Limfocyty podwójnie pozytywne $CD4^+$ $CD8^+$ zaliczane są, obok szeregu innych do populacji komórek niekonwencjonalnych, którym przypisuje się powstawanie w środowisku pozagrasiczym. W 1989 roku Patel i wsp. wykazali we krwi obwodowej ludzi 12 klonów komórkowych o fenotypie $CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^-$ i 5 klonów komórek $CD3^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ zdolnych do produkcji cytokin: IL-2, IFN-γ, oraz TNF. Niektóre klony komórek posiadały aktywność cytotoksyczną niezależną od MHC, inne hamowały lub stymulowały różnicowanie limfocytów B, stanowiąc dla nich efektywne komórki pomocnicze. Działanie aktywujące lub hamujące względem limfocytów B zależało od charakteru zastosowanego czynnika indukującego odpowiedź komórek w warunkach *in vitro*. Niektórzy autorzy twierdzą, że funkcjonalna dwoistość komórek nie jest rzadkim zjawiskiem i wskazuje na ich potencjał immunoregulacyjny [71].

Z kolei Pette i wsp. w 1990 r. dokonali interesującej obserwacji, że wśród swoistych względem MBP limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej chorych na SM, większość komórek posiadało fenotyp $CD3^+$ $CD4^+$ $CD8^-$, podczas gdy autoreaktywne klony pozyskane od zdrowych pacjentów grupy kontrolnej wykazały fenotyp $CD3^+$ $CD4^+$ $CD8^+$ w zakresie 22-87% całkowitej puli komórek [72]. Wyniki wspomnianych badań mogą sugerować udział komórek podwójnie pozytywnych w procesach immunoregulacji i utrzymaniu homeostazy immunologicznej, które u chorych na SM zostały zaburzone.

Jak wspomniano wcześniej, u naiwnych myszy limfocyty T $CD4^+$ $CD8^+$ stanowią mniej niż 1% komórek T, a ich pochodzenie nie jest znane. Komórki te mogą stanowić populację limfocytów T, które przedwcześnie opuściły grasice lub komórki T $CD4^+$ $CD8^-$ na powierzchni, których ponownie pojawił się koreceptor CD8 w wyniku aktywacji lub ekspozycji na działanie cytokin np.: IL-4. W opisywanym przypadku tolerancji indukowanej przez skórę pojawienie się w obwodowych narządach chłonnych komórek T $CD4^+$ $CD8^+$ może być

wynikiem przedwczesnej ucieczki nie w pełni dojrzałych limfocytów T z grasicy. Z kolei powrót poziomu komórek T $CD4^+$ $CD8^+$ w ciągu jednego tygodnia do wartości obserwowanej u naiwnych myszy może sugerować, iż komórki $CD4^+$ $CD8^+$ przekształcają się na obwodzie w komórki T $CD4^+$ [64].

W dalszych badaniach nad funkcją immunoregulacyjną komórek T $CD4^+$ $CD8^+$, gdzie użyto oczyszczonej populacji komórek supresyjnych przy użyciu sortera komórkowego FACS wykazano, że przeniesienie zaledwie $2x10^3$ limfocytów T $CD4^+$ $CD8^+$ na naiwnych biorców przed aktywnym wywołaniem EAE prowadziło zarówno do opóźnienia rozwoju choroby, jak i redukcji objawów klinicznych o około 50%. Podobne obserwacje zostały poczynione w innych układach badawczych. M. Szczepanik i wsp. wykazali, że zaledwie $2,5x10^3$ komórek Tγδ supresyjnych było w stanie zahamować aktywność $7x10^7$ komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej [73]. Zatem, uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą świadczyć o dużej aktywności supresyjnej limfocytów T $CD4^+$ $CD8^+$ badanych w modelu EAE, analogicznie do innych doniesień na temat roli komórek regulacyjnych.

W dalszym etapie badań podjęto próbę określenia swoistości antygenowej komórek T supresyjnych indukowanych przez podanie antygenu białkowego na skórę. W badaniach *in vivo* zaobserwowano, że podanie na skórę zarówno MBP, jak również antygenów nie reagujących krzyżowo: TNP-Ig lub OVA przed immunizacją MBP z CFA prowadziło do opóźnienia wystąpienia choroby oraz znacznej redukcji objawów klinicznych. Wyniki badań *in vivo* zostały w pełni potwierdzone testami *in vitro* z użyciem czterech antygenów nie reagujących krzyżowo: MBP, TNP-Ig, OVA oraz KLH. Uzyskane wyniki wskazują na to, że supresja indukowana przez aplikację antygenu na skórę nie wykazuje swoistości antygenowej. W klasycznej supresji mediowanej przez limfocyty T regulatorowe zarówno komórka supresyjna, jak również komórka efektorowa zazwyczaj są swoiste dla tego samego antygenu. Brak swoistości antygenowej obserwowany w opisywanym modelu tolerancji wywołanej przez podanie antygenu na skórę przypomina zjawisko określane jako efekt „przygodnego widza" (bystander suppression) [74, 75], gdzie komórka supresyjna aktywowana przez określony antygen wydziela antygenowo nieswoiste cytokiny, które hamują odpowiedź immunologiczną mediowaną przez komórki T efektorowe o innej swoistości aniżeli limfocyt T supresyjny. W modelu tolerancji pokarmowej, antygen podany *per os* indukuje komórki T supresyjne, które uwalniają IL-4, IL-10 oraz TGF-β [76]. Wymienione cytokiny są z kolei odpowiedzialne za wystąpienie supresji „przygodnego widza". Wykazano w badaniach prowadzonych *in vivo,* jak również *in vitro*, że tolerancja pokarmowa jest wynikiem antygenowo swoistej aktywacji komórek T supresyjnych. Jednak

raz indukowane antygenowo swoiste komórki T supresyjne wywierają swój efekt w fazie efektorowej za pośrednictwem uwalnianych antygenowo nieswoistych cytokin [74, 75].

W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach nad tolerancją indukowaną przez podanie antygenu na skórę wykazano, że aplikacja każdego z testowanych antygenów białkowych prowadzi do znacznego złagodzenia przebiegu EAE. Podobne obserwacje poczyniono w modelu reakcji CS oraz DTH, gdzie komórki T supresyjne indukowane drogą naskórnej immunizacji antygenem hamowały odpowiedz TH1-zależną, w sposób antygenowo nieswoisty [61, 62]. Z przytoczonych wyników badań wynika, że obecność antygenu odpowiedzialnego za powstanie komórek T supresyjnych nie jest konieczna w fazie efektorowej supresji. To z kolei może wskazywać na to, że supresja indukowana przez skórę działa na drodze innych mechanizmów aniżeli tych, które występują w tolerancji pokarmowej, bądź antygen użyty do indukcji tolerancji przez skórę pozostaje na długo w obwodowych narządach chłonnych, albo też uwalniane przez komórki T supresyjne cytokiny przeciwzapalne interferują z indukcją i/lub funkcją efektorową limfocytów TH1.

W dalszej części badań podjęto się zadania określenia mechanizmu działania komórek Ts, indukowanych przez podanie MBP na skórę. W tym celu komórki węzłów chłonnych od myszy toleryzowanych przez skórę hodowano wraz z komórkami efektorowymi węzłów chłonnych od myszy aktywnie immunizowanych MBP z CFA w obecności mAb neutralizujących IL-4, IL-10, TGF-β lub IL-13Rα-Fc, bądź też w samym medium. Doświadczenie to wykazało, że neutralizacja TGF-β znosiła supresję mediowaną przez komórki Ts indukowane przez podanie antygenu na skórę, podczas gdy neutralizacja IL-4, IL-10 czy też IL-13 nie wywierała żadnego efektu. W celu potwierdzenia wyników badań uzyskanych *in vitro* wykonano dodatkowe doświadczenie, gdzie zwierzęta toleryzowane przez podanie antygenu na skórę traktowano mAb neutralizującymi TGF-β przed wywołaniem EAE. Niniejszy eksperyment w pełni potwierdził badania *in vitro* wskazując na kluczową rolę TGF-β w tolerancji indukowanej przez aplikację antygenu na skórę. TGF-β produkowany jest przez populacje komórek T $CD4^+$ i T $CD8^+$, i jest ważnym mediatorem aktywnej supresji w tolerancji pokarmowej. Czynnik ten pełni również istotną role w jelitach w przełączaniu klas przeciwciał przez lokalne limfocyty B. Za rolą TGF-β w regulacji procesów immunologicznych przemawiają miedzy innymi obserwacje poczynione u defektywnych szczepów myszy TGF-β -/-, u których występują wielonarządowe nacieki zapalne, co sugeruje, że TGF-β bierze udział w utrzymaniu immunologicznej homeostazy w organizmie. Świadczyć o tym mogą również doniesienia na temat roli TGF-β w procesie naturalnego

zdrowienia u zwierząt chorujących na EAE, czy też zanik ognisk zapalnych opisywany w niektórych przypadkach collitis pod wpływem tego czynnika [46].

Jak wspomniano wcześniej podanie antygenu drogą pokarmową indukuje powstanie komórek Ts, które osiągają swój efekt supresyjny na drodze tzw. supresji „przygodnego widza" za pośrednictwem uwolnionych cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-4, IL-10 oraz TGF-β. Wyniki badań nad tolerancją indukowaną przez skórę wskazują na znaczne podobieństwo opisywanego fenomenu supresji do mechanizmów tolerancji śluzówkowej, co tym samym sugeruje podobieństwo mechanizmów supresji działających na dwóch powierzchniach organizmu.

Pewnego rodzaju podobieństwo do prezentowanych w niniejszej pracy badań stanowią doświadczenia prowadzone w Laboratorium Janeway'a. Wykazano w nich, że podobnie jak w moich badaniach naskórna aplikacja antygenu prowadzi do złagodzenia przebiegu EAE [77]. Jednakże istnieją zasadnicze różnice pomiędzy moimi wynikami a rezultatami Bynoe i wsp. Autorka wspomnianej pracy wykazuje, że indukowane przez nią komórki T regulacyjne stanowią populację antygenowo swoistą, podczas gdy supresja w moich badaniach jest antygenowo nieswoista. Ta istotna różnica może być związana z tym, że badania Bynoe były prowadzone na szczepie myszy transgenicznych z receptorem TCR swoistym dla MBP, u których możliwe jest jedynie indukowanie odpowiedzi swoistej dla MBP. W moich badaniach natomiast posłużyłam się szczepem myszy B10.PL zdolnych do odpowiedzi na większość antygenów, co stanowi bardziej naturalny układ badawczy. Jednocześnie do wywołania tolerancji posłużyłam się całym białkiem MBP, podczas gdy Bynoe peptydem Ac1-11, co również może mieć istotny wpływ na przebieg i charakter indukowanej supresji. Kolejną różnicą pomiędzy moimi wynikami badań, a uzyskanymi przez Bynoe jest fenotyp komórek supresyjnych. W moich badaniach wykazałam, że *e.c.* ekspozycja na MBP prowadzi do powstania komórek T supresyjnych $CD4^+$ $CD8^+$, podczas gdy w modelu Bynoe są to komórki TCR MBP transgeniczne $CD4^+$. Ostatnią różnicą pomiędzy moimi badaniami, a doświadczeniami prowadzonymi przez Bynoe jest mechanizm supresji. Bynoe w swej pracy nie wskazuje mechanizmu działania indukowanych komórek T regulacyjnych, podczas gdy w moim układzie badawczym komórki Ts hamują proces zapalny w EAE za pośrednictwem wydzielanego TGF-β.

Dotychczas prezentowane przeze mnie wyniki badań dowodzą, iż podanie antygenu białkowego na skórę prowadzi do powstania komórek Ts, które za pośrednictwem uwolnionego TGF-β efektywnie hamują proces zapalny towarzyszący EAE. O ile wyniki wcześniej przedstawionych doświadczeń mogą posiadać pewną wartość poznawczą, o tyle ich przydatność praktyczna jest ograniczona, ponieważ stan tolerancji we wszystkich eksperymentach był wywołany przed indukcją choroby. Z klinicznego punktu widzenia bardziej istotne jest to, czy możliwe będzie manipulowanie niepożądaną odpowiedzią immunologiczną w momencie wystąpienia choroby.

W tym celu wykonano dodatkowe doświadczenie, gdzie zwierzętom podawano MBP na skórę w momencie wystąpienia pierwszych objawów klinicznych. Wyniki przedstawione na Ryc. 10 w sposób jednoznaczny wykazują, że podanie MBP na skórę w chwili pojawiania się choroby prowadzi do znacznego złagodzenia jej przebiegu klinicznego do poziomu podobnego do stanu tolerancji indukowanej przed wywołaniem EAE.

Podsumowując, przedstawiona w niniejszej pracy metoda wywołania tolerancji przez podanie białkowego antygenu na skórę dzięki skuteczności i prostocie użycia oraz braku inwazyjności stwarza nowe możliwości terapii schorzeń autoimmunizacyjnych, u podstaw których leży przewlekły proces zapalny.

6. Wnioski

1) Wyniki badań przeprowadzonych na myszach szczepu B10.PL (H-2^u) (rozwijających postać chroniczną EAE) wskazują na to, że naskórna aplikacja białka MBP przed immunizacją MBP z CFA prowadzi do znacznego opóźnienia wystąpienia choroby, jak również obniżenia objawów klinicznych przeciętnie o 50% w odniesieniu do kontroli pozytywnej. Optymalna dawka MBP, która hamuje rozwój odpowiedzi komórkowej TH1-zależnej, odpowiedzialnej za przewlekły proces zapalny w EAE, zawiera się w przedziale pomiędzy 100μg a 1 mg/mysz.

2) Wyniki doświadczeń jednoznacznie wskazują również na możliwość przeniesienia stanu tolerancji na naiwnych syngenicznych biorców przy pomocy komórek regulacyjnych izolowanych z tkanki limfatycznej toleryzowanych dawców (węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych oraz śledziony). Do zahamowania rozwoju choroby wystarcza przeniesienie na naiwnych biorców zaledwie $4x10^5$/mysz komórek węzłów chłonnych.

3) W badaniach wykonanych na defektywnych szczepach myszy: TCRδ -/-, CD1 -/-, β_2m -/- o podłożu genetycznym B10.PL (H-2^u) stwierdzono, że w tolerancji indukowanej przez skórę nie biorą udziału komórki NKT oraz limfocyty TCRγδ, podczas gdy brak supresji obserwowany u myszy szczepu β_2m -/- wskazuje na zaangażowanie limfocytów T $CD8^+$ w powstawaniu opisanej tolerancji. Na drodze selekcji negatywnej oraz sortowania komórkowego z użyciem FACSu wykazano, że komórką supresyjną indukowaną przez skórę jest limfocyt T $CD4^+$ $CD8^+$ i zaledwie $2x10^3$ tych komórek jest w stanie zahamować rozwój EAE.

4) Badania *in vivo* z wykorzystaniem trzech nie reagujących krzyżowo Ag: MBP, OVA oraz TNP-Ig wykazały, że supresja indukowana przez skórę nie wykazuje swoistości antygenowej. Wyniki badań *in vivo* zostały w pełni potwierdzone testami *in vitro*, gdzie oceniano inkorporację [^{3}H]-tymidyny przez komórki T efektorowe. Brak swoistości antygenowej obserwowany w opisywanym modelu tolerancji wywołanej przez podanie antygenu na skórę przypomina zjawisko określane jako efekt „przygodnego widza", gdzie komórka supresyjna aktywowana przez określony antygen wydziela antygenowo nieswoiste cytokiny, które hamują odpowiedź immunologiczną mediowaną przez komórki T efektorowe o innej swoistości aniżeli limfocyt T supresyjny.

5) Kolejne badania przeprowadzone w układzie *in vitro* dotyczące jednoczesnej hodowli komórek regulacyjnych z komórkami efektorowymi EAE w obecności odpowiednich przeciwciał monoklonalnych neutralizujących poszczególne cytokiny (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β) wykazały, że efekt supresji jest mediowany za pośrednictwem TGF-β. Wyniki uzyskane w testach *in vitro* zostały w pełni potwierdzone badaniami *in vivo* z podaniem mAb anty-TGF-β grupie myszy uprzednio toleryzowanych MBP.

6) W końcowym etapie badań podjęto próbę hamowania rozwoju EAE u myszy aktywnie immunizowanych MBP z CFA, z użyciem metody naskórnej aplikacji MBP przez okres 14 dni od momentu wystąpienia pierwszych objawów choroby. Obserwowano wówczas, że aplikacja MBP na skórę chorych zwierząt może prowadzić do zahamowania dalszego rozwoju choroby, a co więcej do cofania się objawów i polepszenia ogólnej kondycji zwierząt. Poczynione obserwacje wymagają dalszych badań w celu poznania możliwości manipulowania niepożądaną odpowiedzią immunologiczną w momencie wystąpienia choroby, a w konsekwencji do opracowania skutecznych metod terapii.

7. Literatura

1. Stinissen P., Raus J., Zhang J.: Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. Crit. Rev. Immunol. 1997; 17: 33-75.

2. Herndon R. M.: Multiple Sclerosis: Immunology, Pathology and Pathophysiology. New York: Demos Medical Publishing, 2003.

3. Alperovitch A., Berr C., Cambon-Thomsen A., Puel J., Dugoujon J. M., Ruidavets J. B., Clanet M.: Viral antibody titers, immunogenetic markers, and their interrelations in multiple sclerosis patients and controls. Hum. Immunol. 1991; 31: 94-99.

4. Challoner P. B., Smith K. T., Parker J. D., MacLeod D. L., Coulter S. N., Rose T. M., Schultz E. R., Bennett J. L., Garber R. L., Chang M., Schad P. A., Stewart P. A., Nowinski R. C., Brown J. P., Burmer P. C.: Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92: 7440-7444.

5. Hafler D. A., Weiner H. L.: Antigen-specific immunosuppression: oral tolerance for the treatment of autoimmune disease. Chem. Immunol. 1995; 60: 126-149.

6. Compston A., Ebers G., Lassmann H., McDonald I., Matthews B., Wekerle H.: The story of multiple sclerosis. In McAlpine's Multiple Sclerosis, New York: Churchill Livingstone. 1998; 3-40.

7. Correale J., Gilmore W., McMillan M., Li S., McCarthy K., Le T., Weiner L. P.: Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific Tcell clones during the course of multiple sclerosis. J. Immunol. 1995; 154: 2959-2968.

8. Stuerzebecher S., Martin R.: Neuroimmunology of multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. Neuroimaging Clin. N. Am. 2000; 10: 649-668.

9. Washington R., Burton J., Todd R., Newman W., Dragovic L., Dore-Duffy P.: Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis. Ann. Neurol. 1994; 35: 89-97.

10. Selmaj K., Brosnan C. F., Raine C. S.: Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88: 6452-6456.

11. Aloisi F., Ria F., Adorini L.: Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. Immunol. Today. 2000; 21: 141-147.

12. Link H., Huang Y. M., Masterman T., Xiao B. G.: Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 2001; 114: 1-7.

13. Bartholome E. J., Willems F., Crusiaux A., Thielemans K., Schandene L., Goldman M.: Interferon-beta inhibits Th1 responses at the dendritic cell level. Relevance to multiple sclerosis. Acta Neurol. Belg. 1999; 99: 44-52.

14. Pettinelli C. B., McFarlin D. E.: Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. J. Immunol. 1981; 127: 1420-1423.

15. Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according, to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 1986; 136: 2348-2357

16. Panitch H. S., Bever C. T. Jr.: Clinical trials of interferons in multiple sclerosis. What have we learned? J. Neuroimmunol. 1993; 46: 155-164.

17. Selmaj K., Raine C. S.: Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. Neurology 1995; 45: 44-49.

18. Mendel I., Katz A., Kozak N., Ben-Nun A., Revel M.: Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. Eur. J. Immunol. 1998; 28: 1727-1737.

19. Kennedy K. J., Strieter R. M., Kunkel S. L., Lukacs N. W., Karpus W. J.: Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemotactic protein-1. J. Neuroimmunol. 1998; 92: 98-108.

20. Brocke S., Gijbels K., Allegretta M., Ferber I., Piercy C., Blankenstein T., Martin R., Utz U., Karin N., Mitchell D., Veromaa T., Waisman A., Gaur A., Conlon P., Ling N., Fairchild P. J., Wraith D. C., O'Garra A., Fathman C. G., Steinman L.: Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. Nature 1996; 379: 343-346.

21. Bettelli E., Das M. P., Howard E. D., Weiner H. L., Sobel R. A., Kuchroo V. K.: IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. J. Immunol. 1998; 161: 3299-3306.

22. Cua D. J., Groux H., Hinton D. R., Stohlman S. A., Coffman R. L.: Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. 1999; 189: 1005-1010.

23. Wyss-Coray T., Lin C., Yan F., Yu G. Q., Rohde M., McConlogue L., Masliah E., Mucke L.: TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. Nat. Med. 2001; 7: 612-618.

24. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. Neurology 1999; 53: 457-465.

25. Selmaj K.: Postępowanie w stwardnieniu rozsianym. Nowa Klinika 1999; 6: 222-227.

26. Stelmasiak Z.: Praktyczne aspekty stwardnienia rozsianego. Medycyna Rodzinna 2001; 12: 5-9.

27. Teitelbaum D., Arnon R., Sela M.: Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. Immunology 1999; 96: 3842-3847.

28. Aharoni R., Teitelbaum D., Sela M., Arnon R.: Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997, 94: 10821-10826.

29. Twycross R.: Symptom management in advanced cancer. 2nd edition, Oxford: Radcliffe Medical Press 1997: 222-231.

30. Tanuma N., Abe S., Shin T., Kojima T., Ishihara Y., Arai Y., Toyoshima S., Matsumoto Y.: Pretreatment with T cell receptor peptides using a conventional immunization protocol does not induce effective protection against autoimmune encephalomyelitis. Cell. Immunol. 1996; 168: 85-90.

31. Stinissen P., Zhang J., Medaer R., Vandevyver C., Raus J.: Vaccination with autoreactive T cell clones in multiple sclerosis: overview of immunological and clinical data. J. Neuroscience Res. 1996, 45: 500-511.

32. Bright J. J., Topham D. J., Nag B., Lodge P. A., Sriram S.: Vaccination with peptides from MHC class II beta chain hypervariable region caused allele-specific suppression of EAE. J. Neuroimmunol. 1996, 67: 119-124.

33. Tuohy V. K., Mathisen P. M.: T cell design for therapy in autoimmune demyelinating disease. J. Neuroimmunol. 2000, 107: 226-232.

34. Subramanian S., Matejuk A., Zamora A., VandenBark A. A., Offner H.: Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. J. Immunol. 2003; 170: 1548-1555.

35. Canella B., Gaupp S., Tilton R. G., Raine C. S.: Differential efficacy of synthetic antagonist VLA-4 during the course of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neurosci. Res. 2003; 71: 407-416.

36. Miller D. H., Khan O. A., Sheremata W. A., Blumhardt L. D., Rice G. P., Libonati M. A., Willmer-Hulme A. J., Dalton C. M., Miszkiel K. A., O'Connor P. W.: International

Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N. Engl. J. Med. 2003; 348: 15-23.

37. Hayes C. E.: Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. Proc. Nutr. Soc. 2000; 59: 531-535.

38. Meehan T. F., Deluca H. F.: $CD8^+$ T cells are not necessary for 1α, 25-dihydroxy-vitamin D_3 to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99: 5557-5560.

39. Chen Y., Inobe J., Kuchroo V. K., Baron J. L., Janeway C. A. Jr, Weiner H. L.: Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 388-391.

40. Xiao B., Link H.: Tolerance: A two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. Clin. Immunol. Immunopathol. 1997; 85: 119-128.

41. Weiner H. L.: Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. J. Clin. Invest. 2000; 106: 935-937.

42. Szczepanik M.: Regulation of the contact sensitivity reaction by suppression of T gamma delta lymphocytes. Folia Med. Cracov. 1998; 39: 5-33.

43. Szczepanik M., Anderson L. R., Ushio H., Ptak W., Owen M. J., Hayday A. C., Askenase P. W.: Gamma delta T cells from tolerized alpha beta T cell receptor (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells in vivo, and their interferon-gamma production in vitro. J. Exp. Med. 1996; 184: 2129-2139.

44. Bluestone J. A., Abbas A. K.: Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3: 253-257.

45. Brandtzaeg P.: History of oral tolerance and mucosal immunity. Ann. NY Acad. Sci. USA. 1996; 778: 1-27.

46. Krause I., Blank M., Shoenfeld Y.: Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. Crit. Rev. Immunol. 2000; 20: 1-16.

47. Khoury S. J., Hancock W. W., Weiner H. L.: Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. J. Exp. Med. 1992; 176: 1355-1364.

48. Weiner H. L.: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. Microbes Infect. 2001; 3: 947-954.

49. Thorstenson K. M., Khoruts A.: Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. J. Immunol. 2001; 167: 188-195.

50. Zhang X., Izikson L., Liu L., Weiner H. L.: Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. J. Immunol. 2001; 167: 4245-4253.

51. Watanabe T., Yoshida M., Shirai Y., Yamori M., Yagita H., Itoh T., Chiba T., Kita T., Wakatsuki Y.: Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4+ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. J. Immunol. 2002; 168: 2188-2199.

52. Spellberg B.: The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. Life Sci. 2000; 67: 477-502.

53. Askenase P. W., Szczepanik M., Itakura A., Kiener C., Campos R. A.: Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by Valpha14+ NKT cells and B-1 B cells. Trends Immunol. 2004; 25: 441-449.

54. Little J. R., Eisen H. N.: Preparation and characterization of antibodies specific for the 2, 4, 6-trinitro group. Biochemistry 1966; 5: 3385-3395.

55. Weiner H. L., Friedman A., Miller A., Khoury S. J., al-Sabbagh A., Santos I., Sayegh M., Nussenblatt R. B., Trentham D. E., Hafler D. A.: Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Annu. Rev. Immunol. 1994; 12: 809-837.

56. Fukaura H., Kent S. C., Pietrusewicz M. J., Khoury S. J., Weiner H. L., Hafler D. A.: Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. J. Clin. Invest. 1996; 98: 70-77.

57. Wiendl H., Hohlfeld R.: Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. BioDrugs 2002; 16: 183-200.

58. Wang L. F., Lin J. Y., Hsieh K. L., Lin R. H.: Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like responses with high IgE production in mice. J. Immunol. 1996; 156: 4079-4082.

59. Herrick C. A., MacLeod H., Glusac E., Tigelaar R. E., Bottomly K.: Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. J. Clin. Invest. 2000; 105: 765-775.

60. Ptak W., Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M.: Epicutaneous application of protein antigens incorporated into cosmetic cream induces antigennonspecific unresponsiveness in mice and affects the cell-mediated immune response. Int. Arch. Allergy Immunol. 2002; 128: 8-14.

61. Szczepanik M.: Skin induced tolerance and its clinical implications. Modern Asp. Immunobiol. 2002; 2: 265-268.

62. Szczepanik M.: Regulation of contact hypersensitivity responses by different populations of T suppressor cells. Skin induced tolerance and its clinical implication. Recent Res. Devel. Immunol. 2002; 4: 641-668.

63. Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M., Skrzeczyńska J., Askenase P. W., Ptak W.: Epicutaneous immunization with protein antigen induces αβ-TCR CD4 CD8 double positive non-specific suppressor T cells that inhibit contact sensitivity and the *in vitro* cell mediated immune response via TGF-β production. Immunology (przyjęte do druku w 2005).

64. Bonomo A., Kehn P. J., Shevach E. M.: Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. J. Immunol. 1994; 152: 1509-1514.

65. Fujihashi K., Yamamoto M., McGhee J. R., Kiyono H.: αβ T cell receptor positive intraepithelial lymphocytes with $CD4^+$, $CD8^+$ phenotypes from orally immunized mice provide Th2-like function for B cell responses. J. Immunol. 1993; 151: 6681-6691.

66. Das G., Janeway C. A. Jr.: MHC specificity of iIELs. Trends Immunol. 2003; 24: 88-93.

67. Jimenez E., Sacedon R., Vicente A., Hernandez-Lopez C., Zapata A. G., Varas A.: Rat peripheral $CD4^+$ $CD8^+$ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature $CD4^+$ T lymphocytes. J. Immunol. 2002; 168: 5005-5013.

68. Lee W. W., Nam K. H., Terao K., Akari H., Yoshikawa Y.: Age-related increase of peripheral $CD4^+$ $CD8^+$ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys: longitudinal study in relation to thymic involution. Immunology 2003; 109: 217-225.

69. Zuckermann F. A.: Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999; 72: 55-66.

70. Blue M. L., Daley J. F., Levine H., Schlossman S. F.: Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. J. Immunol. 1985; 134: 2281-2286.

71. Patel S. S., Wacholtz M. C., Duby A. D., Thiele D. L., Lipsky P. E.: Analysis of the functional capabilities of CD3+CD4-CD8- and CD3+CD4+CD8+ human T cell clones. J. Immunol. 1989; 143: 1108-1117.

72. Pette M., Fujita K., Kitze B., Whitaker J. N., Albert E., Kappos L., Wekerle H.: Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. Neurology 1990; 40: 1770-1776.

73. Szczepanik M., Anderson L. R., Ushio H., Ptak W., Owen M. J., Hayday A. C., Askenase P. W.: γδ T cells from tolerized γδ T cell receptor (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells in vivo, and their interferon-γ production in vitro. J. Exp. Med. 1996; 184: 2129-2139.

74. Chen W., Jin W., Wahl S. M.: Engagement of cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 (CTLA 4) induces transforming growth factor β (TGF-β) production by murine CD4+ T cells. J. Exp. Med. 1998; 188: 1849-1857.

75. Hoyne G. F., Lamb J. R.: Regulation of T cell function in mucosal tolerance. Immunol. Cell Biol. 1997; 75: 197-201.

76. Stingl G., Konig F., Yamada H.: Thy1+ dendritic epidermal cells express T3 antigen and the T cell receptor γ chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987; 84: 4586-4590.

77. Bynoe M. S., Evans J. T., Viret C., Janeway C. A. Jr.: Epicutaneous immunization with autoantigenic peptides induces T suppressor cells that prevent experimental allergic encephalomyelitis. Immunity 2003; 19: 317-328.

8. Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (SM) jest przewlekłym schorzeniem zapalnym ośrodkowego układu nerwowego (OUN) prowadzącym do infiltracji limfocytów i makrofagów oraz lokalnej demielinizacji. U podłoża zmian chorobowych obserwowanych w przebiegu SM leży reakcja zapalna mediowana przez autoreaktywne klony limfocytów T pomocniczych TH1. Powszechnie stosowanym modelem eksperymentalnym imitującym SM jest alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE), które można wywołać u genetycznie predysponowanych szczepów myszy poprzez immunizację białkiem zasadowym mieliny (MBP). Proces autoimmunizacji w przebiegu EAE jest indukowany przez aktywowane autoreaktywne limfocyty T $CD4^+$ swoiste względem składników mieliny.

Dotychczas brakuje w pełni skutecznych oraz pozbawionych efektów ubocznych metod leczenia SM. Szereg obecnie stosowanych leków np. kortykosteroidy działa niespecyficznie na układ immunologiczny i powoduje ogólną immunosupresję oraz liczne efekty uboczne. W związku z tym istnieje ogromna potrzeba opracowania terapii SM, która pozwoliłyby w sposób swoisty i pozbawiony efektów ubocznych kontrolować przebieg choroby.

Zarówno skóra jak i błony śluzowe podlegają ciągłej ekspozycji na liczne antygeny środowiska zewnętrznego, toteż pełnią one istotną rolę ochronną przed patogenami. Uznanym faktem jest, że ekspozycja błon śluzowych na antygeny drogą pokarmową lub inhalacyjną prowadzi do stanu głębokiej immunosupresji obwodowej. Tolerancja pokarmowa była badana w wielu modelach eksperymentalnych, również w EAE, gdzie wykazano, że zwierzęta karmione MBP były chronione przed rozwojem choroby. Stwierdzono, że za obserwowany stan tolerancji były odpowiedzialne limfocyty T supresyjne produkujące cytokiny przeciwzapalne takie jak IL-4, IL-10 oraz TGF-β. Wysokie dawki Ag podawane *per os* przechodziły do krążenia w postaci niezmienionej lub w postaci protein prowadząc do areaktywności limfocytów T na drodze anergii lub delecji klonalnej.

Obiecujące wyniki w modelu zwierzęcym zachęciły klinicystów do podawania chorym na SM bydlęcego MBP *per os* w celu zahamowania rozwoju choroby, jednak próby te zakończyły się niepowodzeniem, nie wykazano żadnych efektów korzystnych w stosunku do grupy placebo. Warto zaznaczyć, że w innych badaniach obserwowano, że podawanie MBP na błony śluzowe zwierząt po wystąpieniu objawów EAE prowadziło do cięższego przebiegu choroby. Ponadto obserwowano znaczne zaostrzenie przebiegu choroby oraz dodatkowe komplikacje u myszy i małp po zastosowaniu terapii indukującej odpowiedź TH2-zależną.

Skóra przez wiele lat była uważana i wykorzystywana w badaniach jako organ, przez który można łatwo indukować odpowiedź immunologiczną np. reakcję CS, jednak niewiele uwagi poświęcono możliwości wywołania stanu tolerancji z wykorzystaniem tego narządu. Wang i wsp. wykazali, że podanie na skórę Ag białkowego, jakim jest owalbumina (OVA) prowadzi do alergicznego zapalenia skóry i indukowania limfocytów TH2 uwalniających IL-4. Kilka lat później Herrick i wsp. wykazali, że aplikacja Ag białkowego na skórę pozwala na indukcję TH2-zależnego modelu astmy u myszy. Przytoczone wyniki badań pozwoliły na przypuszczenie, że przy zastosowaniu odpowiednich warunków immunizacji, zamiast odpowiedzi komórkowej możliwe będzie indukowanie stanu tolerancji, tak jak ma to miejsce w przypadku śluzówek.

W prezentowanej pracy została opisana nowa metoda indukowania tolerancji przez skórę w celu zahamowania rozwoju EAE i złagodzenia ciężkości przebiegu choroby. Badania przeprowadzono na myszach szczepu B10.PL (rozwijających postać chroniczną EAE), w których wykazano, że naskórna aplikacja białka MBP przed indukcją EAE prowadzi do opóźnienia wystąpienia choroby u zwierząt, jak również znamiennego obniżenia objawów klinicznych przeciętnie o 50% w odniesieniu do kontroli pozytywnej. Ustalono, że optymalna dawka MBP, która podana na skórę maksymalnie hamuje rozwój oraz przebieg EAE mieści się w zakresie 100 μg – 1mg białka/mysz. Wyniki doświadczeń jednoznacznie wskazują na możliwość przeniesienia stanu tolerancji na naiwnych syngenicznych biorców przy pomocy komórek regulacyjnych izolowanych z tkanki limfatycznej toleryzowanych dawców (węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych oraz śledziony).

W badaniach z wykorzystaniem defektywnych szczepów myszy stwierdzono, że w tolerancji indukowanej przez skórę nie biorą udziału komórki NKT oraz limfocyty TCR$\gamma\delta$, podczas gdy brak supresji obserwowany u myszy szczepu β_2m -/- wskazuje na zaangażowanie limfocytów T $CD8^+$ w opisanej tolerancji. W celu zbadania fenotypu komórek regulacyjnych dokonano transferu na naiwnych syngenicznych biorców B10.PL LNC (zwierząt toleryzowanych MBP), pozbawionych w selekcji negatywnej komórek CD4 lub CD8. Zwierzęta obu grup nie wykazały opóźnienia choroby, wręcz przeciwnie, objawy początkowe EAE wystąpiły wcześniej niż w kontroli pozytywnej. Uzyskane wyniki sugerowały, że w supresji indukowanej przez skórę były zaangażowane limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$. Z kolei badania cytometryczne wykazały pojawienie się około 2-3% komórek T $CD4^+$ $CD8^+$ w węzłach chłonnych i śledzionie myszy toleryzowanych. Obserwacje te mogły sugerować, iż komórką supresyjną indukowaną przez skórę może być limfocyt T $CD4^+$ $CD8^+$. W kolejnych badaniach naiwnym biorcom podano wysortowane z użyciem cytofluorymetru przepływowego komórki $CD4^+$ $CD8^+$ w ilości $2x10^3$/mysz. W kontroli supresji podano niesortowane komórki regulacyjne (pełną pulę LNC) w ilości $2x10^7$/mysz. Komórki T $CD4^+$

$CD8^+$ hamowały rozwój EAE podobnie jak komórki pełnej puli LNC. Wobec powyższego stwierdzono, że za zjawisko zahamowania EAE są odpowiedzialne limfocyty TCR$\alpha\beta$ należące do populacji komórek $CD4^+$ $CD8^+$.

W celu sprawdzenia swoistości antygenowej obserwowanego stanu tolerancji zwierzętom aplikowano na skórę antygeny niehomologiczne z MBP (np. OVA, TNP-Ig oraz KLH), a efekt działania badano testem proliferacji *in vitro*. Jednocześnie zostały przeprowadzone eksperymenty w układzie *in vivo*, gdzie zwierzęta toleryzowano antygenami niehomologicznymi z MBP tj. OVA i TNP-Ig przed indukowaniem EAE. Wyniki powyższych badań wykazały, że toleryzacja zarówno antygenem homologicznym (MBP) z antygenem użytym do wywołania EAE (MBP), jak również toleryzacja antygenem niereagującym krzyżowo (np. OVA, TNP-Ig, KLH) prowadzi do zahamowania proliferacji komórek efektorowych odpowiedzialnych za patomechanizm EAE.

Jednoczesna hodowla komórek regulacyjnych niezdolnych do proliferacji (traktowanych uprzednio mitomycyną C) z komórkami efektorowymi EAE w obecności odpowiednich mAb neutralizujących poszczególne cytokiny: IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β wykazała, że efekt supresji jest mediowany za pośrednictwem TGF-β. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że przebieg choroby u zwierząt, którym podano *i.v*. mAb anty-TGF-β nie różnił się od przebiegu EAE w kontroli pozytywnej, nie zaobserwowano opóźnienia początku choroby ani redukcji objawów EAE. Rezultaty badań prowadzonych *in vivo,* w pełni potwierdziły wyniki uzyskane metodą *in vitro*, że podanie MBP na skórę zwierząt indukuje populację komórek regulatorowych, które hamują rozwój procesu zapalnego w EAE poprzez uwalnianie TGF-β.

W końcowym etapie badań podjęto próbę hamowania rozwoju EAE u myszy, z użyciem metody naskórnej aplikacji MBP przez okres 14 dni od momentu wystąpieniu pierwszych objawów choroby. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że aplikacja MBP na skórę chorych zwierząt może prowadzić do zahamowania dalszego rozwoju choroby, a co więcej obserwowano cofanie się objawów i polepszenie ogólnej kondycji zwierząt.

Prezentowana w niniejszej pracy nowa metoda wywołania tolerancji przez podanie białkowego antygenu na skórę dzięki skuteczności i prostocie użycia oraz braku inwazyjności stwarza nowe możliwości terapii schorzeń autoimmunizacyjnych, u podstaw których leży przewlekły proces zapalny.

Summary

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by the presence of cellular infiltrates comprised primarily of lymphocytes and macrophages and localized areas of demyelination in the CNS. MS is thought to be initiated by self-reactive CD4 Th1 T cells with specificity for a variety of antigens present within the myelin sheath. EAE is a well-characterized animal model that mimics many disease symptoms of MS, including the presence of cellular infiltrates and demyelination in the CNS. EAE can be actively induced in genetically susceptible strains of mice by the immunization with myelin basic protein (MBP) and is mediated by activated CD4 T cells that are specific for the encephalitogenic portion of MBP.

Until now there is no fully effective treatment for MS that would not cause severe side-effects. Currently used drugs e.g. steroids cause strong immunosuppression and many side-effects. So, there is a strong need to find a new therapeutic approach that could specifically treat MS patients without any side-effects.

Both skin and mucosa are continuously exposed to many environmental antigens and play a crucial role in protection from pathogens. It is well known that immunization with an antigen via the digestive tract or nasal mucosa leads to a state of profound immunosuppression in the periphery. Oral tolerance has been studied in many experimental models, including EAE where it was shown that animals fed with MBP were protected from disease. Other studies showed that orally induced T suppressor cells secreted inhibitory cytokines, such as TGF-β, IL-4 and IL-10. High doses of orally administered antigen appear to pass through the gut and enter the systemic circulation, either as intact or as processed protein inducing unresponsiveness of T cell function through clonal anergy or deletion.

The promising achievements in the field of mucosal tolerance in EAE encouraged clinicians to treat MS patients by feeding them with bovine MBP daily to suppress disease. However, the clinical trial failed to show any clinical benefit of MBP oral tolerance. In contrast to a protective effect, mucosal administration of MBP has also been shown to enhance the clinical signs of ongoing disease induced in laboratory animals. Additionally it was shown in mice and marmosets that Th2-inducing therapies have led to additional complications or a significant exacerbation of disease.

Although skin is considered as an organ where immune responses are easily induced, little attention has been given to skin induced tolerance. Wang, et al. showed that *e.c.* application of the protein antigen OVA resulted in allergic dermatitis accompanied with the appearance of IL-4 secreting T cells. In addition, Herrick, et al. showed that *e.c.* immunization with protein antigen induced Th2 mediated animal model of asthma. These

data may suggest that *e.c.* immunization similarly to mucosal compartment could induce peripheral tolerance when special conditions are fulfilled.

In the present study a new technique of epicutaneous (*e.c.*) immunization was described as a method to induce tolerance. It has been shown that B10.PL mice that develop chronic form of EAE when *e.c*. tolerized with MBP prior to the induction of EAE developed disease later and disease severity was reduced by 50% when compared to positive control. The optimal dose of MBP that induced suppression ranged between 100 μg – 1mg/animal. The suppression induced by *e.c*. immunization was transferable to naive recipients by the adoptive transfer of either LN or spleen cells isolated from mice *e.c.* tolerized with MBP.

Employing knock out mice it was shown that TCRγδ and NKT cells are not involved in skin induced suppression. However, lack of suppression in β_2m -/- mice after *e.c.* immunization suggests that CD8 T cells play a role in characterized phenomenon.

To phenotype *e.c.* induced regulatory cells more precisely total lymph node cells from mice *e.c.* tolerized with MBP were depleted of either CD4 or CD8 T cells by treatment with mAbs and complement and the remaining cells were transferred into syngeneic B10.PL recipients. The protection was abrogated when either CD4 or CD8 T cells were depleted, as compared to mice receiving total LNC from MBP *e.c.* tolerized mice. These data suggest that both CD4 and CD8 T cells are required for skin induced tolerance. However, flow cytometry experiments showed appearance of 2-3% of $CD4^+$ $CD8^+$ double positive T cells in spleens and lymph nodes isolated from *e.c.* tolerized mice. In further studies recipient mice were *i.v.* transferred with $2x10^3$ of sorted $CD4^+$ $CD8^+$ cells or $2x10^7$ unsorted LNC isolated from *e.c.* immunized mice. As it was shown the double positive $CD4^+$ $CD8^+$ cells could inhibit development of EAE similarly to the whole population of LNC. These data confirmed that *e.c.* induced Ts cells belong to the population of TCRαβ $CD4^+$ $CD8^+$ double positive cells.

Further experiments showed that *e.c*. immunization with any tested protein antigen: MBP, OVA, or TNP-Ig prior to induction of EAE resulted in reduced disease severity and delayed disease onset. All data of *in vivo* study were fully confirmed by *in vitro* experiments with four non-cross-reacting antigens MBP, OVA, TNP-Ig and KLH and showed inhibition of proliferation of MBP-specific immune cells. These data suggest lack of antigen specificity of skin induced Ts cells.

To find the mechanism of skin induced tolerance Mitomycin C treated LNC were co-cultured with MBP immune cells with following anti-cytokine mAbs: anti-IL-4, anti-IL-10, anti-TGF-β or IL-13Rα-Fc. This experiment with neutralizing antibodies demonstrated that skin induced Ts cells suppressed proliferation of MBP specific T cells *in vitro* via TGF-β, while lack of effect of anti-IL-4 and anti-IL-10 neutralizing antibodies or IL-13Rα-Fc suggests that these three cytokines do not play a crucial role in the observed suppression, at least at its

effector stage. *In vitro* data were confirmed by *in vivo* studies with neutralizing antibodies. It was shown that MBP tolerized mice intravenously treated with anti-TGF-β mAb prior to EAE induction developed disease with severity similar to that observed in positive control. Summing up, this *in vivo* study fully confirmed previously presented *in vitro* data showing that *e.c.* immunization with MBP induces T regulatory cells that inhibit inflammatory response in EAE via released TGF-β.

In the final part of the study it was shown that *e.c.* treatment of mice with MBP after first signs of EAE appeared, caused partial recovery from disease suggesting that this method might be useful to treat ongoing disease.

The ease of epicutaneous generation of non-Ag specific T suppressor cells producing TGF-β may have important implications for designing therapeutic schemes aimed at modulating immune responses to self antigens involved in autoimmune diseases.