

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Rafał Biedroń

**„Udział eikozanoidów w regulacji funkcji komórek
dendrytycznych pochodzenia szpikowego”**

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Janusz Marcinkiewicz

Pracę wykonano w Katedrze Immunologii CMUJ

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Janusz Marcinkiewicz

Kraków 2005

*Składam serdeczne podziękowania Mojemu Promotorowi,
Panu Profesorowi Januszowi Marcinkiewiczowi
za cenne uwagi i nieocenioną pomoc przy pisaniu tej pracy oraz
Doktorowi Szczepanowi Józefowskiemu za ścisłą współpracę i wsparcie.*

Mojej kochanej żonie Monice, aby przyszły rok był szczególnie szczęśliwy!

Spis treści

Słowniczek skrótów	5
I. Wprowadzenie	7
1.1 Pochodne kwasu arachidonowego – eikozanoidy	7
1.1.1 <i>Biosynteza prostanoidów</i>	8
1.1.2 <i>Receptory prostanoidów</i>	9
1.1.3 <i>Biosynteza leukotrienów</i>	11
1.1.4 <i>Receptory leukotrienów</i>	12
1.2 Wybrane zagadnienia z biologicznej funkcji eikozanoidów	13
1.3 Eikozanoidy a komórki układu immunologicznego	15
1.4 Farmakologia eikozanoidów	20
II. Cele pracy	
.....	22
III. Materiały i metody	23
3.1 Odczynniki	23
3.2 Przygotowanie komórek dendrytycznych (DC)	24
3.3 Czystość populacji DC mierzona metodą cytofluorymetrii przepływowej	25
3.4 Żywotność komórek	26
3.5 Oznaczanie prostaglandyny E₂ (PGE₂) i leukotrienów (LTB₄ i cysLTs) w nadsączach z hodowli DC	27
3.6 Pomiar mRNA COX-2 oraz ekspresji białka COX-2 i 5-LO	27
3.7 Oznaczenie cytokin metodą ELISA	29

3.8	Analiza statystyczna wyników	30
IV.	Wyniki	32
4.1	Synteza eikozanoidów przez komórki dendrytyczne (DC)	32
4.1.1	<i>Indukcja ekspresji COX-2 i syntezy PGE₂</i> <i>w DC stymulowanych LPS</i>	32
4.1.2	<i>Indukcja syntezy leukotrienów w DC</i>	34
4.2	Profil cytokin uwalnianych przez DC aktywowane LPS i opsonizowanym zymosanem (OZ)	35
4.3	Wpływ endogennej vs egzogennej PGE₂ na syntezę cytokin przez aktywowane DC	36
4.4	Wpływ specyficznych agonistów dla receptorów prostanoidów na poziom uwalniania cytokin przez stymulowane DC	39
4.5	Wpływ endo- vs egzogennych LTs na syntezę cytokin przez stymulowane DC	42
V.	Dyskusja	46
VI.	Wnioski	57
VII.	Streszczenie (<i>Summary</i>)	60
VIII.	Literatura	66
IX.	Podziękowania	72

Słowniczek skrótów:

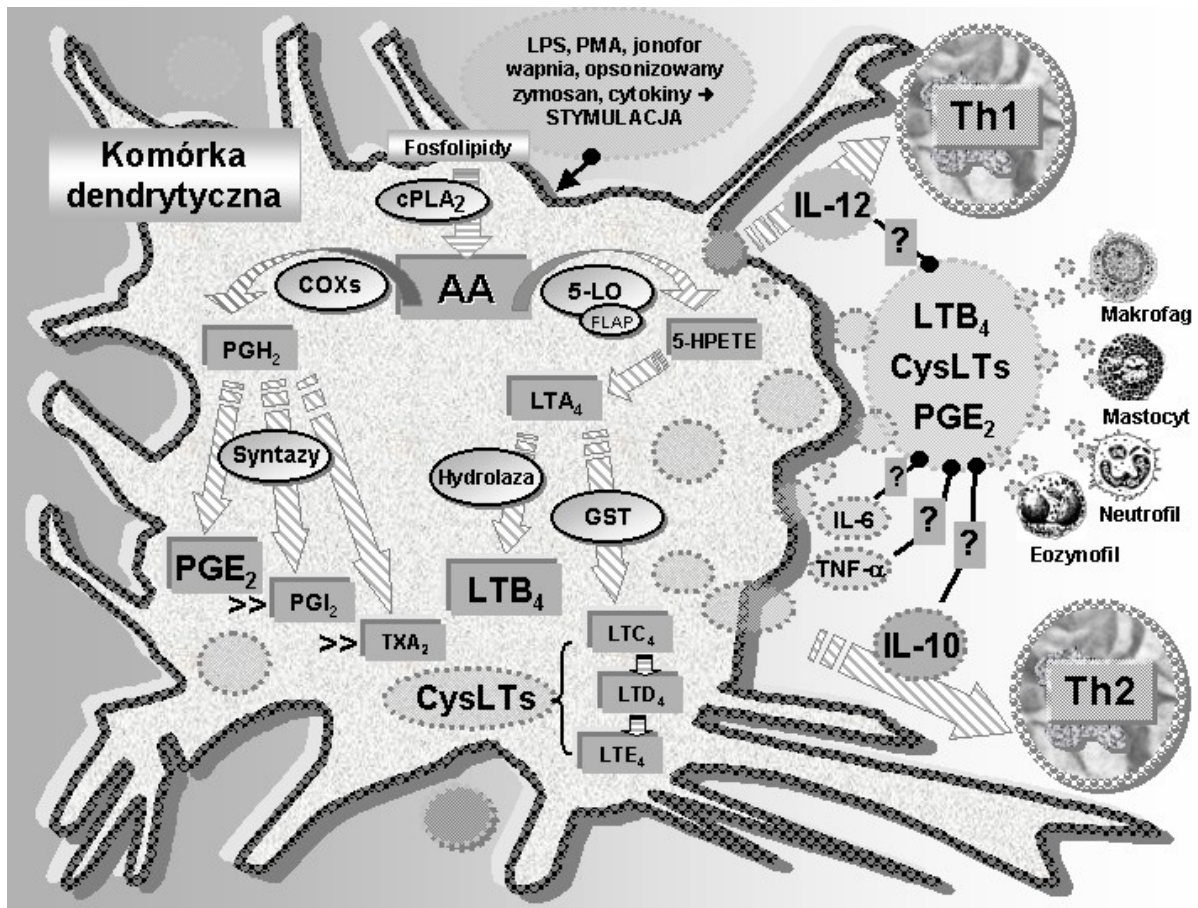
AA	kwasy arachidonowy, kwas eikoz-5,8,11,14-tetraenowy
BLT ₁	receptor LTB ₄
cAMP	cykliczny monofosforan adenozy
CD	antygeny różnicowania komórkowego (<i>cluster of differentiation</i>)
COXs	cyklooksygenazy
COX-1	cyklooksygenaza-1
COX-2	cyklooksygenaza-2
cPLA ₂	cytozolowa fosfolipaza A ₂
CysLT ₁	receptor LTD ₄
CysLTs	leukotrieny cysteinylowe (LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄)
DC	komórki dendrytyczne (<i>dendritic cells</i>)
DMSO	dwumetylosulfotlenek
DP	receptor dla PGD ₂
ELISA	test immunoenzymatyczny (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EP	receptory dla PGE ₂
ETYA	kwasy eikoz-5,8,11,14-tetraenowy
FCS	plodowa surowica cielęca (<i>foetal calf serum</i>)
FITC	izotiocyjanian fluoresceiny
FLAP	białko aktywujące 5-lipoksygenazę (<i>five-lipoxygenase activating protein</i>)
FP	receptor dla PGF _{2α}
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie się kolonii granulocytów i makrofagów (<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>)
GST	S-transferaza glutationu (<i>Glutathione S-transferase</i>)
HETE	kwasy hydroksyeikozatetraenowy
HPETE	kwasy hydroperoksyekozatetraenowy
IFN	interferon
IL	interleukina
INDO	indometacyna
IP	receptor dla prostacykliny
LOs	lipoksygenazy

LPS	lipopolisacharyd
LTB ₄	leukotrien B ₄
LTs	leukotrieny
LXs	lipoksyiny
MHC	główny układ zgodności tkankowej (<i>major histocompatibility complex</i>)
OZ	opsonizowany zymosan
p	współczynnik prawdopodobieństwa
PBS	zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna
PE	fikoerytryna
PGE ₂	prostaglandyna E ₂
PGHS	syntaza prostaglandyny H
PGI ₂	prostacyklina
PGs	prostaglandyny
PMA	ester forbolu (<i>phorbol myristate acetate</i>)
PPAR- α	jądrowy receptor peroksysomalnego czynnika proliferacyjnego- α (<i>peroxisome proliferators-activated receptor-α</i>)
SRS-A	wolno działające substancje odpowiedzialne za reakcję anafilaktyczną (<i>slow-reacting substance of anaphylaxis</i>)
TGF	transformujący czynnik wzrostu (<i>transforming growth factor</i>)
Th	limfocyty T pomocnicze
TNF	czynnik martwicy nowotworu (<i>tumor necrosis factor</i>)
TXs	tromboksany

I. Wprowadzenie

1.1 Pochodne kwasu arachidonowego – eikozanoidy

Metabolity kwasu arachidonowego (AA) to ważne mediatory biorące udział w szeregu reakcji biologicznych. Odpowiadają one przede wszystkim za utrzymanie homeostazy wielu organów, jak również są zaangażowane w procesy powstawania odczynu zapalnego [1, 2]. Prekursorem dla tych związków jest uwalniany przez fosfolipazę A₂ (PLA₂) kwas arachidonowy, kwas eikosa-5,8,11,14-tetraenowy, stąd wspólna nazwa eikozanoidy.



Ryc. 1.1 Schematyczne ujęcie podstawowych szlaków syntezy wybranych eikozanoidów w komórce dendrytycznej z uwzględnieniem ich wpływu w para- i autokrynnego

AA – kwas arachidonowy, PGs – prostaglandyny, LTs – leukotrieny, COXs – cyklooksygenazy, 5-LO – 5-lipoksygenaza, FLAP – białko aktywujące 5-lipoksygenazę (*five-lipoxygenase activating protein*), cPLA₂ – cytozolowa fosfolipaza A₂, HPETE – kwas hydroperoksyekozatetraenowy, GST – S-transferaza glutationu (*Glutathione S-transferase*), CysLTs – leukotrieny cysteinylowe.

Powstający AA jest natychmiast przekształcany do prostaglandyny H₂ (PGH₂) przez syntazę-1 i/lub syntazę-2 prostaglandyny H (PGHS-1 i 2), częściej znanych pod nazwą cyklooksygenaz (COXs), które to uczestniczą w produkcji prostanoidów a zatem prostaglandyn (PGs) i tromboksanów (TXs). Natomiast leukotrieny (LTs) i lipoksyny (LXs) powstają przy udziale enzymów z grupy lipoksygenaz (LOs: 5-, 12- i 15-LO) (**Ryc. 1**) [3]. Za główne miejsce syntezy eikozanoidów w odczynie zapalnym uważa się makrofagi, komórki tuczne, neutrofile, bazofile, eozynofile [4] oraz od niedawna, także komórki dendrytyczne (DC – *dendritic cells*) [3].

1.1.1 Biosynteza prostanoidów

Prostanoidy, prostaglandyny (PGE₂, PGI₂ (prostacyklina), PGD₂, PGF₂) oraz tromboksany (TXA₂) produkowane są *de novo* przez szereg komórek naszego organizmu. Działają lokalnie, zarówno na drodze autokrynej, jak i parakrynej. Centralną rolę w ich syntezie pełnią cyklooksygenazy-1 i 2 (COX-1 i COX-2). COX-2 jest indukowalną izoformą enzymu, tzn. pojawiającą się w komórce w ciągu około 1-4 godzin po zadziałaniu czynnika stymulującego (np. cytokin, czynników wzrostu, endotoksyn), biorącą udział w późniejszej modulacji procesu zapalnego. Gen dla COX-2 pozostaje pod kontrolą czynników transkrypcyjnych należących do rodziny NF-kappaB/Rel i ulegających aktywacji pod wpływem np. lipopolisacharydu (LPS), interleukiny 1, czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF-α). Natomiast COX-1 jest izoformą konstytutywną, która odpowiada za utrzymanie homeostazy organizmu. Na przykład COX-1 bierze udział m. in. w zapewnianiu odpowiedniego poziomu PGE₂ w układzie pokarmowym (funkcja cytoprotekcyjna), odpowiada za prawidłowy poziom TXA₂ w układzie krwionośnym (niezbędny w procesach krzepnięcia), jest również zaangażowana w kontrolę funkcjonowania nerek (transport jonów i wody), a także układu endokrynnego, nerwowego i rozrodczego. Pomimo 60% homologii i katalizowania identycznych związków, COX-1 i COX-2 kodowane

są przez różne geny zlokalizowane na odmiennych chromosomach [5, 6].

Główną rolę w uwalnianiu AA z fosfolipidów budujących błony komórki pełni tutaj cytozolowa fosfolipaza A₂ (cPLA₂) typu IV. Zablokowanie tego enzymu np. przez glukokortykosteroidy prowadzi do zmniejszenia produkcji eikozanoidów w komórce. PLA₂ w wyniku aktywacji przemieszcza się w komórce do jądra komórkowego i do siateczki śródplazmatycznej, gdzie znajdują się sprzężone z błoną COXs, zorientowane swą domeną wiążącą substrat w kierunku uwalnianego AA. Powstające w wyniku działania COX prostaglandyny H₂ (PGH₂) są substratem dla syntaz prostaglandyn i tromboksanu. Lokalizacje tych syntaz są zróżnicowane. Na przykład syntaza tromboksanu (Tx) występuje przede wszystkim w płytkach krwi i makrofagach, syntaza PGF_{2α} w macicy, syntaza prostacykliny w śródbłonku, a syntazy PGD₂ w komórkach tłuszczowych i mózgu. Z kolei syntazy PGE₂ występują, podobnie jak COXs, w dwóch izoformach (konstrytywnej i indukowalnej) i obecne są w większości tkanek i komórek [7, 8].

1.1.2 Receptory prostanoidów

O tym, czy produkowane lokalnie prostanoidy spełnią swoją funkcję, decyduje obecność właściwych receptorów na powierzchni komórek docelowych. Syntezowane *de novo* prostanoidy są aktywnie transportowane na zewnątrz komórki przez dobrze scharakteryzowane błonowe transportery dla prostaglandyn PGT (*prostaglandin transporters*) lub inne do tej pory nie scharakteryzowane białka transportujące [9]. Obecnie poznano 9, a sklonowano 8 różnych receptorów prostanoidowych współdziałających z białkami G i w większości należących do nadrodziny receptorów rodopsynowych, posiadających transmembranową domenę siedmiokrotnie przeplecioną przez błonę komórki (wyjątkiem jest DP₂ homologicznie związany z nadrodziną receptorów N-formylowych). W zależności od wiązanego ligandu wyróżniamy

cztery receptory dla PGE₂ (receptor EP₁, EP₂, EP₃, EP₄), dwa dla PGD₂ (receptor DP₁, DP₂) oraz po jednym receptorze dla PGI₂, PGF_{2α} i TXA₂ (odpowiednio receptor IP, FP i TP). Ponadto arbitralnie podzielono je na 3 klasy w zależności od efektu końcowego ich działania w docelowej komórce. I tak receptory „relaksacyjne”: EP₂, EP₄, IP i DP₁ kooperują z białkami G_s, co powoduje wzrost cyklicznego monofosforanu adenozy (cAMP) w komórce. Receptory „skurczu” EP₁, FP i TP aktywują białka G_q, co prowadzi do wzrostu jonów wapnia w komórce (Ca²⁺). Natomiast receptor EP₃ został pierwotnie zaliczony do grupy receptorów „hamujących”, wiążących się z białkami G_i obniżającymi cAMP w komórce, jednak obecnie odkryto u zwierząt szereg izoform tego receptora wiążących się z różnymi białkami G (**Tab. 1.1**).

Tabela 1.1 Receptory prostanoidów, czynniki zaangażowane w transdukcję sygnału oraz ich obecność na DC

Typ	Podtyp	Izoforma	Białko G	Przebieżnik II rzędu	DC
DP		DP ₁	G _s	cAMP ↑	+
		DP ₂	G _q	Ca ²⁺ ↑	–
EP	EP ₁ EP ₂ EP ₄ EP ₃	(receptor dla czynników chemotaktycznych - CRTH2)	G _q	Ca ²⁺ ↑	+
			G _s	cAMP ↑	+
			G _s	cAMP ↑	+
			G _i	cAMP ↓	+
		EP _{3A}	G _s	cAMP ↑	
		EP _{3B}	G _s	cAMP ↑	
		EP _{3C}	G _s	cAMP ↑	
FP	TPα	EP _{3D}	G _i , G _s , G _q	cAMP ↓, cAMP ↑, Ca ²⁺ ↑	
			G _q	Ca ²⁺ ↑	–
IP			G _s , G _q	cAMP ↑, Ca ²⁺ ↑	+
TP	TPβ		G _q , G _i	Ca ²⁺ ↑, cAMP ↓	–
			G _q , G _s	Ca ²⁺ ↑, cAMP ↑	

Receptory dla prostanoidów rozpoznane u różnych organizmów oraz ich powiązanie z białkami G i wtórnymi przebieżnikami. Izoformy TP odkryto u ludzi, izoformy EP₃ u bydła, natomiast pozostałe u myszy [2, 10-13].

1.1.3 Biosynteza leukotrienów

Leukotrieny, w odróżnieniu od prostaglandyn, produkowane są w wyniku aktywacji przede wszystkim przez komórki odczynu zapalnego, takie jak neutrofile, makrofagi, komórki tuczne czy dendrytyczne. Kompleksy immunologiczne, bakterie i produkty ich rozpadu, jonofory wapnia oraz inne czynniki aktywujące uruchamiają kaskadę wydarzeń, gdzie w pierwszej kolejności aktywacji i przemieszczeniu w kierunku błony jądrowej ulega cPLA₂ oraz 5-LO, kluczowy enzym w syntezie LTs i LXs. 5-LO należy do niehemowych dioksygenaz, zawierających w centrum katalitycznym jon żelaza o lokalizacji jądrowej lub cytoplazmatycznej, w zależności od rodzaju komórek [14]. Ponadto do pełnej aktywności wymaga on udziału Ca²⁺, trifosforanu adenozy (ATP) oraz białka aktywującego 5-LO (FLAP) (*5-lipoxygenase-activating protein*). FLAP związany jest z błoną jądrową i wydaje się pełnić funkcję przyłączania uwolnionego AA w taki sposób, że możliwa jest jego konwersja przez 5-LO do kwasu 5-hydroperoksytetraenowego (5-HPETE), a ostatecznie do leukotrienu A₄ (LTA₄) [15]. Dalszy metabolizm prowadzi kolejno do powstania LTB₄ i jest katalizowany przez hydrolazę LTA₄, zawierającą cynk w centrum katalitycznym oraz do tworzenia LTC₄, katalizowanego przez przyłączenie glutationu przez syntazę LTC₄, związaną z błoną jądrową. LTC₄ jest stosunkowo nietrwałym produktem ulegającym na zewnątrz komórki degradacji do LTD₄ oraz LTE₄, które łącznie ze swym prekursorem zaliczane są do leukotrienów cysteinylowych (cysLTs). Okazało się, że to właśnie cysLTs są składnikami SRS-A (*slow-reacting substance of anaphylaxis*) wolno działającej substancji w reakcji anafilaksji [16]. Warto zauważyć, że ekspresja 5-LO i syntazy LTC₄, a w związku z tym i synteza LTs, są ograniczone do komórek pochodzenia mieloidalnego (monocyty/makrofagi, neutrofile, eozynofile, mastocyty i komórki dendrytyczne) natomiast hydrolaza LTA₄ obecna jest w wielu innych typach komórek [17, 18].

1.1.4 Receptory leukotrienów

Powstające LTs są transportowane na zewnątrz komórek docelowych przez transportery (na przykład LTC₄ przez białko MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*)), gdzie poprzez specyficzne receptory wpływają auto- lub parakrynnie na te komórki [19]. Obecnie poznano po dwa typy zewnątrz błonowych receptorów dla LTB₄ oraz cysLTs. Podobnie jak receptory prostanoidów, są one zaliczane do rodziny receptorów siedmiokrotnie przebijających błonę komórkową, kooperujących z białkami G. Dobrze poznany receptor BLT₁, występujący przede wszystkim na leukocytach, charakteryzuje się wysokim powinowactwem do LTB₄. Aktywacja BLT₁ i kooperującego białka G_i wywołuje chemotaksję neutrofilów i zachodzi już w nanomolarnych stężeniach. Natomiast w mikromolarnych stężeniach LTB₄ działający na receptor BLT₁ aktywuje białka G_q, co pobudza neutrofile do wydzielania kolejnych mediatorów prozapalnych. Niedawno scharakteryzowano kolejny receptor dla LTB₄ (BLT₂), o niskim powinowactwie, występujący na różnych komórkach, ale jego rola jest jeszcze słabo poznana [20]. Wydaje się jednak, że to BLT₁ odgrywa główną rolę w odczynie zapalnym, za czym przemawiają doświadczenia na myszach pozbawionych tego receptora [21, 22]. Ponadto odkryto jeszcze jeden, wewnątrzjądrowy receptor dla LTB₄, PPAR- α (*peroxisome proliferators-activated receptor- α*), który jest prawdopodobnie odpowiedzialny za negatywny sygnał zwrotny w kontroli syntezy LTB₄ [23].

Dla leukotrienów cysteinyłowych znaleziono receptor CysLT₁, zlokalizowany przede wszystkim na mięśniach gładkich oskrzelików oraz śródbłonku naczyń kapilarnych, który preferencyjnie wiąże LTD₄ i nieco słabiej LTC₄. Ponadto odkryto jeszcze jeden receptor dla cysLTs, CysLT₂, gdzie LTD₄ i LTC₄ łączą się z podobnym powinowactwem. Znaleziono go na przykład w sercu, mózgu czy korze nadnerczy, jednak jego rola regulacyjna ciągle pozostaje nieznana [24].

1.2 Wybrane zagadnienia z biologicznej funkcji eikozanoidów

Eikozanoidy stanowią bogatą grupę związków syntetyzowanych *de novo* z fosfolipidów w odpowiedzi na bodziec. Pełnią ważną funkcję kontrolną w wielu procesach fizjologicznych, jak również są zaangażowane w powstawanie odczynu zapalnego. Badania prowadzone od lat 30 ubiegłego stulecia nad tą grupą związków dowodzą, jak szerokie mają działanie, dodatkowo komplikowane przez różnorodność receptorów. PGE₂, na przykład, w zależności od receptora, poprzez który działa, może powodować skurcz oskrzelików i mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego, jeśli jest to receptor EP₁. Natomiast, jeśli działa na receptor EP₂, to powoduje rozszerzenie oskrzelików, zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych, zwiększone wydzielanie soków trawiennych oraz relaksację mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego. Zaś stymulacja poprzez receptor EP₃ prowadzi do skurczu mięśni gładkich przewodu pokarmowego, zmniejszonego wydzielania kwasu żołądkowego przy jednoczesnym zwiększeniu produkcji śluzu, czy wreszcie wywołuje skurcze porodowe. Uwalnianie TXA₂, innego związku z grupy eikozanoidów, wywołuje przede wszystkim skurcz i zmniejszenie przepuszczalności naczyń oraz powoduje agregację płytek krwi. Natomiast, PGI₂ oraz PGD₂ działają przeciwstawnie do TXA₂. Dodatkowo PGD₂, podobnie jak PGE₂ wywołuje skurcze podczas porodu oraz reguluje uwalnianie hormonów podwzgórzowo-przysadkowych. PGI₂ odgrywa również istotną rolę w regulacji resorpcji sodu w nerkach przez stymulację uwalniania reniny. Leukotrieny, podobnie jak prostaglandyny i tromboksany, biorą udział w regulacji wielu procesów, np. cysLTs (LTC₄, LTD₄, LTE₄), odgrywają istotną rolę w reakcjach alergicznych. W układzie oddechowym wywołują wzmożoną produkcję śluzu, skurcz mięśniówki gładkiej oskrzelików, a ponadto mogą aktywować mitogenezę miocytów powodując ich przerost. W układzie krwionośnym donacyniowe podanie niewielkiej dawki cysLTs powoduje chwilowy wzrost ciśnienia krwi, natomiast lokalnie podnosi przepuszczalność naczyń. Źródłem LTB₄ w

organizmie są przede wszystkim neutrofile, dla których jest on jednocześnie silnym czynnikiem chemotaktycznym i aktywującym. Jego nadprodukcja, łącznie z cysLTs, obserwowana jest w astmie, przewlekłym zapaleniu kłębuszków nerkowych, łuszczycy, przewlekłym zapaleniu kości, czy zapaleniu płuc. Toczącemu się procesowi zapalnemu nieodłącznie towarzyszy wysoka produkcja prostanoidów i leukotrienów, które pełnią ważną funkcję regulacyjną i kontrolną. Najczęściej uwalniane są lokalnie przez uszkodzone tkanki, naczynia krwionośne, komórki tuczne, w dalszym etapie przez naciekające komórki, takie jak neutrofile, eozynofile, monocyty/makrofagi. Głównym celem tego procesu jest jak najszybsze wyeliminowanie czynnika uszkadzającego tkanki, a następnie wygaszenie reakcji zapalnej. Możemy się więc spodziewać, że uwalniane eikozanoidy będą często działać przeciwstawnie. Na przykład wcześniej uwalniany LTB_4 jest silnym czynnikiem chemotaktycznym dla makrofagów i neutrofilów. Jest on również intensywnym aktywatorem neutrofilów, dodatkowo zwiększającym ich właściwości adhezyjne oraz bójcze. Ułatwiony napływ komórek bójczych zapewniają PGE_2 , PGI_2 , PGD_2 i cysLTs, które są silnymi czynnikami zwiększającymi przepuszczalność naczyń kapilarnych, działającymi synergistycznie z histaminą i bradykininą. Skutkiem ubocznym uwalnianych w dużej ilości mediatorów jest powstanie odczynu zapalnego, który objawia się bólem, zaczerwienieniem, obrzękiem, gorączką i w konsekwencji utratą funkcji danego narządu. Na przykład za powstawanie gorączki, odpowiedzialna jest głównie PGE_2 , za czym przemawia fakt, że niesteroidowe leki przeciwzapalne obniżają ją. W dalszym etapie PGE_2 może uczestniczyć w wygaszaniu procesu zapalnego, ponieważ znacznie obniża zdolności neutrofilów do produkcji toksycznych rodników tlenowych oraz enzymów lizosomalnych, a więc hamuje ich właściwości bójcze, a także hamuje uwalnianie histaminy z komórek tucznych [1, 3, 16, 18, 22, 25].

1.3 Eikozanoidy a komórki układu immunologicznego

O ile rola eikozanoidów jako mediatorów zapalenia jest dobrze scharakteryzowana, to ich immunomodulacyjny wpływ na naciekające i obecne w ognisku zapalnym komórki prezentujące wciąż wymaga wyjaśnienia.

Szczególnie interesujący wydaje się być wpływ eikozanoidów na komórki dendrytyczne (DC). Komórki te nie tylko same je produkują (efekt autokryny), podnosząc w ten sposób poziom eikozanoidów uwalnianych w miejscu zapalenia (efekt parakryny), ale dodatkowo, dzięki swoim niezwykłym zdolnościom do aktywacji antygenowo swoistych limfocytów, pełnią centralną rolę w indukcji i ukierunkowywaniu odpowiedzi immunologicznej.

DC są wyspecjalizowanymi komórkami prezentującymi antygeny naiwnym limfocytom T. Spotykamy je w większości tkanek w formie niedojrzałej (np. w skórze nazywane są komórkami Langerhansa), gdzie bardzo wydajnie fagocytują i przetwarzają antygeny (*antigen processing*). Upřednio uważano, że DC w zależności od pochodzenia określają polaryzację funkcjonalną naiwnych limfocytów. Na przykład DC wywodzące się z komórek szpiku, są już z góry zaprogramowane do aktywowania naiwnych limfocytów w stronę odpowiedzi Th2, natomiast DC pochodzenia limfoidalnego w kierunku Th1 [26].

Obecnie sugeruje się, że równie istotną rolę w polaryzacji odpowiedzi immunologicznej odgrywa mikrośrodowisko niedojrzałej DC oraz charakter antygeny. Wykazano, że mediatory odczynu zapalnego są odpowiedzialne za końcowe dojrzewanie DC polegające na zahamowaniu ich zdolności do endocytozy (fagocytozy), wzrostu ekspresji MHC II czy molekuł kostymulujących (CD40, CD80, CD86). W pełni dojrzałe DC wędrują wraz z przetworzonym antygenem do lokalnych węzłów chłonnych. W tym procesie szczególną rolę modulującą wydają się pełnić syntezowane *de novo* przez DC mediatory zapalenia, przede wszystkim cytokiny i eikozanoidy. Na przykład uwalniana interleukina 12 (IL-12) stymuluje dojrzewanie limfocytów T w kierunku odpowiedzi Th1, a prostaglandyna E2 (PGE₂) w Th2

[27, 28, 29].

Komórki dendrytyczne dzięki specjalnym receptorom PRR (*pattern recognition receptors*), do których zalicza się m. in receptory TLR (*Toll-like receptors*), łatwo rozpoznają i fagocytyują niebezpieczne patogeny, dając jednocześnie, poprzez produkcję mediatorów zapalnych, sygnał innym komórkom do mobilizacji. Jednym z bardzo silnie działających mediatorów lipidowych, wpływającym zarówno na dojrzewanie DC jak i ich dojrzałe już formy, jest PGE₂ [27, 30]. Przeprowadzone badania wskazują, że PGE₂ łącznie z IL-1 β i TNF- α silnie indukuje dojrzewanie DC, a stężenie cytokin wymagane dla skutecznego dojrzewania DC miało być około 100-krotnie niższe niż w przypadku braku tej prostaglandyny. Ponadto obecność (*priming*) PGE₂ w trakcie dojrzewania DC powodowała, że późniejsza stymulacja DC charakteryzowała się obniżoną produkcją IL-12, cytokiny promującej odpowiedź immunologiczną w kierunku Th1. Tak przygotowane w pełni dojrzałe DC były niewrażliwe na działanie IL-10, cytokiny silnie hamującej proces dojrzewania DC [30]. Co ciekawe, inna grupa badaczy pokazała, że niestymulowane DC produkują więcej IL-12 pod wpływem PGE₂ zależnie od dawki, zwłaszcza w obecności TNF- α [27].

Z analizy powyższych wyników badań wynika, że rola PGE₂ wciąż pozostaje niejasna, a uzyskane wyniki mogą w dużym stopniu zależeć od procedury przygotowania DC, jak również czasu podania i rodzaju użytych stymulatorów. W dotychczasowych badaniach wykazano, że egzogenna PGE₂ wpływa hamująco na uwalnianie TNF- α , natomiast podnosi poziom IL-10 w hodowli monocytów-makrofagów i DC stymulowanych LPS [31, 32, 33]. Coraz większa ilość nowych danych wskazuje, że w tkankach obwodowych, gdzie występują niedojrzałe DC, PGE₂ ma działanie aktywujące. Pod wpływem PGE₂ na powierzchni aktywowanych DC pojawia się receptor CCR7, który ma istotne znaczenie w ich wędrówce do lokalnych węzłów chłonnych zgodnie z gradientem czynników chemotaktycznych CCL19 i CCL21 [34]. W węzłach w strefach T-zależnych dojrzałe DC uwalniają również chemokiny, których zadaniem jest

przyciąganie limfocytów Th1 lub Th2. Wykazano, że PGE₂ wzmacnia produkcję chemokiny MDC (macrophages derived chemokine) (CCL21) (chemoatraktant dla Th2), natomiast obniża uwalnianie IP-10 (IFN-inducible protein 10) (CXCL10) (chemoatraktant dla Th1) po stymulacji CD40L i LPS [35].

Podsumowując, PGE₂ ma działanie plejotropowe i wydaje się pełnić kluczową rolę w regulacji odczynu zapalnego, a także określa typ antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej (Th1 *versus* Th2). Obwodowo dojrzewające DC w obecności PGE₂, IL-10 czy glukokortykoidów wykazują znacznie obniżoną zdolność do produkcji IL-12 warunkującą odpowiedź Th1 oraz uwalniają znacznie więcej czynników chemotaktycznych dla Th2. Natomiast, jeśli DC na wczesnym etapie zostanie poddana działaniu IFN- γ , to obserwujemy wysoką produkcję IL-12 [29].

PGE₂ jest głównym mediatorem produkowanym przez DC pochodzenia szpikowego, jednak stwierdzono, że komórki te uwalniają również PGD₂ oraz TXA₂. Wydaje się, że TXA₂ pełni ważną funkcję w interakcji DC i naiwnych limfocytów T. Zastosowanie agonistów receptora TP wyraźnie hamowało proliferację limfocytów T zależną od DC, również adhezja dziewiczych limfocytów T do DC była znacząco obniżona [36]. Ważną rolę w mediowaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej odgrywa również PGD₂. Dowiedziono, że w zarażeniu *Schistosoma mansoni* patogen ten uwalnia PGD₂ w ten sposób wydajnie hamując migrację komórek Langerhansa [37]. Zbliżone wyniki uzyskano dla DC płucnych, gdzie podawanie PGD₂ łącznie z antygenem wyraźnie obniżało liczbę DC w węzłach chłonnych [38]. PGD₂, podobnie jak jej pochodna 15d-PGJ₂, silnie wpływa na funkcje DC, obniżając zwłaszcza produkcję IL-12 oraz czynników chemotaktycznych dla Th1 [39]. Jednak w odczynie zapalnym właściwości przeciwzapalne PGD₂ są wygaszane przez PGE₂ i leukotrieny [40, 41].

Rola leukotrienów w odczynie zapalnym jest coraz lepiej rozumiana dzięki prowadzonym od wielu lat badaniom, m.in. przy pomocy technik molekularnych oraz defektywnych szczepów

mysich [16, 18, 22, 42]. Bardzo niewiele natomiast wiadomo o wpływie LTs na profesjonalne komórki prezentujące, a więc w konsekwencji na późniejszy rozwój swoistej odpowiedzi immunologicznej.

Głównym źródłem leukotrienów w komórce jest niewątpliwie szlak 5-LO, który niedawno odkryto również w komórkach dendrytycznych różnego pochodzenia [17, 43, 44, 45]. Wykazano, że 5-LO jest indukowana już podczas różnicowania się DC z komórek progenitorowych CD34⁺ pod wpływem GM-CSF, gdzie IL-4 działała hamująco na poziom 5-LO, a transformujący czynnik wzrostu β 1 – TGF β 1 (*transforming growth factor*) znacząco go podnosi [44]. Zaczęto więc badać, jaką funkcję pełnią leukotrieny uwalniane przez DC zarówno na drodze auto- jak i parakrynej.

Przy pomocy mysiego modelu astmy indukowanej przy użyciu DC pochodzenia szpikowego znakowanych antygenem (hodowanych w obecności ekstraktu z *Dermatophagoides farinae*) zademonstrowano, że zastosowanie egzogennych cysLTs oraz antagonistów receptorów dla cysLTs silnie wpływa na profil cytokin produkowanych w hodowli *in vitro*, jak również na przebieg astmy u myszy *in vivo*. Ponadto zaobserwowano, że *in vivo* u myszy nacieki eozynofilów były zdecydowanie większe, jeśli do immunizacji użyto DC hodowanych z ekstraktem z *D. farinae* oraz dodatkiem LTD₄ niż u myszy kontrolnych, wziewnie immunizowanych DC hodowanymi z samym ekstraktem. Natomiast proces powstawania nacieku eozynofilowego był hamowany do poziomu kontroli negatywnej (myszy wziewnie immunizowane samymi DC), jeśli do znakowanych antygenem DC dodano antagonisty receptora cysLT₁ (Pranlukastu). Ponadto w modelu tym znakowane DC traktowane LTD₄ produkowały więcej IL-10, natomiast zastosowanie antagonistów receptora cysLT₁ powodowało wzrost produkcji IL-12p40 [41]. W innym mysim modelu astmy, wywoływanej wziewnym podawaniem ovalbuminy wykazano, że systemowe podawanie antagonistów receptora cysLT₁ znacząco zmniejszało objawy zapalne, przy czym wydaje się, że mechanizm

ten mediowany był właśnie przez DC. DC śledzionowe, izolowane od tych myszy, poza obniżoną zdolnością do prezentacji antygeny, charakteryzowały się również niską produkcją IL-10 oraz IL-12p70 po restymulacji LPS, w porównaniu do myszy tylko immunizowanych [46]. U ludzi natomiast zaobserwowano, że DC izolowane od osób z atopią produkują około sześciokrotnie więcej cysLTs niż grupa kontrolna po stymulacji alergenem [47]. Wydaje się ponadto, że cysLTs pełnią ważną funkcję w migracji DC z tkanek obwodowych do węzłów chłonnych w gradiencie chemokin CCL19 [19]. W badaniach nad wpływem LTB₄ na funkcje DC na razie pojawiło się niewiele doniesień. Choć wiadomo, że DC produkują go w znacznych ilościach, do tej pory jedynie w doświadczeniach *in vitro* na mysich DC pochodzenia szpikowego wykazano, że LTB₄ nie ma wpływu na poziom uwalnianej IL-12 p70 i IL-10 w hodowli stymulowanej LPS [48]. Jednak dotychczas w doniesieniach literaturowych brak jest jednoznacznej i pełnej informacji o regulacyjnej roli eikozanoidów, a zwłaszcza leukotrienów, w indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej.

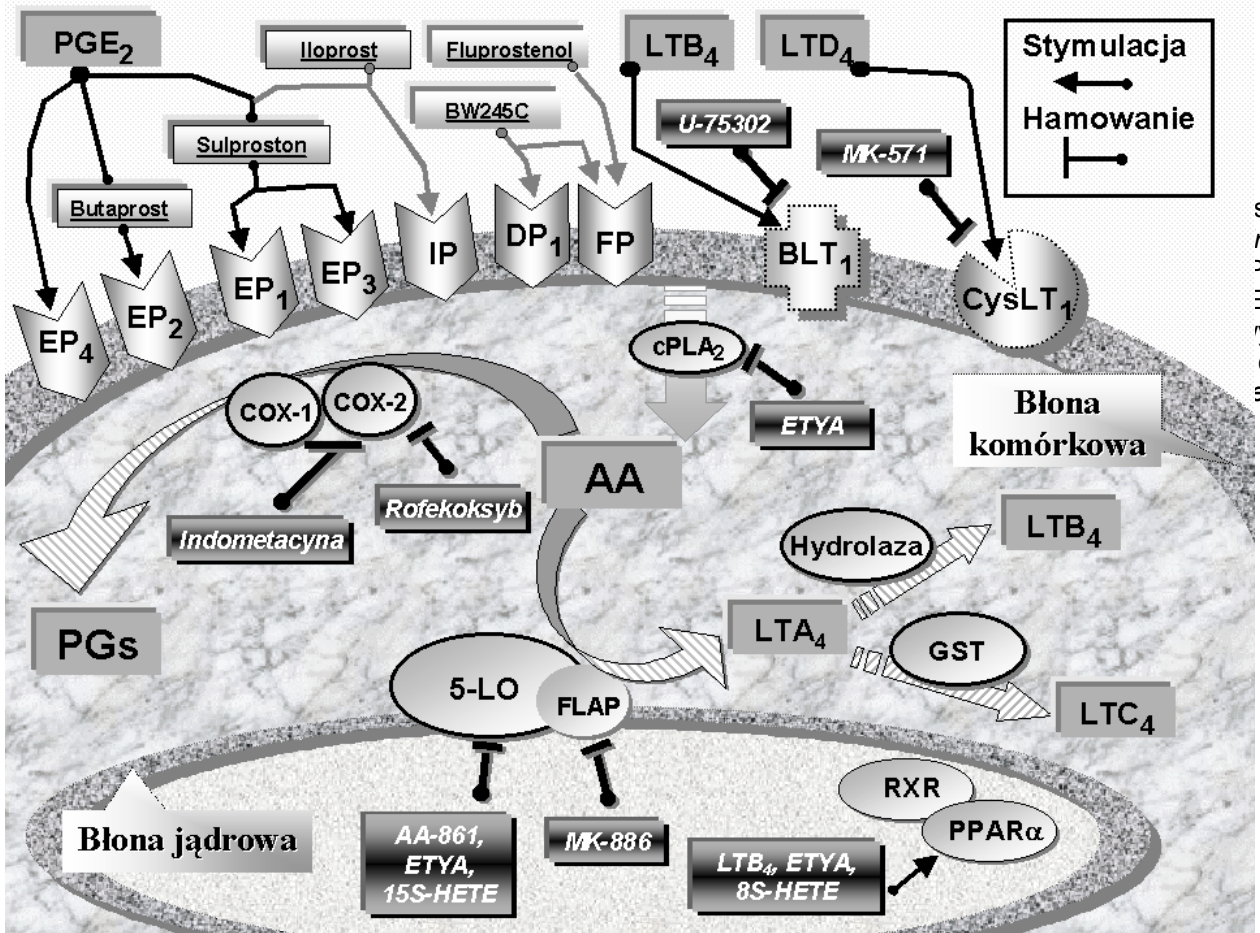
Pełne zrozumienie i poznanie mechanizmów regulacji dojrzewania komórek DC znajdzie praktyczne zastosowanie w immunologii klinicznej. Immunoterapia jest coraz częściej stosowaną metodą leczenia wspomagającego w onkologii, zakażeniach wirusowych czy bakteryjnych. Autologiczne komórki DC spolaryzowane w kierunku aktywacji limfocytów Th1 niosące na swej powierzchni swoisty antygen są wykorzystywane jako żywe szczepionki w leczeniu zakażeń wywołanych lekoopornymi szczepami bakterii, wirusów czy z natury słabo immunogennych nowotworów [49, 50, 51]. Być może w przyszłości DC, inkubowane *ex vivo* z określonym antygenem, posiadające zdolności do indukcji odpowiedzi Th2 będą wykorzystywane w transplantologii, alergiach czy chorobach autoimmunizacyjnych, gdzie uwalniane cytokiny np. IL-4, IL-5, IL-6 czy IL-10 stymulowałyby syntezę przeciwciał blokujących.

1.4 Farmakologia eikozanoidów

Do identyfikacji enzymów biorących udział w syntezie eikozanoidów oraz w celu zbadania ich roli i biologicznej funkcji w regulacji syntezy wybranych cytokin przez DC, zastosowano następujące narzędzia farmakologiczne (szczegóły patrz **Ryc. 1.2**):

- inhibitory enzymów uczestniczących w syntezie eikozanoidów takie jak:
 - indometacyna oraz rofekoksyb (inhibitory syntezy PGs),
 - MK-886, AA-861, 15S-HETE (inhibitory syntezy LTs),
 - ETYA (generalny inhibitor szlaku syntezy PGs i LTs);

- agonistów oraz antagonistów receptorów dla eikozanoidów jak np.:
 - PGE₂ (agonista EP_{1, 2, 3 i 4}), butaprost (agonista EP₂), sulproston (agonista EP_{1 i 3}), iloprost (agonista EP_{1, 3} i IP), BW245C (agonista DP i FP), fluprostenol (agonista FP), LTB₄ (agonista BLT_{1 i 2}) oraz LTD₄ (agonista cysLT_{1 i 2});
 - U-75302 (antagonista BLT₁) oraz MK-571 (antagonista cysLT₁).



na DC

sygenaza,
 ng protein),
 2 – receptor
 ETE – kwas
 y receptor
 α), RXR –
 erase)

II. Cele pracy

Określenie udziału eikozanoidów (prostaglandyn i leukotrienów) w regulacji funkcji komórek prezentujących antygen.

Badania przeprowadzono w systemie *in vitro* na modelu mysich komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego (DC).

Cele badawcze zrealizowano poprzez:

1.

Określenie profilu eikozanoidów uwalnianych przez DC stymulowane wybranymi aktywatorami.

2.

Zbadanie typu receptorów dla eikozanoidów zaangażowanych w transdukcję sygnału w DC aktywowanych PGE₂ i leukotrienami (badanie przeprowadzono z użyciem agonistów i antagonistów wybranych eikozanoidów)

3.

Zbadanie wpływu egzo- i endogennych eikozanoidów na profil uwalnianych przez DC cytokin biorących udział w polaryzacji odpowiedzi immunologicznej (Th1 *versus* Th2)

III. Materiały i metody

3.1 Odczynniki

Monoklonalne chemiczne przeciwciała przeciwko mysiemu antygenowi CD11c sprzężone z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) (klon HL3), szczerze przeciwciała przeciwko mysiemu antygenowi CD86 (klon GL1) oraz przeciwko I-A^k (klon 11-5.2) i I-A^d (klon AMS-32.1) sprzężone z fikoerytryną (PE) (PharMingen, San Diego, CA, USA).

Butaprost [10 mM] (agonista EP₂), BW245C [100 mM] (agonista DP), sulproston [10 mM] (agonista EP₁ i EP₃) oraz MK-571 [20 mM] (antagonista cysLT₁) (Cayman, Ann Arbor, MI, USA).

Iloprost [10 mM] (agonista IP) (Schering, Berlin, Niemcy).

Terbutalina (agonista receptora β 2-adrenergicznego, podnoszący poziom cAMP), indometacyna (inhibitor COX-1 i 2), prostaglandyna E₂ [10 mM] oraz A23187 [50 mM] (jonofor wapnia) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Rofekoksyb [50 mM] (swoisty inhibitor COX-2) (Merck, Rahway, NJ, USA).

Kwas eikoza-5,8,11,14-tetraynowy (ETYA) [20 mM] (inhibitor 5-LO, cPLA₂ oraz aktywator PPAR α), AA-861 [50 mM] (inhibitor 5-LO), MK-886 [10 mM] (inhibitor FLAP) (Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA).

Powyższe roztwory wyjściowe, których stężenie podano w nawiasach kwadratowych przygotowano w dimetylosulfotlenku (DMSO), natomiast poniższe roztwory przygotowano w etanolu, a wszystkie przechowywano w temp. -80°C.

(+)-fluprostenol [21.8 mM] (agonista FP), kwas 15(S)-hydroksyeikozatetraenowy (15S-HETE) [1 mM] (inhibitor 5-LO), 8S-HETE [0.31 mM] (aktywator PPAR α), U-75302 [10 mM] (antagonista BLT₁), LTB₄ [2 mM] i LTD₄ [0.2 mM] (Cayman, Ann Arbor, MI, USA).

Zymosan z *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, St. Louis, MO, USA) rozpuszczano w 0.9% roztworze NaCl i gotowano przez 10 min. Po odpłukaniu, peletkę zawieszono w mysiej surowicy zawierającej przeciwciała i inkubowano w 37°C przez 30 minut. Tak opsonizowany zymosan (OZ) odpłukano 3 krotnie i w stężeniu 4 mg/mL zawieszono w RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), a następnie przechowywano w temp. -80°C.

Pożywki hodowlane przygotowywano bezpośrednio przed doświadczeniem na bazie RPMI-1640 z dodatkiem 5% FCS (Gibco, Grand Island, NY, USA) oraz antybiotyku – gentamicin (Polfa, Warszawa, Polska).

W tak przygotowanej pożywce bezpośrednio przed wykonaniem doświadczenia z udziałem DC rozcieńczano odpowiednio odczynniki, jak również, w celu eliminacji nieswoistego wpływu, badano używane rozpuszczalniki (DMSO i etanol). Stwierdzono, że DMSO w stężeniu do 0.1% oraz etanol do 0.5% nie wpływał istotnie na poziom uwalnianych cytokin (wyników nie pokazano).

3.2 Przygotowanie komórek dendrytycznych (DC)

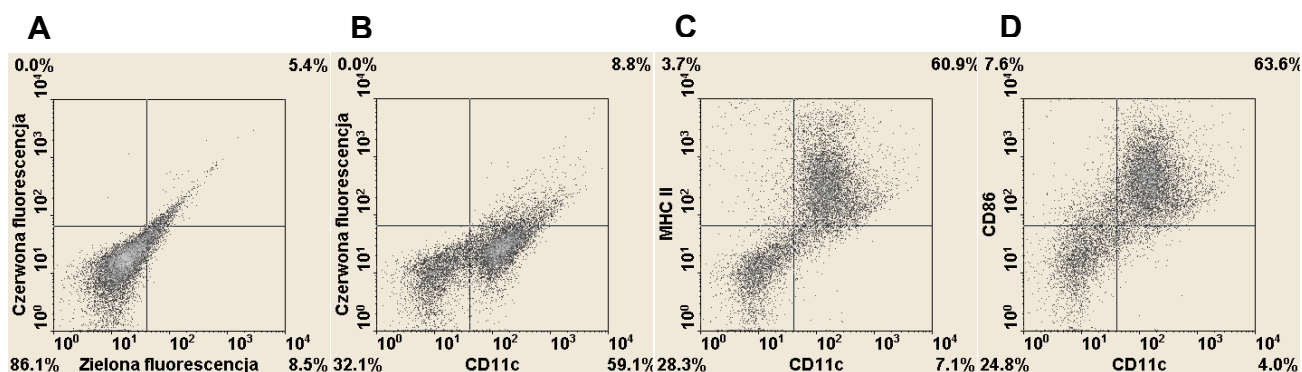
Mysie DC pochodzenia szpikowego uzyskiwano ze szpiku izolowanego od myszy szczepu Balb/c (doświadczenia dotyczące prostanoidów) oraz CBA (doświadczenia związane z leukotrienami). Metodę uzyskiwania DC ze szpiku z niewielkimi modyfikacjami oparto na publikacji Inaba i wsp., gdzie DC hodowano w obecności czynnika stymulującego tworzenie się kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) [52]. Komórki szpikowe, z których wyprowadzano DC używane do doświadczeń, pobierano z kości udowych myszy przez wypłukiwanie ich solą fizjologiczną, wstrzykiwaną do komory szpikowej cienką igłą. Wypłukane fragmenty szpiku rozbijano na pojedyncze komórki intensywnie pipetując i zawieszano je w pożywce Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, Rockville,

MD, USA) w stężeniu 3×10^5 komórki/mL. Pożywkę dodatkowo wzbogacano 5 mg/mL apotransferyny, 50 nM 2-merkaptotanołem, 10% FCS, antybiotykiem – gentamicin (Polfa, Warszawa, Polska) oraz 10% nadsączem z lini komórkowej X-63 produkującej GM-CSF. Po 2 dniach pożywkę z butelek hodowlanych zawierającą populację nieadherentnych komórek usuwano zastępując ją świeżą pożywką. Po 7 dniach z butelek hodowlanych zbierano populację nieadherentnych DC uwalniających się spontanicznie z pojedynczych gron i używano ich bezpośrednio w doświadczeniach. Tak przygotowane komórki po odplukaniu zawieszano w RPMI-1640 z dodatkiem 5% FCS i antybiotyku – gentamicin (Polfa, Warszawa, Polska) i wysiewano na płaskodenne płytki 24- lub 96-dołkowe w zależności od doświadczenia.

3.3 Czystość populacji DC mierzona metodą cytofluorymetrii przepływowej

W celu sprawdzenia stopnia czystości DC używanych w doświadczeniach komórki, uzyskiwane po 7 dniowej hodowli sprawdzano pod kątem ekspresji wybranych antygenów charakterystycznych dla mysich komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego: CD11c, CD86 oraz MHC II (I-A^k i I-A^d). W skrócie, DC przed inkubacją ze znakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami traktowano przez około 20 min. w 4°C mysimi przeciwciałami blokującymi receptory Fc w stężeniu 50 µg/mL (źródło własne uzyskiwane z hodowli hybrydom (klon 2.4G2 – dar od Prof. K. Eichamna z Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, Niemcy), oczyszczane na białku A). Następnie DC inkubowano przez 30 min. w 4°C ze znakowanymi przeciwciałami monoklonalnymi w 100 µL soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) zawierającej 2% FCS oraz 0.05% NaN₃. Po dwukrotnym odplukaniu znakowane komórki analizowano w cytofluorymetrze przepływowym Ortho CytoronAbsolute (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA). Analiza cytofluorymetryczna potwierdza, że populacja DC uzyskiwana z 7 dniowej hodowli w obecności GM-CSF jest niejednorodna i

charakteryzuje się wysoką autofluorescencją, co często utrudnia niearbitralną analizę przy niskiej ekspresji pozostałych antygenów. Każdorazowa analiza wykazała, że procent DC podwójnie pozytywnych CD11c/MHC II oraz CD11c/CD86 wahał się w granicach od ~40 do ~60 %.



Ryc. 3.1 Analiza cytofluorymetryczna wybranych antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla mysich DC pochodzenia szpikowego

A – kontrola nieznakowana i autofluorescencja, **B** – DC znakowane anty-CD11c FITC, **C** – DC znakowanie podwójnie anty-CD11c FITC oraz anty-MHC II PE, **D** – DC znakowanie podwójnie anty-CD11c FITC oraz anty-CD86 PE. Wybrano jedno z reprezentatywnych doświadczeń.

3.4 Żywotność komórek

W celu sprawdzenia cytotoksyczności używanych odczynników, komórki po doświadczeniu rutynowo monitorowano pod względem ich żywotności w porównaniu do kontroli nie traktowanych odczynnikami. Mierzono metodą kolorymetryczną zdolność żywych komórek do redukcji soli tetrazolowej MTS w obecności substancji wiążącej elektron (PES) do rozpuszczalnej formy formazanu przy użyciu testu CellTiter 96 AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA). W nadsączach mierzono także poziom dehydrogenazy mleczanowej uwalnianej z martwych komórek za pomocą testu LDH Cytotoxicity

Detection Kit (Takara Biomedicals, Shiga, Japonia). Wszystkie testy wykonywano zgodnie z zaleceniami i dołączoną instrukcją producenta.

3.5 Oznaczanie prostaglandyny E₂ (PGE₂) i leukotrienów (LTB₄ i cysLTs) w nadsączach z hodowli DC

Poziom uwalnianych PGE₂, LTB₄ i cysLTs mierzono przy pomocy gotowych testów immunoenzymatycznych (EIA) (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), opartych na zasadzie kompetycji pomiędzy produkowanymi eikozanoidami przez DC a stałym stężeniem sprzężonego z acetylcholinesterazą odpowiedniego standardu. Intensywność koloru mierzonego spektrofotometrycznie przy długości fali 412 nm jest w tym teście wprost proporcjonalna do ilości sprzężonego standardu, a odwrotnie proporcjonalna do ilości uwalnianych eikozanoidów przez DC. Poszczególne kroki przygotowania próbek i wykonania testu przeprowadzono zgodnie z dołączoną firmową instrukcją. Pomiar wykonano w mikroczytniku spektrofotometrycznym PowerWave_x (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) – dar z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

3.6 Pomiar mRNA COX-2 oraz ekspresji białka COX-2 i 5-LO

Ekspresję mRNA dla COX-2 mierzono przy pomocy techniki RT-PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy z użyciem odwrotnej transkryptazy). Całkowity RNA z komórki izolowano przy pomocy TRIzolR Reagent (Gibco, Grand Island, NY, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Dalszą część oznaczenia wykonano dzięki pomocy dr Rafała Olszaneckiego z Katedry Farmakologii Collegium Medicum UJ. W skrócie, izolowane RNA (300 ng) z każdej próbki posłużyło jako matryca dla odwrotnej transkryptazy M MLV do syntezy cDNA w obecności oligo-(dT)₁₂₋₁₈ starterów (Gibco, Grand Island, NY, USA). Reakcję prowadzono w 42°C przez 2 godziny. Następnie w łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR), cDNA było amplifikowane. Reakcję prowadzono w cyklach amplifikacyjnych (od 23 do 34 cykli) w T3

termocyklerze (Biometra, Göttingen, Niemcy), w 25 μ L buforu zawierającego 1 U polimerazy HotStar Taq (Qiagen, Hilden, Niemcy), 200 μ M dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$ oraz 40 nM specyficznych primerów dla COX-2 oraz β -aktyny (Ambion, Austin, TX, USA). Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 2 % żelu agarozowym i barwiono bromkiem etydyny. Zdjęcia żeli wykonywano przy pomocy cyfrowej kamery DC40 firmy Kodak, a prążki mierzono przy użyciu programu do analizy Scion Image for Windows (Scion, Frederick, MD, USA). Wyniki przedstawiono jako stosunek gęstości pikseli specyficznego mRNA do mRNA β -aktyny, a dla określenia specyficzności prążków oraz orientacji zastosowano znacznik mas DNA, marker M1 pUC19/Msp I (DNA-GDANSK II s.c., Gdańsk, Polska) [53].

Indukcję białka COX-2 oraz 5-LO oznaczano przy pomocy techniki Western blot. Komórki do oznaczenia poddawano lizie w buforze PBS zawierającym 1% Triton X-100 i 0.1% SDS. Całkowite stężenie białka w lizatach oznaczano przy pomocy testu Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA). Zebrane próbki z równą ilością białka zawieszano w buforze obciążającym zawierającym 0.125M Tris, 4% SDS (siarczan dodecylu sodu), 20 % glycerol, 0.2 M DTT (dithiothreitol) oraz 0.02 % błękit bromofenolowy (wszystkie odczynniki z Sigma) w stosunku 2:1 (v/v) a następnie gotowano 4 minuty. Tak przygotowane próbki (7 μ g białka w przypadku oznaczania COX-2 i 5 μ g białka dla 5-LO) nakładano na ścieżki w żelu poliakrylamidowym zawierającym 10% SDS), a następnie prowadzono rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) w aparacie Mighty Small II (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) z zastosowaniem nieciąglego systemu buforowego według metody Laemmli (1970) [54]. Po rozdziale białka przenoszono na membrany nitrocelulozowe w aparacie do transferu Hoefer TE22 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Po całonocnej inkubacji z roztworem białka blokującego w 4°C (3% odtłuszczone mleko w proszku) membrany inkubowano 2 godziny w temp. pokojowej z króliczymi poliklonalnymi przeciwciałami przeciwko COX-2 lub 5-LO (Cayman, Ann Arbor, MI, USA). Następnie membrany po odpłukaniu ponownie inkubowano w

temp. pokojowej przez godzinę z drugorzędowymi przeciwciałami przeciwko króliczym IgG oraz z przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko β -aktynie sprzężonymi z fosfatazą alkaliczną (Sigma, St. Louis, MO, USA). Prążki wywoływano za pomocą substratu BCIP/NBT (bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Jako znacznika mas używano barwionego standardu, Low Range (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Wybarwione membrany skanowano, a prążki odpowiadające mierzonemu białku analizowano za pomocą programu do analizy Scion Image for Windows (Scion, Frederick, MD, USA). Wyniki przedstawiono jako stosunek gęstości pikseli swoistego białka do białka β -aktyny ulegającego konstytutywnej ekspresji w komórkach.

3.7 Oznaczenie cytokin metodą ELISA

Stężenie cytokin (TNF- α , IL-6, IL-12 p40 and IL-12 p70) w nadsączach z hodowli komórek DC oznaczano przy użyciu immunoenzymatycznej metody kanapkowej ELISA z zastosowaniem komercyjnie dostępnych przeciwciał (BD PharMingen, San Diego, CA, USA). Płytkę 96-cio dołkową Easywash (Corning, Corning, NY, USA) inkubowano w 4°C przez noc z 50 μ L przeciwciał (rozcieńczonych w PBS) przeciwko mysiej IL-6 (klon: MP5-20F3, 2 μ g/mL), podjednostce IL-12 p40 (klon: 15.6, 2 μ g/mL), IL-12 p35/p70 (klon: Red-T/G297-289, 7.4 μ g/mL) lub TNF- α (klon: G281-2626, 10 μ g/mL). W celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał płytkę dwukrotnie przepłukiwano 0.1% Tween 20 w PBS (pH 7.2) zwanym dalej buforem płuczącym. Następnie płytkę blokowano 3% roztworem odtłuszczonego mleka w proszku w PBS przez 2 godziny w 37°C. Po ponownym dwukrotnym przemyciu płytki buforem płuczącym dodano odpowiednio rozcieńczone standardy dla każdej cytokiny oraz próbki badane. Po nocnej inkubacji w 4°C i czterokrotnym przepłukaniu płytki buforem płuczącym nakładano biotynylowane, odpowiednio rozcieńczone w 4% buforze BSA (albumina bydlęca)

w PBS, przeciwciała przeciwko mysiej IL-6 (klon: MP5-32C11, 0.5 $\mu\text{g/mL}$), mysiej IL-12 (klon: 17.8, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (p40) lub 1 $\mu\text{g/mL}$ (p70)) oraz mysjemu TNF- α (klon: MP6-XT3, 1 $\mu\text{g/mL}$) (100 μL na dołek). Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę przemyto 5 razy buforem płuczającym, a następnie dodano po 100 μL peroksydazy chrzanowej sprzężonej ze straptawidyną (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) rozcieńczoną w stosunku 1:500 w 4% buforze BSA w PBS. Po około 45 minutach inkubacji płytkę przepłukiwano sześciokrotnie buforem płuczającym, a następnie dodawano o-fenylo-diaminę (OPD) (0.5 mg/mL) oraz substratu 0.12% H_2O_2 (oba odczynniki z Sigma, St. Louis, MO, USA) przygotowane w buforze fosforanowo-cytrynianowym, pH 5.0. Reakcję enzymatyczną prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności, po czym zatrzymywano ją dodając 3 M H_2SO_4 . Odczyty wykonywano w mikroczytniku płytek PowerWave_x przy długości fali 492 nm. Poziom cytokin w poszczególnych próbkach odczytywano z krzywych standardowych przygotowanych dla rekombinowanego standardu IL-6 (PeproTech, London, Anglia), IL-12 p70 (Genzyme, Cambridge, MA, USA) or TNF- α (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Stężenie IL-10 w nadsączach z hodowli DC oznaczano przy pomocy gotowego zestawu OptEIA (PharMingen, San Diego, CA, USA) zgodnie z dołączoną instrukcją producenta.

3.8 Analiza statystyczna wyników

Do oceny znamienności statystycznej dla pojedynczych średnich posłużono się testem *t*-studenta uprzednio wykonując analizę homogenności zmiennych przy pomocy testu F. Testem ANOVA (analiza wariancji) badano zależności pomiędzy próbkami dla większej liczby grup, a za granicę istotności statystycznej przyjęto wartość $p \leq 0.05$. W doświadczeniach, gdzie badano dawko-zależny wpływ stosowanych substancji, tzw. efekt maksymalny oraz tzw. efekt pół maksymalny (EC_{50}), czyli stężenie, dla którego obserwowano 50% zahamowania bądź

podniesienia uwalniania cytokin, wyznaczano przez regresję nieliniową, dopasowując krzywe za pomocą programu GraphPad Prism ver. 3.03 dla Windows (GraphPad Software, San Diego, CA USA).

IV. Wyniki

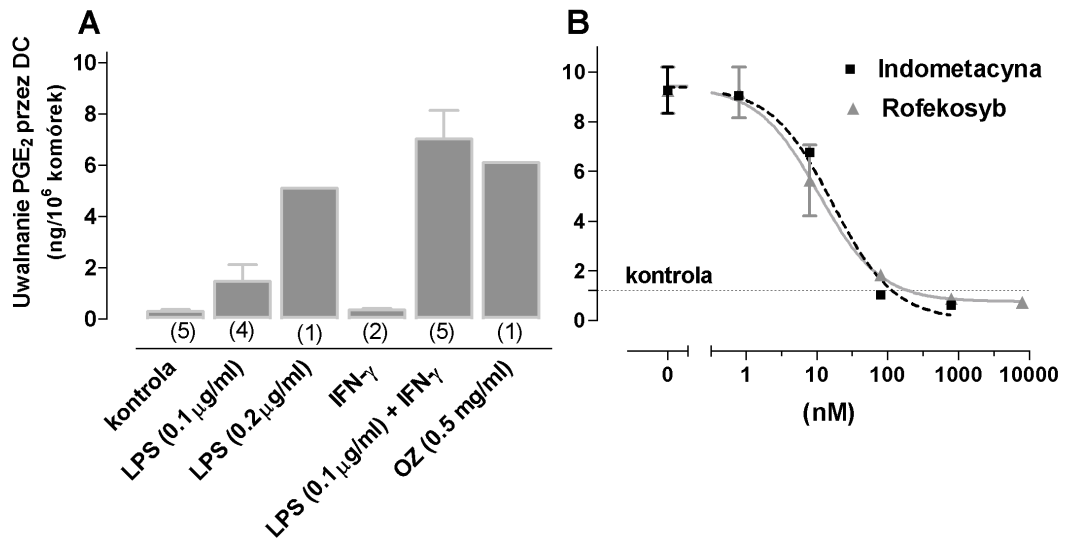
4.1 Synteza eikozanoidów przez komórki dendrytyczne (DC)

4.1.1 Indukcja ekspresji COX-2 i syntezy PGE₂ w DC

LPS jest silnym induktorem ekspresji COX-2 i syntezy prostaglandyn, a działanie LPS w tym zakresie jest potęgowane przez IFN- γ . Niestymulowane DC lub stymulowane tylko IFN- γ w 24 godzinnej hodowli uwalniają bardzo niewielkie ilości PGE₂ ($\sim 0.3 \pm 0.05$ ng/10⁶ komórek). Natomiast DC stymulowane LPS uwalniają w ciągu 24 godzinnej hodowli 1.5 ± 0.6 ng/10⁶ komórek PGE₂. W obecności IFN- γ ilość PGE₂ rośnie do wartości 7.0 ± 1.1 ng/10⁶ komórek. Podobnie silnym stymulatorem okazał się opsonizowany zymosan (OZ) (**Ryc. 4.1A**).

Ryc. 4.1 Stymulowane DC uwalniają znaczne ilości PGE₂

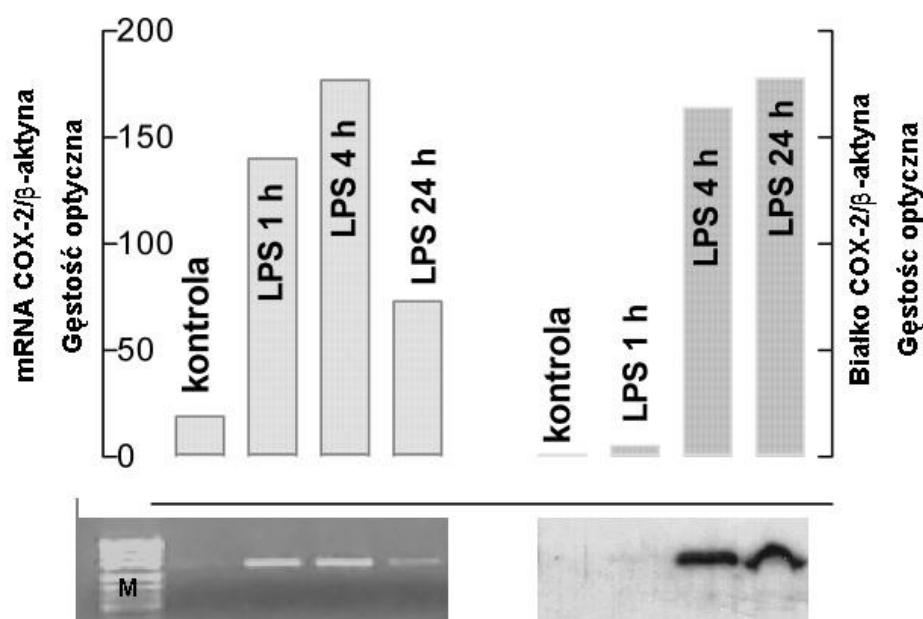
Komórki hodowano w 96-dołkowych płytkach w zagęszczeniu 1×10^6 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) w obecności LPS, IFN- γ (50 U/mL), LPS plus IFN- γ lub OZ (**A**) i kolejnych stężeniach indometacyny lub rofekoksybu (**B**). Stężenie PGE₂ w 24-godzinnych nadsączach hodowlanych oznaczono za pomocą EIA. Słupki i punkty przedstawiają średnią \pm błąd średni z 2-5 niezależnych eksperymentów.



Zastosowane inhibitory COXs całkowicie hamowały produkcję PGE₂, co potwierdziło specyficzność użytego immunotestu. Zarówno indometacyna, nieselektywny inhibitor obu izoform COX, jak i rofekoksybil, selektywny inhibitor COX-2, w sposób dawko zależny hamowały produkcję PGE₂ w DC stymulowanych LPS i IFN-γ. Przy stężeniach ~100 nM dla obu inhibitorów produkcja PGE₂ wracała do poziomu uzyskiwanego w kontroli (hodowla niestymulowanych DC) (**Ryc. 4.1B**). Wpływ selektywnego inhibitora COX-2 wskazuje, że to głównie ten enzym zaangażowany jest w produkcji PGE₂ w stymulowanych DC.

Wyniki pomiaru poziomu mRNA metodą RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) oraz poziomu białka metodą Western blot wskazują na brak ekspresji COX-2 w niestymulowanych DC. Natomiast już po 1 godzinie po stymulacji LPS (100 ng/mL) bardzo szybko wzrasta poziom transkryptu dla COX-2, a po 4 godzinach pojawia się również białko (**Ryc. 4.2**). Ekspresja zarówno mRNA jak i białka znacząco wzrasta po dodaniu IFN-γ (wyników nie pokazano). Poziom mRNA w DC stymulowanych LPS wyraźnie spada po 24

godzinach, jednak poziom białka nadal utrzymuje się na wysokim poziomie, co warunkuje produkcję pochodnych szlaku indukowalnej cyklooksygenazy.

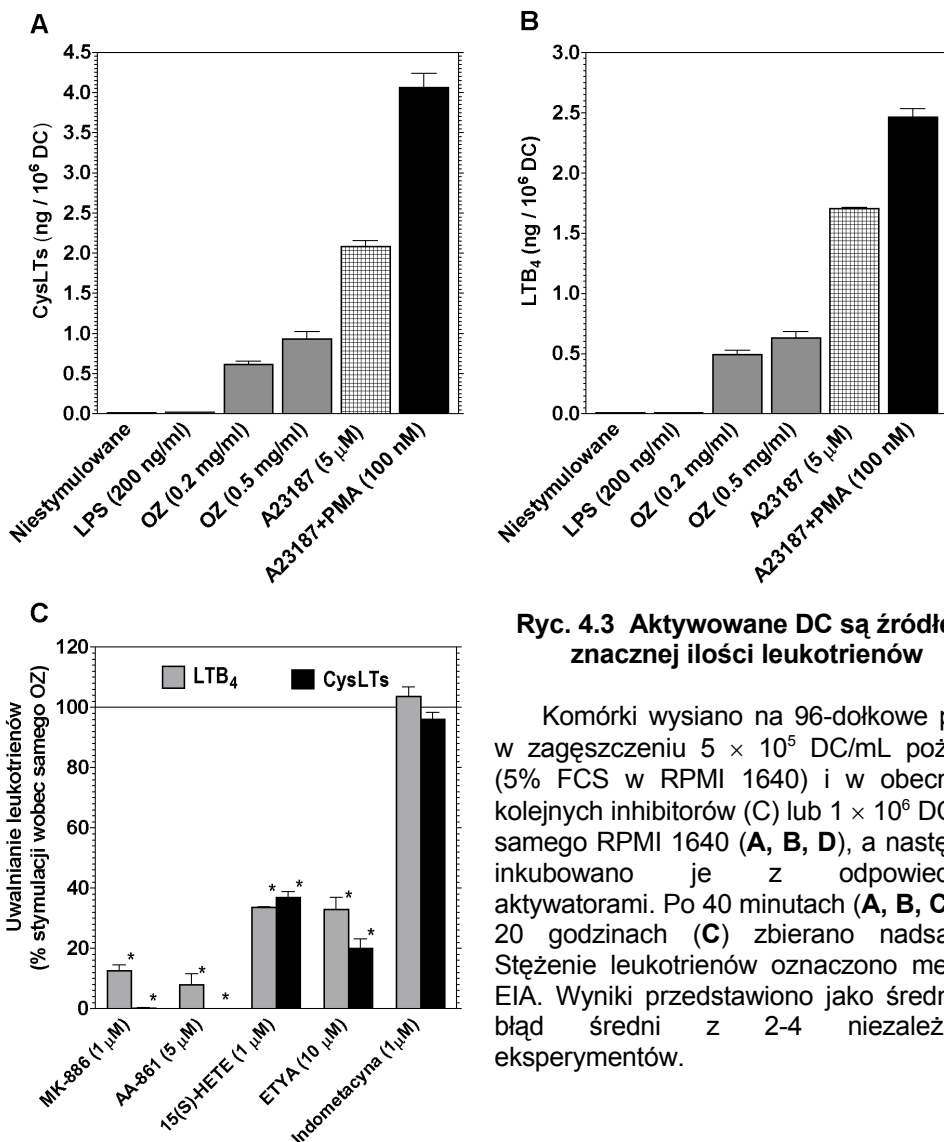


Ryc. 4.2 LPS indukuje w DC ekspresję enzymu COX-2 na poziomie mRNA oraz białka

Komórki hodowano w 12-dółkowych płytkach w zagęszczeniu 1×10^6 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) w obecności LPS (100 ng/mL). Po 1, 4 i 24 godzinach stymulacji oznaczono poziom mRNA i białka dla COX-2 w DC. Wyniki przedstawiają jeden reprezentatywny eksperyment z dwóch niezależnych doświadczeń.

4.1.2 Indukcja syntezy leukotrienów w DC

DC stymulowane przez 40 minut opsonizowanym zymosanem (OZ) lub jonoforem wapnia (A23187), aktywatorami znanymi ze stymulacji LTs w innych komórkach [55, 56], uwalniają duże ilości cycLTs oraz LTB₄ (odpowiednio, **Ryc. 4.3A i B**). Dodatkowo, dodanie PMA, aktywatora kinazy białkowej C, łącznie z jonoforem wapnia wzmagало produkcję LTs, zwłaszcza cycLTs. Natomiast poziom immunoreaktywności LTs w obecności LPS nie różnił się od wartości w grupie niestymulowanej (**Ryc. 4.3A i B**).

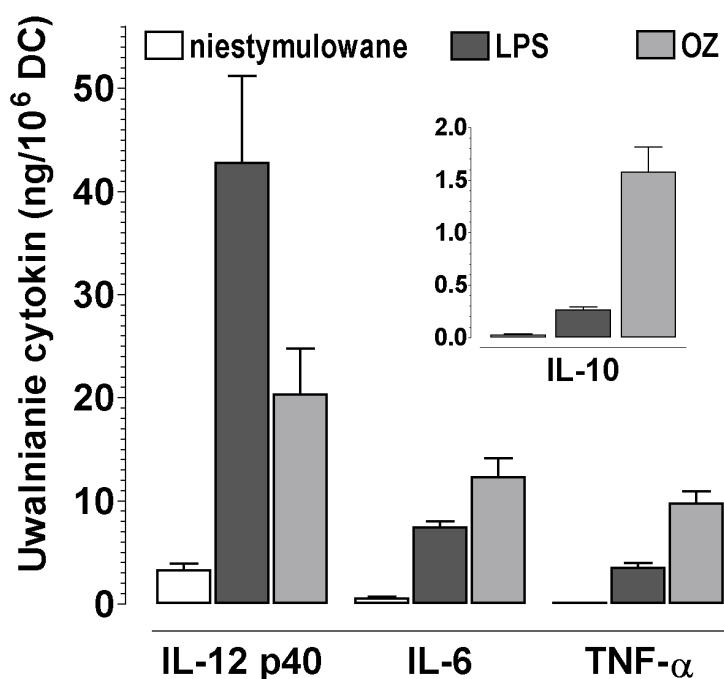


Ryc. 4.3 Aktywowane DC są źródłem znacznej ilości leukotrienów

Komórki wysiano na 96-dołkowe płytki w zagęszczeniu 5×10^5 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) i w obecności kolejnych inhibitorów (C) lub 1×10^6 DC/mL samego RPMI 1640 (A, B, D), a następnie inkubowano je z odpowiednimi aktywatorami. Po 40 minutach (A, B, C) lub 20 godzinach (C) zbierano nadsącze. Stężenie leukotrienów oznaczono metodą EIA. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm błąd średni z 2-4 niezależnych eksperymentów.

Zastosowanie szeregu inhibitorów szlaku 5-LO/FLAP: MK-886, AA-861, 15(S)-HETE oraz ETYA (nieselektywny inhibitor metabolizmu kwasu arachidonowego) potwierdziło rolę kompleksu, 5-LO/FLAP w syntezie LTs w mysich DC pochodzenia szpikowego i jednocześnie specyficzność immunoreaktywności LTs wykrywanej za pomocą EIA. Inhibitor szlaku cyklooksygenaz – indometacyna nie miała żadnego wpływu na poziom produkcji LTs (Ryc. 4.3C). Przy użyciu metody Western Blot potwierdzona została ekspresja 5-LO w niestymulowanych DC (wyników nie pokazano). Poprzednie doniesienia sugerują, że ekspresja 5-LO indukowana jest na wczesnym etapie dojrzewania DC pod wpływem GM-CSF [17].

4.2 Profil cytokin uwalnianych przez DC aktywowane LPS i opsonizowanym zymosanem (OZ)



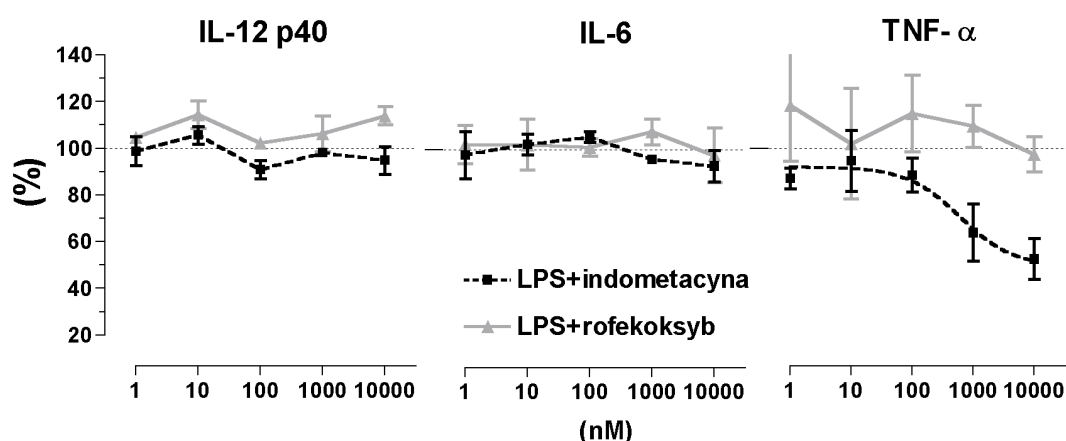
Ryc. 4.4 Różnice w proporcjach cytokin uwalnianych przez DC stymulowane LPS lub OZ

Komórki hodowano w 96-dołkowych płytkach w zagęszczeniu 5×10^5 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) w obecności LPS (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) lub OZ (0.2 mg/mL). Po 24 godzinach w zbieranych nadsączach oznaczono cytokiny metodą ELISA. Słupki przedstawiają uśrednione wyniki \pm błąd średni z 3-10 niezależnych eksperymentów.

Zaobserwowano znaczące różnice w profilu uwalnianych cytokin przez DC pod wpływem LPS (stymulującym syntezę PGs, ale nie LTs) i OZ (stymulującym produkcję zarówno LTs jak i PGs) w 24-godzinnej hodowli. Komórki stymulowane OZ uwalniały ~6.5 razy więcej IL-10 ($p < 0.01$), ~2.8 razy więcej TNF- α ($p < 0.01$) i ~1.7 razy więcej IL-6 ($p < 0.05$) niż DC traktowane LPS. Odwrotnie, LPS powodował w przybliżeniu 2-krotnie większą produkcję IL-12 p40 niż OZ ($p < 0.05$) (**Ryc. 4.4**). Wyniki te sugerują możliwość, że stymulowane przez OZ, ale nie przez LPS, endogenne LTs mogą hamować produkcję IL-12 p40 i stymulować produkcję IL-6, IL-10 lub TNF- α w DC.

Zgodnie z poprzednimi doniesieniami, DC stymulowane samym LPS uwalniały niewielkie lub niewykrywalne ilości aktywnego biologicznie heterodimeru IL-12 p70 (składającego się z kodowanych przez różne geny podjednostek p35 i p40) [29, 57, 58].

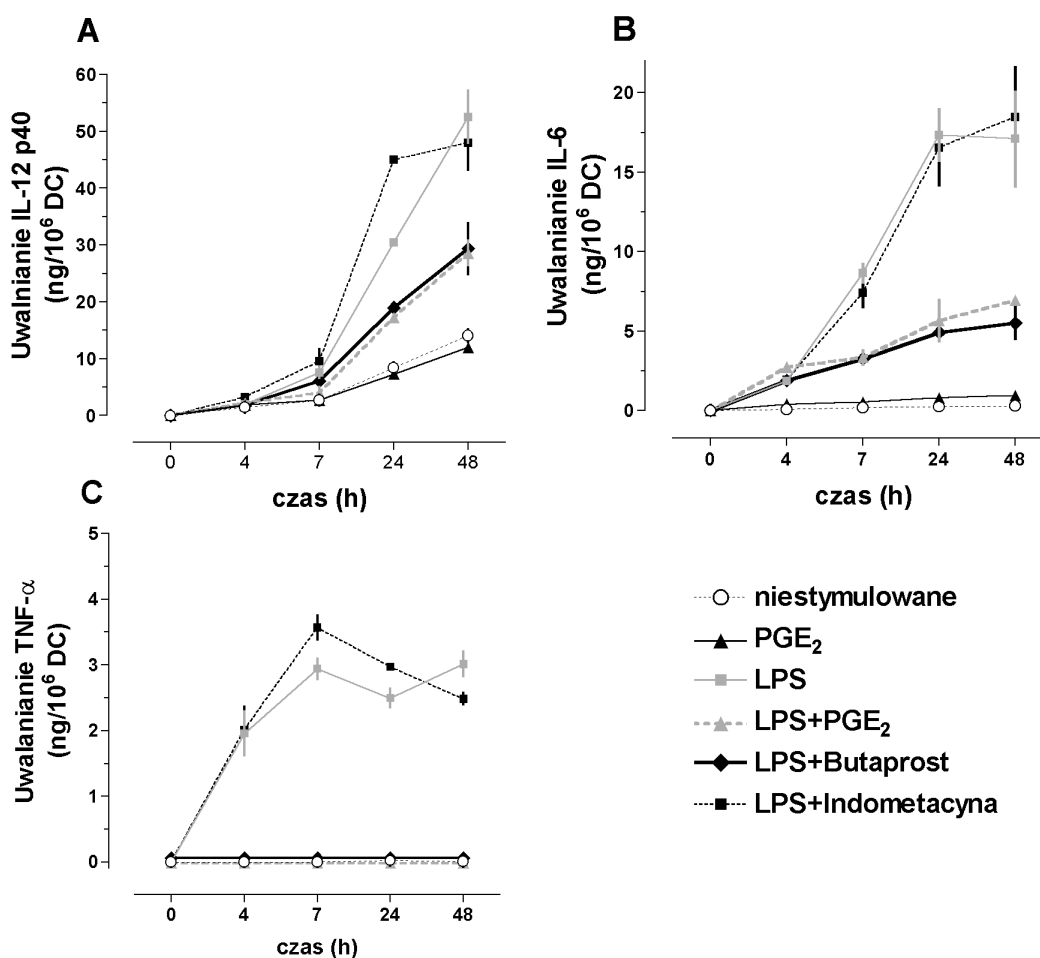
4.3 Wpływ endogennej vs egzogennej PGE₂ na syntezę cytokin przez aktywowane DC



Ryc. 4.5 Wpływ inhibitorów COXs na produkcję prozapalnych cytokin przez DC stymulowane LPS

Komórki hodowano w 96-dółkowych płytkach w zagęszczeniu 5×10^5 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) w obecności LPS (100 ng/mL) oraz różnych stężeniach indometacyny (inhibitor COX-1 i COX-2) lub rofekoksybu (inhibitor COX-2). Po około 24 godzinach w zebranych nadsączkach oznaczono stężenie cytokiny metodą ELISA. Punkty przedstawiają uśrednione wyniki \pm błąd średni z 3-4 niezależnych eksperymentów.

Zastosowanie inhibitorów syntezy endogennych PGs, indometacyny i rofekoksybu podczas stymulacji DC przy pomocy LPS nie miało wpływu na poziom akumulacji prozapalnych cytokin IL-12 p40, IL-6 czy TNF- α w nadsączach z 24-godzinnych hodowli. Jedynie indometacyna hamowała uwalnianie TNF- α w mikromolowych stężeniach ($IC_{50} = 600$ nM; **Ryc. 4.5**), znacznie wyższych niż wymagane do zahamowania syntezy PGs ($IC_{50} = 17$ nM; **Ryc. 4.1B**). Wyniki te wskazują, że endogenne PGs nie są zaangażowane w proces autoregulacji stymulowanej przez LPS produkcji cytokin w DC.



Ryc. 4.6 Przebieg czasowy uwalniania prozapalnych cytokin przez DC stymulowane LPS

Komórki hodowano w 24-dołkowych płytkach w zagęszczeniu 5×10^5 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) w obecności LPS (100 ng/mL), PGE₂ (10 μ M), butaprostu (10 μ M) i indometacyny (5 μ M). W zbieranych, w odpowiednich punktach czasowych, nadsączach mierzono poziomy wybranych cytokin metodą ELISA. Wykresy przedstawiają wyniki dla jednego z 3 reprezentatywnych doświadczeń, gdzie punkty są wyrażone jako średnia z 3 powtórzeń, a słupki błędów są w postaci odchylenia standardowego.

W przeciwieństwie do endogennych, egzogenna PGE₂ silnie wpływała na syntezę cytokin stymulowaną LPS w DC. Podobnie, podanie swoistego receptorowo analogu PGE₂ (butaprostu), efektywnie hamowało produkcję prozapalnych cytokin w hodowli 48-godzinnej. Natomiast ponowne zastosowanie indometacyny (5 µM) nie wpływało na uwalnianie zarówno IL-12 p40, IL-6 jak i TNF-α (Ryc. 4.6, Tab. 4.1).

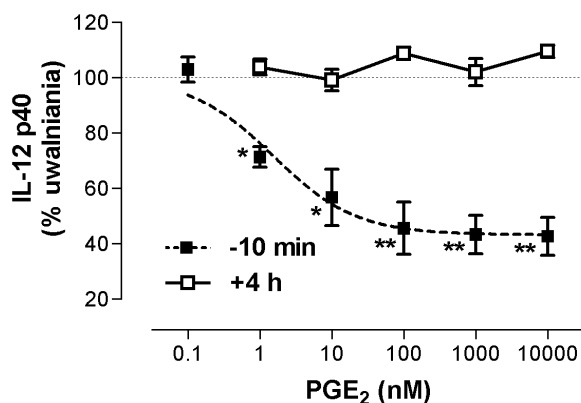
Tabela 4.1 Wpływ PGE₂ na akumulację cytokin w nadsączach z hodowli DC stymulowanych LPS

Cytokiny	PGE ₂ dodana 10 min przed LPS		PGE ₂ dodana 4 godziny po LPS	
	Maksymalny efekt zahamowania	N	Maksymalny efekt zahamowania	N
	(%)		(%)	
IL-12 p40	61 ± 8	(6)	Brak wpływu	(3)
IL-12 p40 (+INDO)	73 ± 21	(2)	Brak wpływu	(2)
IL-6	52 ± 6	(7)	19 ± 3	(2)
IL-6 (+INDO)	42	(1)	Nie badano	
TNF-α	98 ± 2	(5)	61	(1)
TNF-α (+INDO)	95	(1)	Nie badano	

Komórki hodowano w 96-dołkowych płytkach w zagęszczeniu 5×10^5 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) w obecności LPS (100 ng/mL), PGE₂ (0.01 nM – 10 µM) oraz indometacyny (5 µM). Po 24 godzinach w zebranych nadsączach oznaczono stężenie cytokin metodą ELISA. Wyniki przedstawiono jako średnią ± błąd średni, a w nawiasach podano liczbę niezależnych doświadczeń.

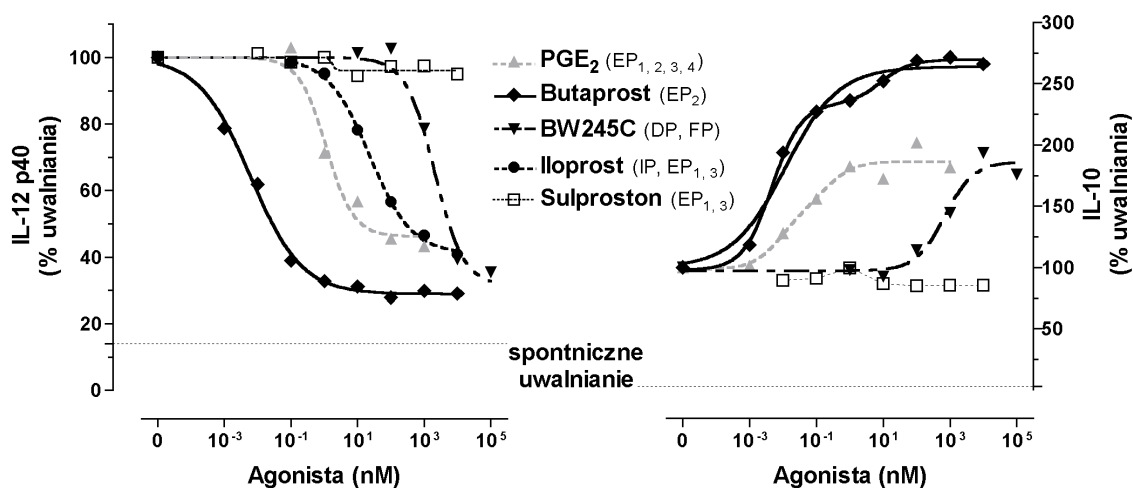
Ryc. 4.7 Efekt czasu podania PGE₂ na poziom uwalniania cytokiny IL-12 p40

Komórki (5×10^5 /mL) hodowano 24 godziny w pożywce (5% FCS w RPMI 1640) w obecności PGE₂ (0.1 nM – 10 µM) dodawanej 10 minut przed lub 4 godziny po stymulacji LPS (100 ng/mL), po czym w zebranych nadsączach oznaczono stężenie cytokin metodą ELISA. Punkty przedstawiają uśrednione wyniki z 2 do 6 doświadczeń ± błąd średni, gdzie * p < 0.05, ** p < 0.01.



Wykazano zależny od dawki PGE₂ wpływ na aktywność wydzielniczą DC, stymulowanych LPS. PGE₂ dodawana do hodowli hamowała uwalnianie IL-12p40 (maksymalnie zahamowanie ~60%), IL-6 (~50%) oraz TNF- α (całkowite zahamowanie), z wartościami IC₅₀ w przedziale od 1 do 7 nM. Silnie hamujący efekt obserwowano jedynie wówczas, gdy PGE₂ była obecna w początkowej fazie aktywacji DC (10 minut przed stymulacją LPS). Natomiast późniejsze podanie PGE₂ (po 4 godzinach od stymulacji LPS) wykazywało znacznie słabszy wpływ na produkcję IL-6 (~20%) i TNF- α (~60%) i nie miało wpływu na produkcję IL-12 p40 (odpowiednio, **Tab. 4.1** i **Ryc. 4.7**).

4.4 Wpływ specyficznych agonistów dla receptorów prostanoidów na poziom uwalniania cytokin przez stymulowane DC



Ryc. 4.8 Wpływ wybranych agonistów receptorów dla prostanoidów na produkcję cytokin IL-12 p40 oraz IL-10 w DC stymulowanych LPS

Komórki ($5 \times 10^5/\text{mL}$) hodowano przez 24 godziny w pożywce (5% FCS w RPMI 1640) w obecności agonistów, w zakresie stężeń od 0.001 nM do 100 μM , dodawanych 10 minut przed LPS (100 ng/mL). Następnie w zebranych nadsączach oznaczono stężenie cytokin metodą ELISA. Wyniki przedstawiono procentowo, gdzie za 100 % uwalniania cytokin przyjęto kontrolę stymulowaną samym LPS, a punkty wyrażone są jako średnia z 2 do 6 niezależnych doświadczeń, dla których przeprowadzono regresję nieliniową.

Opisano do tej pory cztery główne typy receptorów dla PGE₂, będące produktami różnych genów, o różnym powinowactwie do PGE₂ (EP₁ = 20, EP₂ = 12, EP₃ ≈ 1, EP₄ ≈ 2 nM) i mechanizmie transdukcji sygnału [10]. Sulproston, selektywny agonista mysich receptorów EP₁ i EP₃, w szerokim zakresie stężeń (0.01 nM – 10 μM) nie wpływał statystycznie istotnie na uwalnianie IL-12 p40 i IL-10 (**Ryc. 4.8**) oraz IL-6 i TNF-α (wyników nie pokazano). W przeciwieństwie do sulprostonu, butaprost, selektywny agonista mysiego receptora EP₂, silnie hamował uwalnianie IL-12 p40, IL-6 oraz zwiększał poziom IL-10 w nadsączach z hodowli DC stymulowanych LPS (**Ryc. 4.8, tab. 4.2**).

Tabela 4.2 Wpływ agonistów receptorów dla prostanoidów na akumulację cytokin w nadsączach z hodowli DC stymulowanych LPS

Agonista	Cytokiny		Maksymalny efekt zahamowania (↓) lub stymulacji (↑) uwalniania (%)	
Butaprost - EP ₂	IL-6	(4)	↓	59 ± 15
	IL-12 p40	(3)	↓↓↓	91 ± 8
	IL-10	(4)	↑↑↑	245 ± 91
BW245C - DP, FP	IL-6	(3)	↓	61 ± 11
	IL-12 p40	(3)	↓↓	80 ± 14
	IL-10	(3)	↑↑	100 ± 27
Iloprost - IP, EP _{1,3}	IL-6	(2)	↓	64 ± 6
	IL-12 p40	(2)	↓↓	66 ± 3
	TNF-α	(2)	↓↓↓	96 ± 1

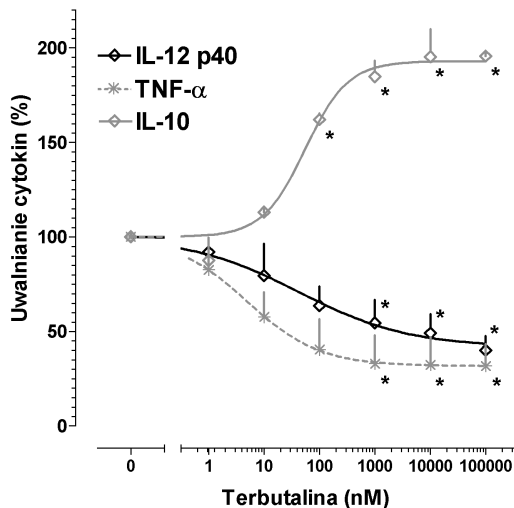
Komórki (5 x 10⁵/mL) hodowano w pożywce (5% FCS w RPMI 1640) i stymulowano LPS (100 ng/mL) w obecności butaprostu (0.001 nM – 10 μM), iloprostu (0.1 nM – 10 μM) oraz BW245C (1 nM – 10 μM) (agonistów dodawano 10 minut przed LPS). Po 24 godzinach w zebranych nadsączach oznaczono stężenie cytokin metodą ELISA. Wyniki są przedstawione jako średnią ± błąd średni, a w nawiasach podano liczbę niezależnych doświadczeń.

Butaprost działała już w bardzo niskich, pikomolowych stężeniach, z wartościami EC₅₀ w zakresie 0.02 – 0.05 nM. Dodatkowo, w większości doświadczeń obserwowano dwufazowy wpływ butaprostu na produkcję IL-10, a ponadto silniej niż PGE₂ hamował on uwalnianie IL-12 p40 (61% vs 91%; p<0.05). Wyniki te sugerują, że w DC butaprost działa na więcej niż jeden typ receptorów lub wykazuje wyższe powinowactwo receptorowe.

Powyższe wyniki wskazują, że egzogenna PGE₂ wpływa na produkcję cytokin w DC przy udziale receptorów EP₂, ale nie EP₁ i EP₃. W dalszej części postanowiliśmy zweryfikować możliwość regulacji stymulowanej przez LPS produkcji cytokin w DC przez pozostałe główne typy receptorów dla PGs. BW245C jest agonistą mysich receptorów DP (receptor dla PGD₂) [59] oraz FP (receptor dla PGF₂α) [10]. Podobnie jak PGE₂, BW245C hamował w sposób zależny od dawki produkcję IL-12 p40 i IL-6 i nasilał produkcję IL-10, dla EC₅₀ z zakresu 475-2160 nM (**Ryc. 4.8, tab. 4.2**). Brak wpływu selektywnego agonisty receptorów FP fluprostenolu (wyników nie pokazano), świadczy, że w działaniu butaprostu być może pośredniczą receptory DP, a nie FP.

Podobny efekt zahamowania produkcji cytokin prozapalnych przez stymulowane DC w zakresie EC₅₀ od 5-22 nM zaobserwowano przy użyciu iloprostu (analog PGI₂, agonista receptorów IP, EP₁, i EP₃) [10], przy czym całkowity brak wpływu sulprostonu (selektywny agonista EP₁ i EP₃) wskazuje na jedyną rolę receptora IP w regulacji produkcji cytokin w DC przez iloprost (**Ryc. 4.8, tab. 4.2**).

Uzyskane do tej pory wyniki świadczą, że w DC produkcja cytokin regulowana jest jedynie przez receptory prostaglandynowe sprzężone z aktywacją cyklicznej adenylowej. W celu weryfikacji roli cyklicznej adenylowej i generowanego przez nią cyklicznego AMP (cAMP) w regulacji produkcji cytokin przez PGs, zbadano wpływ selektywnego agonisty receptorów β₂-adrenergicznych – terbutaliny, związku podnoszącego poziom cAMP w komórce. Podobnie jak aktywnie biologicznie prostanoidy (PGE₂, butaprost, BW245C oraz iloprost), terbutalina hamowała produkcję prozapalnych cytokin: IL-12 p40 i TNF-α, i zwiększała produkcję IL-10 (**Ryc. 4.9**).

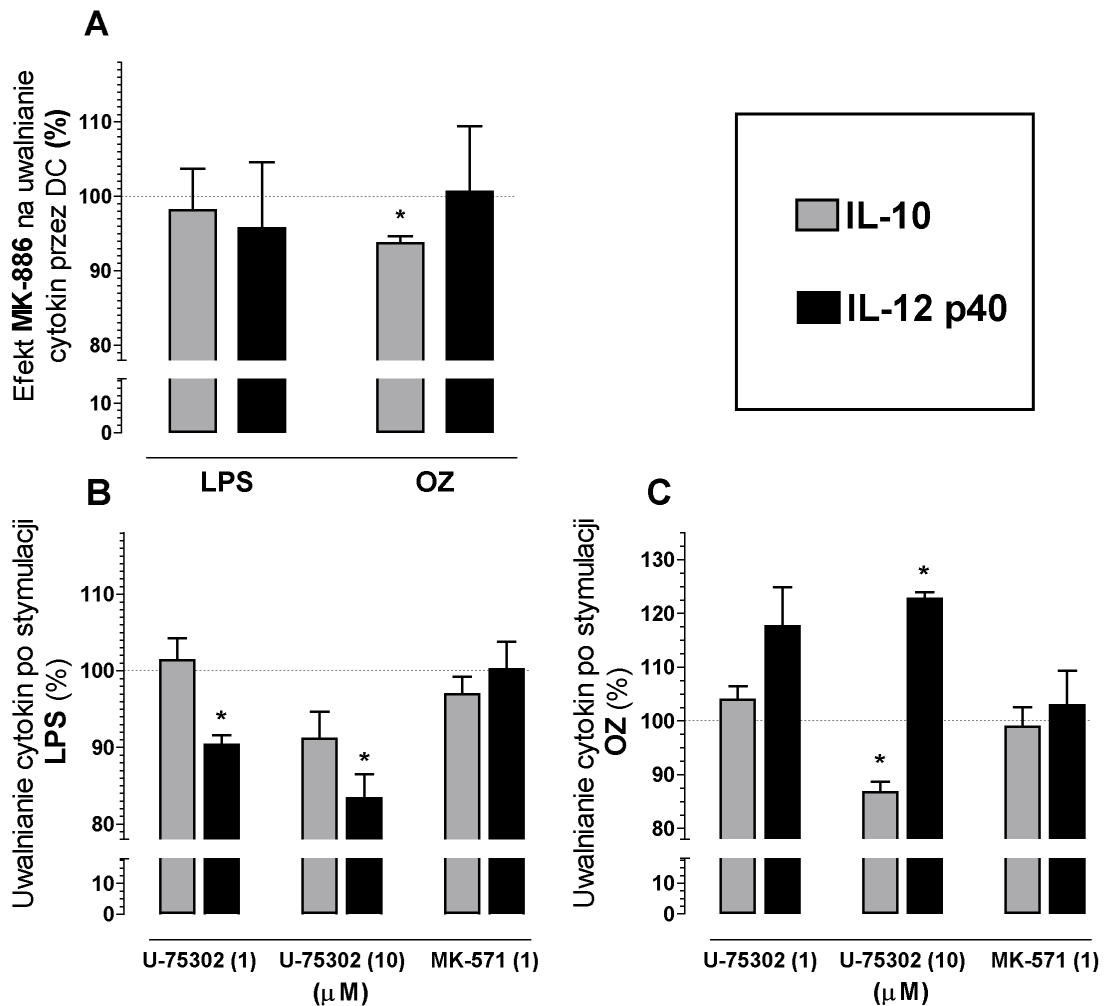


Ryc. 4.9 Wpływ agonisty receptora β 2-adrenergicznego (terbutaliny), podnoszącego poziom cAMP na profil cytokin uwalnianych przez DC stymulowane LPS

Komórki ($5 \times 10^5/\text{mL}$) hodowano w pożywce (5% FCS w RPMI 1640) w obecności terbutaliny (1 nM – 100 μM) dodawanej 10 minut przed LPS (100 ng/mL). Po 24 godzinach w zebranych nadsączach oznaczono stężenie cytokin metodą ELISA. Wyniki są przedstawione procentowo, gdzie za 100 % uwalniania cytokin przyjęto kontrolę stymulowaną samym LPS. Punkty na wykresie przedstawiają uśrednione wyniki \pm błąd średni z 2 do 3 niezależnych doświadczeń, dla których przeprowadzono regresję nieliniową (* $p < 0.05$, t-test).

4.5 Wpływ endo- vs egzogennych LTs na syntezę cytokin przez stymulowane DC

Zahamowanie endogennej produkcji LTs przy użyciu MK-886 w niewielkim stopniu, choć istotnie statystycznie, obniżało uwalnianie IL-10 (o 6.3 ± 0.92 %, $n = 5$, $p = 0.002$) po stymulacji OZ podczas, gdy nie zaobserwowano takiego wpływu na DC stymulowane LPS, nie syntetyzujących LTs (**Ryc. 4.10A**). Podobny efekt obserwowano po zastosowaniu U-75302, specyficznego antagonisty receptora BLT_1 dla LTB_4 [20]. DC stymulowane OZ w obecności 10 μM stężenia U-75302 uwalniały o 13.1 ± 1.68 % ($p = 0.0002$, $n = 7$) mniej IL-10. Ponadto U-75302 podnosił produkcję IL-12 p40 o 25.6 ± 2.94 % ($p = 0.001$, $n = 5$) w DC stymulowanych OZ, a obniżał produkcję IL-12 p40 DC traktowanych LPS. Jedną z przyczyn paradoksalnego wpływu U-75302 na stymulowaną przez LPS produkcję IL-12 p40 mogą być jego właściwości częściowego agonisty, ujawniające się przy braku syntezy endogennych LTs w DC stymulowanych LPS (**Ryc. 4.10B i C**) [20].



Ryc. 4.10 Wpływ MK-886 (inhibitor FLAP), U-75302 (antagonista BLT₁), MK-571 (antagonista cysLT₁) na poziom uwalniania IL-12 p40 i IL-10 przez DC stymulowane LPS lub OZ

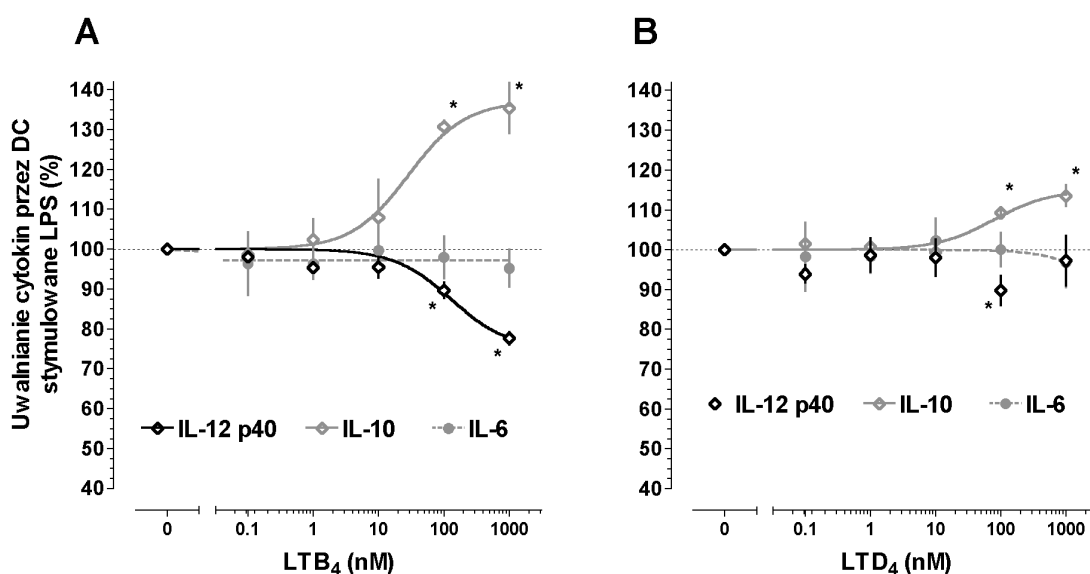
Komórki hodowano w 96-dołkowych płytkach w zagęszczeniu 5×10^5 DC/mL pożywki (5% FCS w RPMI 1640) w obecności MK886, U-75302, MK-571, do których dodawano 20 minut przed stymulacją LPS (0.2 μ g/mL) lub OZ (0.2 mg/mL). Po 20 godzinach w zebranych nadsączach oznaczano cytokiny metodą ELISA. Słupki przedstawiają uśrednione procentowe wyniki \pm błąd średni z 3 do 10 niezależnych doświadczeń. Za 100% uwalniania cytokin przyjęto kontrolę stymulowaną LPS lub OZ. (* $p < 0.05$, t-test).

Użycie MK571, swoistego antagonisty receptora CysLT₁, który, jak pokazano u myszy, jest głównym, o ile nie jedynym receptorem pośredniczącym w prozapalnym działaniu CysLTs [60, 61], nie miało wpływu na profil uwalnianych cytokin przez DC stymulowane zarówno LPS jak i OZ (Ryc. 4.10B i C).

Powyższe wyniki sugerują, że jednym z mechanizmów wpływających na różnice w poziomach uwalniania IL-10 i IL-12 p40 przez DC stymulowane OZ i LPS, wydaje się być obecność LTs. Przez zastosowanie swoistych antagonistów pokazano, że na efekt ten składa się

głównie sygnalizacja poprzez receptor BLT₁, natomiast blokowanie receptora CysLT₁ nie wykazało statystycznie istotnych różnic. Dlatego wydaje się, że za wyższą produkcję IL-10 i niższą produkcję IL-12 p40 w DC traktowanych OZ, w porównaniu do DC stymulowanych LPS, odpowiada częściowo LTB₄.

Aby potwierdzić rolę LTs w modulacji uwalniania cytokin, zbadano wpływ egzogennych LTB₄ i LTD₄ na stymulowaną przez LPS produkcję cytokin w DC (**Ryc. 4.11**). Egzogenne LTB₄ w zależności od dawki obniżało produkcję IL-12 p40, maksymalnie o 22 ± 1.5 % w stężeniu 1 μM (n = 5, p < 0.001; EC₅₀ = 130 ± 22 nM), natomiast podnosił poziom IL-10 w nadsączach z hodowli o 39 ± 5.5 % (n = 7, p < 0.001; EC₅₀ = 36 ± 10 nM) (**Ryc. 4.11A**). LTD₄ wydaje się być znacznie słabszym modulatorem uwalniania cytokin przez DC stymulowane LPS, gdyż jedynie statystycznie istotnie i zależnie od dawki wpływał na poziom uwalniania IL-10, podnosząc jej poziom o 14 ± 2.6 % (n = 3, p < 0.05; EC₅₀ = 76 ± 2 nM) (**Ryc. 4.11B**). Natomiast zarówno LTB₄ jak i LTD₄ nie wpływał na poziom uwalniania IL-6 (**Ryc. 4.11A i B**).

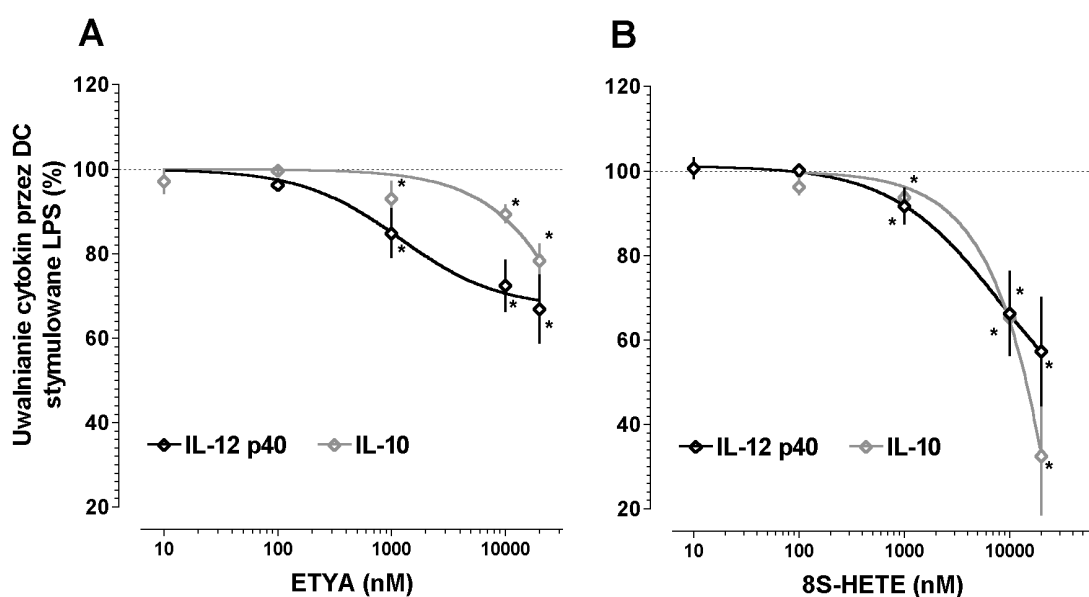


Ryc. 4.11 Wpływ egzogennego LTB₄ i LTD₄ na profil cytokin uwalnianych przez DC stymulowane LPS

Komórki (5×10^5 /mL) hodowano w pożywce (5% FCS w RPMI 1640) w obecności LTB₄ (**A**) lub LTD₄ (**B**) (0.1 nM – 1 μM) dodawanych 20 minut przed LPS (200 ng/mL). Po 20 godzinach w zebranych nadsączach oznaczono stężenie cytokin metodą ELISA. Punkty, dla których przeprowadzono regresję nieliniową, przedstawiają uśrednione procentowe wyniki ± błąd średni z 4 do 7 niezależnych doświadczeń. Za 100% uwalniania cytokin przyjęto kontrolę stymulowaną LPS (* p < 0.05, t-test).

Antagoniści cysLT₁ mogą działać również poprzez jądrowe receptory, tzw. receptory dla

aktywatorów proliferacji peroksysomów PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) [62], wywołując ogólnie efekt hamujący na aktywowane komórki układu immunologicznego [63]. Jeden z typów PPARs – PPAR- α wydaje się być też jądrowym receptorem dla LTB₄. W DC stymulowanych LPS agoniści/aktywatory PPAR- α , ETYA oraz 8S-HETE, hamują uwalnianie zarówno IL-12 p40 jak i IL-10 w (Ryc. 4.12).



Ryc. 4.12 Wpływ aktywatorów PPAR α na profil cytokin uwalnianych przez DC stymulowane LPS

Komórki (5×10^5 /mL) hodowano w pożywce (5% FCS w RPMI 1640) w obecności ETYA (**A**) lub 8S-HETE (**B**) (10 nM – 20 μ M) dodawanych 20 minut przed LPS (200 ng/mL). Po 20 godzinach w zebranych nadsączach oznaczono stężenie cytokin metodą ELISA. Punkty, dla których przeprowadzono regresję nieliniową, przedstawiają uśrednione procentowe wyniki \pm błąd średni z 4 do 7 niezależnych doświadczeń. Za 100% uwalniania cytokin przyjęto kontrolę stymulowaną LPS (* $p < 0.05$, t-test).

V. Dyskusja

Komórki dendrytyczne (*dendritic cells*, DC), główne komórki prezentujące antygen odgrywają centralną rolę w indukcji i polaryzacji pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Ich funkcje są kontrolowane na drodze autokrynej przez takie mediatory, jak cytokiny, prostanoidy czy leukotrieny. Poznanie mechanizmów działania tych mediatorów i ich roli w funkcjonowaniu komórek DC jest jednym z ważniejszych problemów współczesnej immunologii oraz przedmiotem intensywnych badań.

W naszych badaniach udało się wykazać, że stymulowane LPS lub/i IFN- γ DC pochodzenia szpikowego, w przeciwieństwie do niestymulowanych, uwalniają znaczne ilości PGE₂, a dzięki zastosowaniu rofekoksybu i indometacyny, specyficznych inhibitorów COXs wykazano, że w produkcję PGE₂ zaangażowana jest indukowalna forma COX (COX-2). Nasze wyniki są zgodne z niedawnymi doniesieniami literaturowymi Harrizi i wsp., wg których stymulacja LPS i zastosowanie selektywnych inhibitorów COX-1 i COX-2 dowodzi przede wszystkim udziału COX-2 w produkcji PGE₂, pomimo obecności – COX-1 w niestymulowanych DC [48]. Oprócz PGE₂, stymulowane DC uwalniają również znaczne ilości leukotrienów (LTs), przy czym w naszym modelu doświadczalnym, jedynie opsonizowany zymosan (OZ) oraz znane aktywatory uwalniania LTB₄ przez makrofagi i DC, takie jak jonofor wapnia i PMA, pozwalały uzyskać wykrywalne ilości LTs [17, 44]. Nie udało się natomiast zastymulować w naszych warunkach DC do produkcji LTs samym LPS, nawet w 24 godzinnej hodowli (wyników nie pokazano), co nie jest zgodne z wynikami Harrizi i wsp. [48]. Wydaje się, że LPS jest ogólnie słabym stymulatorem syntezy LTs w takich komórkach, jak neutrofile [56, 64] czy makrofagi otrzewnowe [65], natomiast dobrze reagowały na ten czynnik ludzkie makrofagi płucne [66]. Harrizi i wsp. w swoim modelu doświadczalnym, oprócz GM-CSF, stosowali dodatkowo IL-4 w hodowli DC pochodzenia szpikowego, a w doświadczeniach do stymulacji DC użyli LPS w

stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (w naszym doświadczeniu było to 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [45, 48]. Prawdopodobnie na odmienną reaktywność DC pod wpływem LPS miały wpływ zróżnicowane metody hodowli DC zastosowane w doświadczeniach, dlatego wymaga to dalszych badań, ponieważ wciąż jest niewiele prac na ten temat.

Warto zwrócić uwagę, że zdolność syntezy leukotrienów jest bardzo restrykcyjna i ograniczona do zaledwie kilku typów komórek pochodzenia mieloidalnego, takich jak mastocyty (komórki tuczne), bazofile, eozynofile czy neutrofile. Dodatkowo, niektóre z nich, jak np. neutrofile, wykazują ekspresję tylko 5-LO i produkcję LTB_4 , natomiast nie wykazują syntezy cysLTs [60].

Jako pierwsi wykazaliśmy, że DC, oprócz syntetyzowania LTB_4 , produkują również znaczne ilości cysLTs, pod wpływem OZ czy jonoforu wapnia. Machida i wsp. udowodnili ponadto, że niewielka produkcja cysLT zachodzi również w DC stymulowanych ekstraktem roztoczy kurzu domowego – *Dermatophagoides farinae*, i że produkowane przez DC leukotrieny odgrywają istotną rolę w mysim modelu astmy oskrzelowej [41]. Mianowicie, u myszy immunizowanych donosowo DC inkubowanymi z ekstraktem *Dermatophagoides farinae* z zastosowaniem antagonistów receptorów cysLTs obserwowano znacznie łagodniejszy przebieg astmy oskrzelowej po powtórным podaniu tego samego antygeny. Również Okunishi i wsp. w mysim modelu astmy wywołanej ovalbuminą, dzięki zastosowaniu antagonistów receptorów cysLTs w trakcie immunizacji myszy ovalbuminą, uzyskali znaczne zahamowanie rozwoju tej choroby [46].

W naszych badaniach zauważyliśmy ciekawą właściwość DC. O ile COX-2 i jego produkty wymagają pewnego czasu na indukcję i syntezę od zadziałania bodźca (około 4 godzinny, **Ryc. 4.2**), to 5-LO jest już obecna w niestymulowanych DC (wyników nie pokazano), gotowa do produkcji substratów do syntezy leukotrienów. Dane te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, gdzie wykazano, że ludzkie DC hodowane w koktajlu cytokin GM-CSF i $\text{TNF-}\alpha$

już po 5 dniach wykazywały obecność 5-LO oraz białka aktywującego lipoksygenazę-5 (*five-lipoxygenase activating protein*, FLAP), a TGF- β_1 dodatkowo wzmacniał ten efekt [17]. Obecność enzymów syntezy LTs już w niestymulowanych komórkach wyjaśnia akumulację wysokiego poziomu LTB₄ i cycLTs w nadsączach z hodowli już po 40 minutach od zadziałania bodźca (**Ryc. 4.3A i B**). Oprócz tego, przez zastosowanie swoistych inhibitorów kompleksu 5-LO/FLAP (MK-886, AA-861, 15(S)-HETE) (**Ryc. 4.3C**), którego powstanie jest niezbędne w syntezie LTs, potwierdziliśmy farmakologicznie, że to właśnie 5-LO odpowiada za produkcję LTs w mysich DC pochodzenia szpikowego. Natomiast zablokowanie szlaku COXs nie miało wpływu na poziom produkcji LTs w 24-godzinnej hodowli.

Podczas stymulacji DC przy pomocy LPS i OZ poza eikozanoidami powstaje również szereg cytokin pro- (IL-6, TNF- α , IL-12) oraz przeciwzapalnych (IL-10). Co istotne, proporcje w poziomie uwalniania pomiędzy cytokinami są wyraźnie różne w zależności od użytego aktywatora, LPS vs OZ (**Ryc. 4.4**). Szczególnie istotna wydaje się być różnica pomiędzy IL-12 (cytokina odpowiedzialna za polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1), a IL-10 (cytokina odpowiedzialna za Th2), gdzie LPS silniej stymulował IL-12, a OZ IL-10.

Pojawia się pytanie, czy prostanoidy i leukotrieny mogą w sposób auto- lub parakryny modułować profil uwalnianych cytokin przez aktywowane DC, a w konsekwencji decydować o charakterze odpowiedzi immunologicznej (Th1 czy Th2).

Na początku wykazaliśmy, że egzogenicznie podana PGE₂, jak również niektóre ze swoistych agonistów receptorów dla prostanoidów podnoszą poziom cytokin przeciwzapalnych, a hamują produkcję prozapalnych, co potwierdzają również inne badania (**Ryc. 4.8, Tab. 4.1**) [29, 30, 67, 68]. Ponieważ poziom endogennej PGE₂ w hodowli osiągał wartości, przy których dla egzogennej PGE₂ obserwowaliśmy skutki ich działania, postanowiliśmy zbadać, czy endogenna produkcja PGE₂ w sposób autokryny może wpływać na profil uwalnianych cytokin przez aktywowane DC. Przy użyciu indometacyny, inhibitora COX-1 i COX-2 oraz selektywnego

inhibitora COX-2, rofekoksybu wykazaliśmy, że zarówno dla różnych stężeń inhibitorów (**Ryc. 4.5**), jak również dla różnego czasu działania (**Ryc. 4.6**) zablokowanie endogennej produkcji prostanoidów nie miało istotnego wpływu na poziom uwalnianych cytokin prozapalnych. Podobny brak wpływu inhibitorów COXs, przy zablokowaniu endogennej syntezy PGs, na dojrzewanie ludzkich DC pochodzenia szpikowego uzyskał Matasic i wsp. (mierzone poziom ekspresji CD83 oraz produkcji IL-12 p40) [69]. Nasze wyniki potwierdzone zostały ostatnio przez Vassiliou i wsp. [33]. Autorzy ci wykazali na mysich DC pochodzenia szpikowego hodowanych tylko w obecności GM-CSF, że jedynie egzogenna PGE₂ i butaprost skutecznie hamują uwalnianie i kumulację TNF- α , zarówno w hodowli *in vitro*, jak również *in vivo*, podczas gdy endogenne PGs wydają się nie odgrywać roli. Dane te różnią się od wyników Harizi i wsp., gdzie zastosowanie selektywnych inhibitorów COX w trakcie stymulacji LPS wyraźnie zmniejszało uwalnianie IL-10, natomiast dramatycznie rósł poziom IL-12 [48]. Niewątpliwie różnice te wynikają z faktu, że nasze DC produkowały zdecydowanie mniej IL-10 po stymulacji LPS (około 10-15 razy mniej, 100 pg/mL vs 1500 pg/mL). Ponadto, nasze DC zbierano do doświadczeń już 7. dnia, natomiast Harizi i wsp. używali DC 10-dniowych, dodatkowo hodowanych w obecności IL-4, a więc bardziej zróżnicowanych i dojrzalszych. Przy niskim poziomie IL-10, gdzie to właśnie ta cytokina, według Harizi i wsp., pełni kluczową rolę w regulacji profilu uwalnianych cytokin przez DC, mogliśmy nie zaobserwować istotnych różnic dla endogennej PGE₂, która pojawia się zbyt późno, aby zadziałać autokrynnie [48, 70]. Dlatego efekt przeciwzapalny obserwowaliśmy jedynie, gdy PGE₂ była dodawana do DC 10 minut przed stymulacją LPS (**Ryc. 4.6, 4.7, Tab. 4.1**). Natomiast, gdy PGE₂ podawaliśmy do hodowli DC po 4 godzinach od stymulacji LPS, uzyskiwaliśmy znacznie słabszy efekt zahamowania uwalniania cytokin prozapalnych, porównywalny do efektu zablokowania produkcji endogennej PGE₂.

Podsumowując, w naszym modelu doświadczalnym *in vitro* endogenne PGs nie wpływają

w sposób autokryny na poziom cytokin prozapalnych, produkowanych przez stymulowane DC. Wydaje się, że produkcja PGs rozpoczyna się zbyt późno, aby osiągać wystarczające stężenie, mogące wpływać na DC. Być może również komórki DC są wrażliwe na PGs jedynie w początkowej fazie stymulacji LPS. Skoro produkcja cytokin *in vitro* nie podlega autoregulacji przez endogenne prostanoidy, a jedynie egzogenna PGE₂ w początkowej fazie aktywacji DC przez LPS hamowała produkcję prozapalnych cytokin, to być może *in vivo*, w warunkach odczynu zapalnego, rezydujące niedojrzałe DC podlegają reżimowi prostanoidów i cytokin uwalnianych głównie z sąsiadujących komórek na drodze parakrynej. Taką właśnie ciekawą koncepcję w 2003 roku zaproponował Morelli i Thomson, którzy stwierdzili, że we wczesnym etapie zapalenia uszkodzone komórki danej tkanki, mediatory pochodzenia bakteryjnego, jak LPS oraz naciekające neutrofile uwalniają cytokiny prozapalne (IL-1 α , TNF- α i IL-6) oraz prostanoidy (PGE₂, PGD₂ i 15-deoksy-PGJ₂), które silnie wpływają na rezydujące w tkankach DC, powodując ich dojrzewanie i migrację do lokalnych węzłów chłonnych [71]. Tam, w zależności od koktajlu czynników, w jakich DC zostały „wykapanie” w dalszej kolejności zostaje podjęta decyzja o rodzaju odpowiedzi immunologicznej, Th1 *versus* Th2 lub Th1 i Th2, lub jej zaniechaniu [72, 73].

Opierając się na badaniach farmakologicznych i danych z klonowania receptorów za pomocą cDNA wyodrębniono kilka typów receptorów dla prostanoidów występujących również na komórkach dendrytycznych (**Tab. 1.1**). W celu sprawdzenia profilu farmakologicznie czynnych receptorów dla PGs w DC z naszej hodowli, zastosowaliśmy szereg syntetycznych, swoistych agonistów dla poszczególnych receptorów. Pokazaliśmy, że przy zastosowaniu selektywnych agonistów dla receptorów EP₂, DP i IP, a więc związanych z aktywacją cykazy adenylowej i wzrostem wewnątrz-komórkowego cAMP, DC stymulowane LPS zależnie od dawki uwalniały mniej cytokin prozapalnych, natomiast więcej IL-10 po stymulacji receptorów EP₂ i DP. Zastosowanie sulprostonu i fluprostenolu nie wpłynęło istotnie

na DC, co implikuje brak zaangażowania receptorów EP₁, EP₃ oraz FP w modulację profilu uwalnianych cytokin przez DC stymulowane LPS. Wyniki te są zgodne z danymi Harizi i wsp. oraz Vassiliou i wsp., którzy wykazali, że LPS wzmacnia ekspresję receptorów EP₂ i EP₄ na powierzchni DC, pochodzących z komórek szpiku hodowanych w obecności GM-CSF i IL-4 lub tylko GM-CSF, natomiast nie wpływa na poziom ekspresji EP₁ i EP₃, a w proces ten prawdopodobnie jest zaangażowana endogenna PGE₂ [33, 45]. Podobnie jak w naszych doświadczeniach, zastosowanie selektywnych agonistów receptorów EP₁ i EP₃ nie wpływało na DC, tak więc rola tych receptorów wciąż pozostaje nieznana – być może stanowią one przeciwwagę dla pary receptorów EP₂ i EP₄ ze względu na to, że EP_{3A} obniża poziom cAMP. Jednocześnie, nasze wyniki sugerują ekspresję na DC funkcjonalnych receptorów dla PGD₂, co w istotny sposób odróżnia te komórki od monocytów/makrofagów stymulowanych LPS [74].

Ze względu na brak komercyjnie dostępnego agonisty dla receptora EP₄ nie udało nam się w sposób bezpośredni wykazać jego wpływu na DC. Zastosowanie butaprostu w podobnym, a nawet większym od PGE₂ stopniu hamowało produkcję IL-12 p40 oraz IL-6. Koinkubacja DC z PGE₂ (1 μM) oraz butaprostem (1 μM) nie przyczyniła się do addytywnego zahamowania produkcji cytokin prozapalnych (wyników nie pokazano), co dodatkowo sugeruje, że w naszym modelu badawczym receptor EP₄ nie jest zaangażowany w negatywną regulację uwalniania prozapalnych cytokin lub, że jego niska aktywność jest maskowana przez EP₂. Wniosek ten pokrywa się z wynikami badań *in vitro* na ludzkich komórkach DC pochodzenia szpikowego, gdzie swoisty agonista receptora EP₄ w mniejszym stopniu wpływał na komórki [75]. Natomiast badania *in vivo* u myszy dowodzą, że EP₄ jest przede wszystkim odpowiedzialny za migrację komórek Langerhansa z obwodowych tkanek do węzłów chłonnych [76]. Dodatkowo, receptor ten w komórkach Browicza-Kupffera jest silnie zaangażowany w negatywną regulację uwalniania TNF-α [77], a w innych badaniach na makrofagach otrzewnowych pokazano, że mRNA dla receptora EP₂ pojawia się dopiero po stymulacji LPS i bierze, łącznie z receptorem

EP₄, jako drugi sygnał, udział w negatywnej autoregulacji produkcji TNF- α pod wpływem LPS [79]. W przeciwieństwie do naszych wyników otrzymanych na mysich DC pochodzenia szpikowego, gdzie produkcja IL-6 była wyraźnie hamowana przez PGs, sygnalizacja przez receptory EP₂ i EP₄ w makrofagach jest kluczowym elementem w stymulacji uwalniania IL-6 [79, 80]. Badania na myszach z defektywnym receptorem EP₄, u których wywoływano reumatoidalne zapalenie stawów wykazują, że to właśnie ten receptor jest *in vivo* odpowiedzialny za pozytywną regulację poziomu IL-6 w surowicy, ponieważ tylko w przypadku jego braku obserwowano niski poziom IL-6 [81].

Ponieważ wpływ selektywnych agonistów obserwowaliśmy jedynie dla receptorów EP₂, DP i IP, zastosowaliśmy terbutalinę, agonistę receptora β 2-adrenergicznego, podobnie działającego poprzez białka G_s i stymulację cykazy adenylowej. Wyniki były porównywalne z wpływem agonistów receptorów dla PGs, dlatego wydaje się że wzrost wewnątrz-komórkowego cAMP jest głównym sygnałem w DC do zmiany profilu uwalnianych cytokin. Wyniki te potwierdzają badania Vassiliou i wsp. [33].

Choć nasze badania *in vitro* nie wykazały istotnego wpływu endogennych prostanoidów na profil uwalnianych cytokin, to silny wpływ zaobserwowaliśmy przy zastosowaniu egzogennej PGE₂. Wydaje się, więc że *in vivo* główną rolą PGE₂ produkowanej przez stymulowane DC oraz inne komórki obecne w miejscu zapalenia np. neutrofile czy makrofagi, jest wpływanie na naciekające komórki, a decydującą rolę w sygnalizacji dla PGE₂ u DC wydaje się pełnić receptor EP₂, natomiast rola EP₁, EP₃ i EP₄ wciąż wymaga wyjaśnienia.

Poza produkcją PGs, DC uwalniają również inne pochodne AA, zwłaszcza duże ilości leukotrienów, w krótkim czasie od zadziałania bodźca. Podobnie jak w przypadku PGE₂, postanowiliśmy sprawdzić, czy endogenne lub egzogenne LTs w czasie stymulacji mogą modulować profil cytokin produkowanych przez DC. W naszych badaniach wykazaliśmy, że zahamowanie endogennej produkcji LTs przy użyciu inhibitora 5-LO jedynie w niewielkim

stopniu hamowało produkcję IL-10 po stymulacji OZ. Ciekawy efekt natomiast obserwowaliśmy na poziomie receptorowym. Zastosowanie antagonisty receptora BLT₁ (U-75302) wyraźnie nasilało uwalnianie IL-12 p40 oraz lekko obniżało produkcję IL-10, jeśli DC stymulowano OZ, natomiast jeśli DC stymulowano LPS (w naszym modelu brak produkcji LTs), U-75302 nie wpływał na IL-10, a lekko hamował IL-12 p40 (**Ryc. 4.10**). Ponieważ nasze badania są pionierskie, trudno znaleźć w literaturze materiał porównawczy. Jedynie Harizi i wsp. wykazali, że DC stymulowane LPS produkują LTB₄, jednak w ich badaniach działo się to pod wpływem LPS [48]. Warto zwrócić uwagę, że badacze stosując w swoim modelu doświadczalnym inhibitor 5-LO, a nawet egzogenny LTB₄, nie uzyskali istotnego wpływu na poziom produkcji IL-12 p70 oraz IL-10, co jest niezgodne z naszymi wynikami. Ponadto DC, używane przez Harizi i wsp., spontanicznie uwalniały duże ilości IL-12 p70, natomiast po stymulacji LPS poziom ten paradoksalnie dramatycznie malał (z 1500 do ~300 pg/mL) [48]. W naszym układzie niestymulowane DC uwalniały tylko znaczne ilości IL-12 p40, natomiast nie produkowały IL-12 p70. Dopiero stymulacja LPS powodowała uwalnianie IL-12 p70, jednak wciąż na granicy oznaczalności. Wyniki te wydają się być zgodne z wieloma wcześniejszymi publikacjami, na podstawie których Abdi postuluje, że do produkcji IL-12 p70 składającej się z podjednostki p40 i p35, wymagany jest drugi sygnał pochodzący od innej komórki, np. interakcja CD40-CD40L lub IFN- γ [83].

Dodanie egzogenego LTB₄ do hodowli DC stymulowanych LPS wyraźnie hamowało produkcję IL-12 p40, nasiliło tworzenie IL-10, a nie miało wpływu na IL-6 (**Ryc. 4.11A**). We wpływie egzogenego LTB₄ na DC wydaje się pośredniczyć receptor BTL₁, gdyż zastosowanie antagonisty tego receptora blokowało efekt LTB₄. Ponieważ inhibitor syntezy LTs oraz antagonist receptoru BTL₁ wykazywały ponadto aktywność w przypadku stymulacji DC przez OZ, wydaje się, że endogenny LTB₄ bierze udział w modulacji poziomu uwalnianych cytokin zarówno na drodze auto- jak i parakrynej odpowiadając, za większą produkcję IL-10, a

mniejszą IL-12 p40 w komórkach stymulowanych OZ, w porównaniu z komórkami stymulowanymi LPS (**Ryc. 4.4**).

Wydaje się, że cysLTs, choć produkowane w większej ilości, mają mniejszy wpływ na DC stymulowane OZ w warunkach *in vitro*, w porównaniu do LTB₄ (**Ryc. 4.10 i 4.11**). Jedynie poziom IL-10 pod wpływem egzogennej LTD₄ w sposób statystycznie istotny wzrastał, natomiast LTD₄ nie miał jednoznacznego wpływu na IL-12 p40. Wyniki te są częściowo zgodne z doniesieniami Machida i wsp., którzy jako pierwsi pokazali, że alergen powietrzny, jak np. ekstrakt z *Dermatophagoides farinae*, stymuluje w mysich DC pochodzenia szpikowego produkcję cysLTs oraz ekspresję receptora cysLT₁, 5-LO, FLAP i syntazy LTC₄ [41]. Ponadto, zastosowanie antagonisty receptora cysLT₁ (Pranlukastu) wyraźnie zmniejszało produkcję IL-10, a nasilało produkcję IL-12 p40, natomiast dodanie egzogennej LTD₄ wyraźnie podnosiło poziom IL-10, natomiast nieco słabiej hamowało produkcję IL-12 p40 w DC stymulowanych tym ekstraktem. Być może silniejszy efekt cysLTs i antagonistów receptora cysLT₁ wynika z użycia innego stymulatora. Ponadto, jak pokazano w tych doświadczeniach, w DC występuje wpływ LTD₄ oraz pojawia się mRNA dla cysLT₁ jedynie po stymulacji *D. farinae*. Być może stymulacja LPS lub OZ w naszym modelu doświadczalnym, jak również inne warunki doświadczalne, nie wystarczały do zastymulowania ekspresji receptora dla cysLTs.

Nieco inne wyniki uzyskał Okunishi i wsp. w układzie, w którym antagonistów receptora dla cysLTs (m.in. Pranlukast) podawano myszom immunizowanym ovalbuminą, *in vivo*, a następnie izolowano śledzionowe DC i sprawdzono ich właściwości *in vitro*. Badacze pokazali, że takie DC charakteryzują się niższą produkcją zarówno IL-10 jak i IL-12 p70, a więc potencjalnie mogą hamować odpowiedź typu Th1 oraz Th2, czyli ogólnie wykazują niższą zdolność do stymulacji odpowiedzi immunologicznej [46]. Rodzi się pytanie, czy obserwowany efekt był spowodowany zablokowaniem receptora cysLT₁. Ostatnie doniesienie Fukushima i

wsp. (2005 r.) dowodzą, że Pranlukast hamuje uwalnianie IL-5 w alergicznym zapaleniu dróg oddechowych, jednak efekt ten nie był zależny od receptora cysLT₁ [83]. Zademonstrowano ponadto, że antagoniści cysLT₁ mogą działać również poprzez jądrowe receptory peroksysomalnego czynnika proliferacyjnego, tzw. PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) [62], wywołując ogólnie efekt supresyjny na aktywowane komórki układu immunologicznego [63], w tym również na DC [84]. Być może efekt obserwowany przez Okunishi i wsp. związany był bardziej z aktywacją PPARs niż blokowaniem receptora CysLT₁, co byłoby zgodne z naszymi doświadczeniami, w których aktywatory PPAR- α , 8S-HETE i ETYA (**Ryc. 4.12**) oraz aktywator PPAR- γ , 15-deoksy-PGJ₂ i ciglitazon (wyników nie pokazano), hamowały uwalnianie zarówno IL-10 jak i IL-12 p40 z DC stymulowanych LPS [46].

Podsumowując, pokazaliśmy, że mysie DC pochodzenia szpikowego produkują LTs pod wpływem stymulatorów znanych ze skutecznej aktywacji produkcji LTs w innych komórkach [55, 56, 85], natomiast nie uwalniają LTs po stymulacji LPS. Ponadto pokazaliśmy, że endo- i egzogenne LTB₄ nie wpływa na poziom produkcji IL-6, natomiast wydaje się być częściowo odpowiedzialny za modulację uwalniania IL-12 p40 oraz IL-10, prawdopodobnie głównie poprzez receptor BLT₁. Dlatego w przypadku stymulacji OZ mysich DC pochodzenia szpikowego obserwujemy nasilenie produkcji IL-10, a zmniejszenie syntezy IL-12 p40, zapewne częściowo spowodowane obecnością szybko uwalnianego LTB₄, w przeciwieństwie do DC stymulowanych samym LPS. Dodatkowo wydaje się, że wpływ LTs na DC stymulowane LPS *in vitro* był podobny do wpływu PGs, ale słabszy i być może spowodowany niższą ekspresją receptorów LTs lub mniej efektywną transdukcją sygnału z receptorów dla LTs (odpowiednio, **Ryc. 4.11A i 4.6**). Natomiast w naszym modelu doświadczalnym nie udało się wykazać istotnej roli cycLTs, choć badania Machida i wsp. sugerują, że DC hodowane w obecności cysLTs powodują znacznie silniejszy efekt stymulacji odpowiedzi typu Th2 w

mysim modelu astmy oskrzelowej [41].

VI. Wnioski

- 1) Aktywowane DC pochodzenia szpikowego produkują znaczne ilości eikozanoidów (prostanoidy i leukotrieny) oraz charakteryzują się obecnością swoistych receptorów dla tych związków.

- 2) Profil uwalnianych eikozanoidów przez DC zależy od rodzaju użytego stymulatora:
 - LPS, znany powszechnie aktywator leukocytów, indukuje ekspresję COX-2 i w konsekwencji produkcję PGE₂, natomiast nie wpływa na produkcję leukotrienów. IFN- γ dodatkowo podnosi produkcję PGE₂;
 - Opsonizowany immunoglobulinami zymosan (OZ) i jonofor wapnia (A23187) indukują produkcję leukotrienów (cysLTs i LTB₄) już po 40 minutach. Dodatkowo nasilana jest ona przez PMA, aktywator kinazy białkowej C. Stosując farmakologicznie selektywne inhibitory wykazano, że za tę produkcję odpowiada kompleks 5-LO/FLAP obecny już w niestymulowanych DC.

- 3) LPS oraz OZ w odmienny sposób wpływają na poziom uwalnianych cytokin. DC stymulowane OZ uwalniają znacznie więcej IL-10, TNF- α i IL-6, natomiast mniej IL-12 p40 niż DC aktywowane samym LPS.

- 4) PGE₂ oraz LTB₄ w odmienny sposób regulują syntezę cytokin, ponieważ zahamowanie *in vitro* endogennej produkcji:
 - PGE₂ **nie wpłynęło** istotnie na profil uwalnianych cytokin, co sugeruje, że nie działa

ona w sposób autokryny, jedynie egzogenna PGE₂ podawana w początkowej fazie stymulacji LPS hamowała uwalnianie cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6, IL-12), a podnosiła produkcję IL-10. Zatem PGE₂ produkowana przez stymulowane DC może w warunkach *in vivo*, łącznie z pulą PGE₂ pochodzących od innych komórek, w sposób parakryny oddziaływać na sąsiednie komórki, wygaszając proces zapalny;

- cysLTs i LTB₄ **wpłynęło** na niższą produkcję IL-10 w DC stymulowanych OZ, co sugeruje udział LTs w regulacji autokryny syntezy tej cytokiny. Dodatkowo podanie LTs w trakcie stymulacji DC LPS, czyli w sytuacji braku endogennych LTs, wyraźnie podnosiło produkcję IL-10, a obniżało uwalnianie IL-12 p40, przy czym znacznie skuteczniej działał LTB₄ niż cysLTs. Zatem stymulacja DC przez OZ może w warunkach *in vivo*, w sposób zarówno autokryny, jak i parakryny, łącznie z pulą LTs pochodzącą od innych komórek przyczyniać się do regulacji procesu zapalnego i polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th2.

5) W regulację syntezy cytokin w DC zaangażowane są odpowiednie receptory dla eikozanoidów. Dzięki użyciu szeregu swoistych agonistów i antagonistów stwierdzono, że:

- w zastosowanym modelu badawczym jedynie agoniści receptorów EP₂, EP₄, IP, DP oraz terbutalina modulowały uwalnianie cytokin (TNF- α ↓, IL-6↓, IL-12p40↓ oraz IL-10↑). Natomiast sulproston (agonista receptorów EP₁ i EP₃) oraz fluprostenol (agonista receptora FP) nie wpływały na syntezę cytokin. Wobec tego wydaje się, że przeciwzapalne właściwości prostanoidów związane są z obecnością na DC odpowiednich receptorów, których aktywacja prowadzi do wzrostu poziomu cyklicznego AMP w komórce.
- przy zastosowaniu swoistych antagonistów receptorów dla LTs tylko zablokowanie

receptora BTL₁ wpływało na poziom produkcji cytokin (IL-10↓ i IL-12 p40↑), natomiast blokowanie receptora CysLT₁ nie miało żadnego efektu. Zatem podczas stymulacji OZ szybko uwalniany LTB₄, w sposób autokryny, głównie przez receptor BTL₁, oddziałuje na DC pochodzenia szpikowego, odpowiadając częściowo za większą produkcją IL-10, a mniejszą syntezę IL-12 p40 w porównaniu do DC stymulowanych LPS.

- 6) Pełne zrozumienie i poznanie regulacji syntezy eikozanoidów przez DC umożliwi regulację indukcji odpowiedzi immunologicznej Th1 vs Th2. Ta wiedza na pewno znajdzie praktyczne zastosowanie w immunologii klinicznej, gdzie immunoterapia jest coraz częściej stosowaną metodą leczenia wspomagającego w onkologii, infekcjach wirusowych czy bakteryjnych.

VII. Streszczenie

Prostaglandyny (PGs), tromboksany (TXs), leukotrieny (LTs) i lipoksyny (LXs) to eikozanoidy syntezowane z uwalnianego z fosfolipidów przez fosfolipazę A₂ kwasu arachidonowego (kwasu eikoza-5,8,11,14-tetraenowego – stąd wspólna nazwa eikozanoidy). Za biosyntezę PGs i TXs odpowiada cyklooksygenaza (COX), która występuje w dwóch izoformach COX-1 (konstytutywna) oraz COX-2 (indukowalna), natomiast LTs i LXs są produktami enzymów z grupy lipoksygenaz (LOs: 5-, 12- i 15-LO).

Eikozanoidy, dzięki swojej różnorodności oraz obecności na komórkach szeregu swoistych receptorów (rodzina receptorów siedmiokrotnie przebijających błonę komórkową, kooperujących z białkami G), pełnią niezwykle ważną funkcję zarówno w utrzymaniu homeostazy wielu narządów, a także są uznanymi mediatorami odczynu zapalnego. Jednym z ważniejszych problemów współczesnej immunologii oraz przedmiotem intensywnych badań są mechanizmy działania tych mediatorów i ich immunoregulacyjna rola. Dlatego głównym celem niniejszej pracy było poznanie mechanizmów działania wybranych eikozanoidów odczynu zapalnego (PGE₂, LTB₄, cysLTs) na funkcje komórek układu immunologicznego. Do naszych badań *in vitro* wybrano komórki dendrytyczne (DC), ponieważ są one komórkami odczynu zapalnego, które pełnią funkcję komórek prezentujących i odgrywają centralną rolę w polaryzacji odpowiedzi immunologicznej. Komórki uzyskiwano ze szpiku kostnego izolowanego od myszy szczepu BALB/c i CBA, które hodowano w ciągu 7 dni w obecności GM-CSF, a czystość tak uzyskiwanej populacji sprawdzano pod kątem ekspresji charakterystycznych antygenów dla mysich DC pochodzenia szpikowego (CD11c, CD86 oraz MHC II).

Dotychczas sądzono, że głównym źródłem eikozanoidów produkowanych w odczynie zapalnym są komórki tuczne, makrofagi, neutrofile, bazofile oraz eozynofile. W naszym modelu badawczym wykazaliśmy, że również mysie DC pochodzenia szpikowego oprócz

syntetyzowania znacznych ilości PGE₂, uwalniają LTB₄ i cysLTs.

Przy zastosowaniu swoistych inhibitorów enzymów udowodniliśmy, że za syntezę PGE₂ odpowiada przede wszystkim COX-2, która pojawia się w komórce po około 4 godzinach od zadziałania bodźca, natomiast synteza LTB₄ i cysLTs zależna jest od białka FLAP i 5-LO, która była już obecna w niestymulowanych DC. Ponadto jako pierwsi pokazaliśmy, że profil uwalniania eikozanoidów przez DC zależy od rodzaju użytego stymulatora. Zastosowany w doświadczeniach opsonizowany przeciwciałami zymosan (OZ) indukował produkcję leukotrienów (cysLTs i LTB₄ w ciągu 40 minut) oraz PGE₂ (pomiar po 24 godzinach). Natomiast LPS, znany powszechnie aktywator leukocytów, indukował ekspresję COX-2 i w konsekwencji produkcję PGE₂ w 24 godzinnej hodowli, ale nie stymulował produkcji LTs.

W większości tkanek DC występują w formie niedojrzałej (np. komórki Langerhansa skóry), gdzie fagocytują i przetwarzają antygeny (*antigen processing*) ulegając jednocześnie aktywacji. Następnie mogą wędrować do lokalnych węzłów chłonnych, gdzie już jako dojrzałe komórki stymulują obecne tam limfocyty T. Badania dowodzą, że oprócz cytokin w dojrzewaniu DC ważną funkcję wydają się pełnić eikozanoidy produkowane zarówno przez nie same, jak i przez naciekające do odczynu zapalnego leukocyty. Kalinski i wsp. (1997 r.) wykazali, że komórki DC hodowane w obecności PGE₂ dojrzewają i indukują dziewicze limfocyty Th0 w kierunku Th2 m.in. przez zahamowanie uwalniania IL-12. Rieser i wsp. (1997 r.) pokazali natomiast, że PGE₂ synergistycznie z TNF- α w komórkach DC podnosi poziom IL-12 ukierunkowując odpowiedź w Th1 (odpowiedź komórkowa). W doniesieniach literaturowych brak jest jednoznacznej i pełnej informacji o regulacyjnej roli eikozanoidów, a zwłaszcza leukotrienów, w mechanizmach fazy indukcyjnej odpowiedzi immunologicznej. W naszych doświadczeniach PGE₂ oraz LTB₄ w odmienny sposób regulowały syntezę cytokin w DC stymulowanych LPS. Zahamowanie *in vitro* endogennej PGE₂ nie wpłynęło istotnie na profil uwalnianych cytokin, co sugeruje, że nie działa ona w sposób autokryny. W odmienny

sposób kształtowała się natomiast produkcja cytokin po stymulacji OZ, silnego aktywatora uwalniania leukotrienów. DC stymulowane OZ uwalniają znacznie więcej IL-10, TNF- α i IL-6, natomiast mniej IL-12 p40 niż DC aktywowane samym LPS. W tym przypadku zablokowanie endogennych LTs obniżało nieznacznie produkcję IL-10, co sugeruje częściowy udział LTs w regulacji autokrynej syntezy tej cytokiny. Podobnie jak egzogenna PGE₂, LTs podawane w trakcie stymulacji DC przez LPS, wyraźnie podnosiły produkcję IL-10, a obniżały uwalnianie IL-12 p40, przy czym PGE₂ znacznie efektywniej działała niż LTB₄ lub cysLTs (najsłabszy efekt).

W celu wyjaśnienia roli poszczególnych receptorów dla eikozanoidów biorących udział w regulacji syntezy wybranych cytokin przez DC zastosowano szereg swoistych agonistów i antagonistów. W naszym modelu badawczym jedynie podawanie agonistów receptorów EP₂, EP₄, IP i DP hamowało uwalnianie cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6, IL-12 p40), a podnosiło poziom cytokiny przeciwzapalnej (IL-10). W przypadku receptorów dla LTs jedynie zablokowanie receptora BTL₁ wpływało na poziom IL-10 (spadek produkcji) i IL-12 p40 (wzrost produkcji), natomiast blokowanie receptora CysLT₁ nie miało żadnego efektu.

Podsumowując, komórki dendrytyczne, poza główną rolą komórek prezentujących, mogą również w sytuacji zagrożenia pełnić funkcję komórek regulujących proces zapalny i łącznie z innymi komórkami decydować o sile i charakterze tego procesu. Dodatkowo, ze względu na swoje unikalne zdolności do aktywacji limfocytów dziewiczych Th, w zależności od charakteru antygeny oraz otaczającego je mikrośrodowiska, mogą one decydować o kierunku odpowiedzi immunologicznej (Th1 vs Th2). Dlatego pełne poznanie i zrozumienie tych mechanizmów być może wkrótce znajdzie praktyczne zastosowanie w immunologii klinicznej, gdzie immunoterapia jest coraz częściej stosowaną metodą leczenia wspomagającego w onkologii, infekcjach wirusowych czy bakteryjnych.

Summary

Prostaglandins (PGs), thromboxanes (TXs), leukotrienes (LTs) and lipoxins (LXs) are eicosanoids derived from arachidonate (5,8,11,14-eicosatetraenoic acid) that can be released from phospholipids by phospholipase A₂ (PLA₂). The biosynthesis of PGs and TXs is catalyzed by cyclooxygenases (COXs), which exist in two isoforms, COX-1 (constitutive enzyme) and COX-2 (inducible enzyme), whereas LTs and LXs are produced by lipoxygenases (LOs: 5-, 12- and 15-LO). Eicosanoids, due to their heterogeneity and differentially distributed selective receptors, have a variety of physiological functions in homeostasis of numerous organs. They also play an important role in inflammation. Much less is known about the regulatory role of eicosanoids in adaptive immunity.

Dendritic cells (DC) are representatives of immune cells in the inflammation. They play a crucial role in antigen presentation and polarization of immune responses (Th1 *versus* Th2). DC reside in peripheral tissues as sentinel DC and after endocytosis and processing of antigen they undergo the final maturation. During this process, DC migrate to the T cell areas of lymph nodes where they prime naive T cells. Maturation of DC is controlled by cytokines, but the recent data show that eicosanoids can be involved as well. However, the role of endogenous prostanoids and LTs in this process is still controversial.

The purpose of this study was to examine the mechanism of action of selected endogenous and exogenous inflammatory eicosanoids: prostaglandin E₂ (PGE₂), leukotriene B₄ (LTB₄) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) in DC. In our experiments DC were derived from murine bone marrow cells isolated from the femurs and collected from 7 day cultures in medium containing GM-CSF. The purity of DC population was routinely monitored by flow cytometric analysis using monoclonal antibody against characteristic markers of murine bone marrow DC (CD11c, CD86 and MHC II).

Until now, it was generally accepted that only mast cells, macrophages, neutrophils, basophils and eosinophils could be a source of eicosanoids at the inflammation site. In our experimental model, we have demonstrated that PGE₂, LTB₄ and cysLTs can be released also from murine bone marrow derived DC in response to inflammatory stimuli. Using selective inhibitors of enzymes, we have proven that PGE₂ synthesis in DC is mediated predominantly by COX-2, whereas LTB₄ and cysLTs synthesis depend on 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) and 5-LO (a constitutive enzyme) activities. We have shown that DC activated by opsonized zymosan (OZ) release PGE₂ as well as LTs (LTB₄ and cysLTs). In contrast, murine DC treated with lipopolysaccharide (LPS), show an expression of COX-2, which results in production of PGE₂, but they do not release LTs.

We have also found that in our experimental setup PGE₂ and LTs differentially modify cytokine release in LPS stimulated DC. Briefly, inhibition of endogenous PGE₂ had no effect on proinflammatory cytokine production (TNF- α , IL-6 and IL-12 p40). On the contrary, exogenous PGE₂ dose-dependently inhibited the release of proinflammatory cytokines and enhanced the release of IL-10 from LPS-stimulated DC, suggesting only paracrine action of PGE₂ *in vitro*. Murine DC treated with OZ, but not with LPS released large amounts of LTB₄ and cysLTs from endogenous substrates. Additionally, we have noticed that OZ-stimulated DC, in the contrast to LPS-stimulated DC, release much more IL-6, TNF- α and IL-10 and less IL-12 p40. Using a selective inhibitor of leukotriene synthesis and a high affinity antagonist of LTB₄ receptor (BLT₁), we have shown slightly inhibition of IL-10 production in DC stimulated with OZ, but not LPS. Moreover, treatment with exogenous LTB₄ and LTD₄ (one of cysLTs) enhanced IL-10 and inhibited IL-12 p40 production in LPS-stimulated DC. Thus, our results indicate that LTs can affect cytokine release in OZ-stimulated DC in both paracrine and autocrine manner polarizing immune response into Th2.

In order to identify receptors mediating these effects, DC were treated *in vitro* with

receptor-selective analogues of eicosanoids. In our experiments, only agonist of EP₂, EP₄, IP and DP receptors dose-dependently inhibited the release of IL-6, TNF- α , and IL-12 p40 and enhanced the release of IL-10 from LPS-stimulated DC. Finally, we have shown that blocking of BLT₁ receptors, but not of CysLT₁ receptors, increased IL-12 p40 and decreased IL-10 production.

In conclusion, dendritic cells, apart from playing an important role as professional antigen-presenting cells, may also participate in the regulation of inflammation along with other inflammatory cells. Furthermore, they have a unique ability to prime naive T helper cells and to determine the direction of immunological response (Th1 *versus* Th2). This activity depends on interplay between local microenvironment and a nature of antigens. Our results confirm a significant contribution of eicosanoids in these DC activities.

VIII. Literatura

1. Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294: 1871-5.
2. Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F.: Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999; 79: 1193-226.
3. Rocca B., FitzGerald G.A.: Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2: 603-30.
4. Williams K.I., Higgs G.A.: Eicosanoids and inflammation. *J Pathol.* 1988; 156: 101-10.
5. Smith W.L., Langenbach R.: Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1491-5.
6. FitzGerald G.A., Loll P.: COX in a crystal ball: current status and future promise of prostaglandin research. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1335-7.
7. Jakobsson P.J., Thoren S., Morgenstern R., Samuelsson B.: Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 7220-5.
8. Murakami M., Naraba H., Tanioka T., Semmyo N., Nakatani Y., Kojima F., Ikeda T., Fueki M., Ueno A., Oh S., Kudo I.: Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000; 275: 32783-92.
9. Schuster V.L.: Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 68-69: 633-47.
10. Narumiya S., FitzGerald G.A.: Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001; 108: 25-30.
11. Hirai H., Tanaka K., Yoshie O., Ogawa K., Kenmotsu K., Takamori Y., Ichimasa M., Sugamura K., Nakamura M., Takano S., Nagata K.: Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med.* 2001; 15: 255-61.
12. Gualde N., Harizi H.: Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82: 353-60.
13. Tsuboi K., Sugimoto Y., Ichikawa A.: Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 68-69: 535-56.
14. Peters-Golden M., Brock T.G.: Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett.* 2001; 487: 323-6.
15. Chen X.S., Funk C.D.: The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 811-8.
16. Samuelsson B., Dahlen S.E., Lindgren J.A., Rouzer C.A., Serhan C.N.: Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987; 237: 1171-6.
17. Spanbroek R., Hildner M., Steinhilber D., Fusenig N., Yoneda K., Radmark O., Samuelsson B., Habenicht A.J.: 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+)

- hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood*. 2000; 96: 3857-65.
18. Byrum R.S., Goulet J.L., Snouwaert J.N., Griffiths R.J., Koller B.H.: Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B₄ in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A₄ hydrolase-deficient mice. *J Immunol*. 1999; 163: 6810-9.
 19. Robbiani D.F., Finch R.A., Jager D., Muller W.A., Sartorelli A.C., Randolph G.J.: The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*. 2000; 103: 757-68.
 20. Yokomizo T., Kato K., Terawaki K., Izumi T., Shimizu T.: A second leukotriene B₄ receptor, BLT2: A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* 2000; 192: 421-31.
 21. Tager A.M., Dufour J.H., Goodarzi K., Bercury S.D., von Andrian U.H., Luster A.D.: BLTR mediates leukotriene B₄-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med* 2000; 192: 439-446.
 22. Haribabu B., Verghese M.W., Steeber D.A., Sellars D.D., Bock C.B., Snyderman R.: Targeted disruption of the leukotriene B₄ receptor in mice reveals its role in inflammation and platelet-activating factor-induced anaphylaxis. *J Exp Med* 2000; 192: 433-438.
 23. Devchand P.R., Keller H., Peters J.M., Vazquez M., Gonzalez F.J., Wahli W.: The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39-43.
 24. Hui Y., Funk C.D.: Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64: 1549-57.
 25. Goulet J.L., Snouwaert J.N., Latour A.M., Coffman T.M., Koller B.H.: Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12852-6.
 26. Grabbe S., Kampgen E., Schuler G.: Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol. Today* 2000; 21: 431-3.
 27. Rieser C., Bock G., Klocker H., Bartsch G., Thurnher M.: Prostaglandin E₂ and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med*. 1997; 186: 1603-8.
 28. Whelan M., Harnett M.M., Houston K.M., Patel V., Harnett W., Rigley K.P.: A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th₂ cells. *J Immunol*. 2000; 164: 6453-60.
 29. Vieira P.L., de Jong E.C., Wierenga E.A., Kapsenberg M.L., Kalinski P.: Development of Th₁-Inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol*. 2000; 164: 4507-12.
 30. Kalinski P., Schuitemaker J.H., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L.: Prostaglandin E₂ induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol*. 1998; 161: 2804-9.
 31. van der Pouw Kraan T.C., Boeije L.C., Smeenk R.J., Wijdenes J., Aarden L.A.: Prostaglandin-E₂ is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med*. 1995; 181: 775-9.
 32. Strassmann G., Patil-Koota V., Finkelman F., Fong M., Kambayashi T.: Evidence for the

- involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med.* 1994; 180: 2365-70.
33. Vassiliou E., Jing H., Ganea D.: Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol.* 2003; 223: 120-32.
 34. Scandella E., Men Y., Gillessen S., Forster R., Groettrup M.: Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100: 1354-61.
 35. Kuroda E., Sugiura T., Okada K., Zeki K., Yamashita U.: Prostaglandin E2 up-regulates macrophage-derived chemokine production but suppresses IFN-inducible protein-10 production by APC. *J Immunol.* 2001; 166: 1650-8.
 36. Kabashima K., Murata T., Tanaka H., Matsuoka T., Sakata D., Yoshida N., Katagiri K., Kinashi T., Tanaka T., Miyasaka M., Nagai H., Ushikubi F., Narumiya S.: Thromboxane A2 modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. *Nat Immunol.* 2003; 4: 694-701.
 37. Angeli V., Faveeuw C., Roye O., Fontaine J., Teissier E., Capron A., Wolowczuk I., Capron M., Trottein F.: Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *J Exp Med.* 2001; 193: 1135-47.
 38. Hammad H., de Heer H.J., Soullie T., Hoogsteden H.C., Trottein F., Lambrecht B.N.: Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol.* 2003; 171: 3936-40.
 39. Gosset P., Bureau F., Angeli V., Pichavant M., Faveeuw C., Tonnel A.B., Trottein F.: Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J Immunol.* 2003; 170: 4943-52.
 40. Morelli A.E., Thomson A.W.: Dendritic cells under the spell of prostaglandins. *Trends Immunol.* 2003; 24: 108-11.
 41. Machida I., Matsuse H., Kondo Y., Kawano T., Saeki S., Tomari S., Obase Y., Fukushima C., Kohno S.: Cysteinyl leukotrienes regulate dendritic cell functions in a murine model of asthma. *J Immunol.* 2004; 172: 1833-8.
 42. Henderson W. R. Jr: The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med.* 1994; 121: 684-97.
 43. Spanbroek R., Stark H.J., Janssen-Timmen U., Kraft S., Hildner M., Andl T., Bosch F.X., Fusenig N.E., Bieber T., Radmark O., Samuelsson B., Habenicht A.J.: 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 663-8.
 44. Spanbroek R., Hildner M., Kohler A., Muller A., Zintl F., Kuhn H., Radmark O., Samuelsson B., Habenicht A.J.: IL-4 determines eicosanoid formation in dendritic cells by down-regulation of 5-lipoxygenase and up-regulation of 15-lipoxygenase 1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 5152-7.
 45. Harizi H., Juzan M., Moreau J.F., Gualde N.: Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B4 production from dendritic cells via an IL-10-dependent

- mechanism. *J Immunol.* 2003; 170: 139-46.
46. Okunishi K., Dohi M., Nakagome K., Tanaka R., Yamamoto K.: A novel role of cysteinyl leukotrienes to promote dendritic cell activation in the antigen-induced immune responses in the lung. *J Immunol.* 2004; 173: 6393-402.
 47. Saeki S., Matsuse H., Kondo Y., Machida I., Kawano T., Tomari S., Obase Y., Fukushima C., Kohno S.: Effects of antiasthmatic agents on the functions of peripheral blood monocyte-derived dendritic cells from atopic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: 538-44.
 48. Harizi H., Juzan M., Pitard V., Moreau J.F., Gualde N.: Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol.* 2002; 168: 2255-63.
 49. Bender A., Bui L.K., Feldman M.A., Larsson M., Bhardwaj N.: Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J Exp Med.* 1995; 182: 1663-71.
 50. Bocchia M., Bronte V., Colombo M.P., De Vincentiis A., Di Nicola M., Forni G., Lanata L., Lemoli R.M., Massaia M., Rondelli D., Zanon P., Tura S.: Antitumor vaccination: where we stand. *Haematologica* 2000; 85: 1172-206.
 51. Mailliard R.B., Wankowicz-Kalinska A., Cai Q., Wesa A., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L., Kirkwood J.M., Storkus W.J., Kalinski P.: alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.* 2004; 64: 5934-7.
 52. Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R.M.: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1992; 176: 1693-702.
 53. Uracz W., Uracz D., Olszanecki R., Gryglewski R.J.: Interleukin 1beta induces functional prostaglandin E synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53: 643-54.
 54. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
 55. Brown G.P., Monick M.M., Hunninghake G.W.: Human alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Am J Physiol.* 1988; 254: C809-15.
 56. Doerfler ME, Danner RL, Shelhamer JH, Parrillo JE. Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B4. *J Clin Invest.* 1989; 83: 970-7.
 57. Labeur M.S., Roters B., Pers B., Mehling A., Luger T.A., Schwarz T., Grabbe S.: Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol.* 1999; 162: 168-75.
 58. Brasel K., De Smedt T., Smith J.L., Maliszewski C.R.: Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 2000; 96: 3029-39.
 59. Town M.H., Casals-Stenzel J., Schillinger E.: Pharmacological and cardiovascular properties of a hydantoin derivative, BW 245C, with high affinity and selectivity for PGD2 receptors. *Prostaglandins* 1983; 25: 13-28.
 60. Maekawa A., Kanaoka Y., Lam B.K., Austen K.F.: Identification in mice of two isoforms of the

- cysteinyl leukotriene 1 receptor that result from alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2256-61.
61. Maekawa A., Austen K.F., Kanaoka Y.: Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J Biol Chem* 2002; 277: 20820-4.
 62. Kojo H., Fukagawa M., Tajima K., Suzuki A., Fujimura T., Aramori I., Hayashi K., Nishimura S.: Evaluation of human peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) subtype selectivity of a variety of anti-inflammatory drugs based on a novel assay for PPAR α . *J Pharmacol Sci*. 2003; 93: 347-55.
 63. von Knethen A., Brune B.: PPAR γ -an important regulator of monocyte/macrophage function. *Arch Immunol Ther Exp*. 2003; 51: 219-26.
 64. Doerfler M.E., Weiss J., Clark J.D., Elsbach P.: Bacterial lipopolysaccharide primes human neutrophils for enhanced release of arachidonic acid and causes phosphorylation of an 85-kD cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest*. 1994; 93: 1583-91.
 65. Pruijboom W.M., van Dijk A.P., Tak C.J., Zijlstra F.J., Bonta I.L., Wilson J.H.: Inflammatory mediators and activity of human peritoneal macrophages. *Agents Actions*. 1993; 38: C86-8.
 66. Rankin J.A., Sylvester I., Smith S., Yoshimura T., Leonard E.J.: Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J Clin Invest*. 1990; 86: 1556-64.
 67. Jongmans W., Tiemessen D.M., van Vlodrop I.J., Mulders P.F., Oosterwijk E.: Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails. *J Immunother*. 2005; 28 :480-7.
 68. Harizi H., Juzan M., Grosset C., Rashedi M., Gualde N.: Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol*. 2001; 209: 19-28.
 69. Matasic R., Dietz A.B., Vuk-Pavlovic S.: Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cells maturation by aspirin. *Immunology* 2000;101:53-60.
 70. Harizi H., Gualde N.: Inhibition of IL-6, TNF-alpha, and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E2-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol*. 2004; 228: 99-109.
 71. Morelli A.E., Zahorchak A.F., Larregina A.T., Colvin B.L., Logar A.J., Takayama T., Falo L.D., Thomson A.W.: Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 2001; 98: 1512-23.
 72. Luft T., Jefford M., Luetjens P., Toy T., Hochrein H., Masterman K.A., Maliszewski C., Shortman K., Cebon J., Maraskovsky E.: Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 2002; 100: 1362-72.
 73. Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willis D., Chivers J., Paul-Clark M.J., Willoughby D.A.: Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*. 1999; 5: 698-701.

74. Meja K.K., Barnes P.J., Giembycz M.A.: Characterization of the prostanoid receptor(s) on human blood monocytes at which prostaglandin E₂ inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis- α generation. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 149-57.
75. Kubo S., Takahashi H.K., Takei M., Iwagaki H., Yoshino T., Tanaka N., Mori S., Nishibori M.: E-prostanoid (EP)₂/EP₄ receptor-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells and induction of helper T₂ polarization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309: 1213-20.
76. Kabashima K., Sakata D., Nagamachi M., Miyachi Y., Inaba K., Narumiya S.: Prostaglandin E₂-EP₄ signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med.* 2003; 9: 744-9.
77. Fennekohl A., Sugimoto Y., Segi E., Maruyama T., Ichikawa A., Püschel G.P.: Contribution of the two Gs-coupled PGE₂-receptors EP₂-receptor and EP₄-receptor to the inhibition by PGE₂ of the LPS-induced TNF- α -formation in Kupffer cells from EP₂- or EP₄-receptor-deficient mice. Pivotal role for the EP₄-receptor in wild type Kupffer cells. *J Hepatol* 2002; 36: 328-34.
78. Ikegami R., Sugimoto Y., Segi E., Katsuyama M., Karahashi H., Amano F., Maruyama T., Yamane H., Tsuchiya S., Ichikawa A.: The expression of prostaglandin E receptors EP₂ and EP₄ and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J Immunol.* 2001; 166: 4689-96.
79. Akaogi J., Yamada H., Kuroda Y., Nacionales D.C., Reeves W.H., Satoh M.: Prostaglandin E₂ receptors EP₂ and EP₄ are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF- α and IL-6 production. *J Leukoc Biol.* 2004; 76: 227-36.
80. Haynes D.R., Whitehouse M.W., Vernon-Roberts B.: The prostaglandin E₁ analogue, misoprostol, regulates inflammatory cytokines and immune functions in vitro like the natural prostaglandins E₁, E₂ and E₃. *Immunology* 1992; 76: 251-7.
81. McCoy J.M., Wicks J.R., Audoly L.P.: The role of prostaglandin E₂ receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2002; 110: 651-8.
82. Abdi K.: IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand J Immunol.* 2002; 56: 1-11.
83. Fukushima C., Matsuse H., Hishikawa Y., Kondo Y., Machida I., Saeki S., Kawano T., Tomari S., Obase Y., Shimoda T., Koji T., Kohno S.: Pranlukast, a leukotriene receptor antagonist, inhibits interleukin-5 production via a mechanism distinct from leukotriene receptor antagonism. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005; 136: 165-72.
84. Hammad H., de Heer H.J., Soullie T., Angeli V., Trottein F., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N.: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol.* 2004; 164: 263-71.
85. Werz O., Klemm J., Samuelsson B., Radmark O.: Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 2001; 97: 2487-95.

IX. Podziękowania

Niniejsza praca doktorska powstała dzięki współpracy wielu cierpliwych i serdecznych dla mnie osób. Dlatego składam wielkie podziękowania następującym pracownikom Katedry Immunologii CM UJ: dr Szczepanowi Józefowskiemu i dr Krzysztofowi Bryniarskiemu za merytoryczne uwagi i pomoc w wykonaniu doświadczeń, Paniom mgr Małgorzacie Bobek, mgr Marii Kurnyta, Barbarze Bazant, Elżbiecie Drożdżewicz za pomoc w przeprowadzeniu doświadczeń, a Pani Jolancie Bieleckiej za opiekę nad zwierzętami oraz wielu innym osobom.

Pracę doktorską finansowano głównie ze środków otrzymanych z **Ministerstwa Nauki i Informatyzacji w ramach grantu promotorskiego nr 2 P05A 033 28 pt.: Udział eikozanoidów w regulacji funkcji komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego**” oraz częściowo z badań własnych nr Wł/137/P/L pt.: „Udział lipoksyn (LXs) w regulacji odpowiedzi immunologicznej przez eikozanoidy. Regulacja funkcji komórek prezentujących antygen przez eikozanoidy”.