

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Magdalena Zemelka-Wiącek

Mechanizmy naskórnio indukowanej supresji reakcji
nadwrażliwości kontaktowej Tc1 CD8⁺ zależnej u myszy.

Praca doktorska

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

Pracę wykonano w Instytucie Pielęgniarstwa i Położnictwa
w Katedrze Biologii Medycznej UJ CM

Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Marian Szczepanik

Kraków, 2012

WYKAZ UŻYTYCH SKRÓTÓW	6
------------------------------	----------

1. WSTĘP	11
-----------------	-----------

1.1. Reakcja nadwrażliwości kontaktowej	11
1.1.1. Kontaktowe zapalenie skóry	11
1.2.1. Reakcja CHS u zwierząt doświadczalnych	12
1.2. Mechanizm reakcji nadwrażliwości kontaktowej	13
1.2.1. Faza indukcji reakcji CHS	13
1.2.2. Hapteny	14
1.2.3. Pochłanianie antygenów, dojrzewanie i migracja komórek dendrytycznych	15
1.2.4. Aktywacja limfocytów T efektorowych CHS	16
1.2.5. Migracja limfocytów T efektorowych do krwi i skóry	17
1.2.6. Faza efektorowa reakcji CHS	18
1.3. Regulacja reakcji nadwrażliwości kontaktowej	19
1.4. Tolerancja pokarmowa	22
1.4. Tolerancja immunologiczna indukowana naskórną aplikacją antygeny białkowego	23

2. CEL PRACY	25
---------------------	-----------

3. MATERIAŁY I METODY	26
------------------------------	-----------

3.1. Materiały	26
3.1.1. Zwierzęta doświadczalne	26
3.1.2. Odczynniki	26

3.1.3. Antygeny białkowe	27
3.1.4. Przeciwciała monoklonalne wykorzystane w eksperymentach oceniających fenotyp komórki regulacyjnej	28
3.1.5. Odczynniki zastosowane do pomiaru stężenia cytokin w teście ELISA	28
3.1.6. Materiały i aparatura	29
3.2. Metody	30
3.2.1. Indukcja stanu tolerancji przez naskórną (EC) aplikację antygenu białkowego	30
3.2.2. Wywołanie i pomiar reakcji nadwrażliwości kontaktowej (CHS) Tc1 CD8 ⁺ zależnej <i>in vivo</i> u myszy	30
3.2.3. Test przepuszczalności błękitu Evans'a przez naczynia włosowate	32
3.2.4. Pomiar wagi bioptatów pobranych z małżowin usznych	32
3.2.5. Oznaczanie IFN- γ w ekstraktach bioptatów pobranych z małżowin usznych	32
3.2.6. Oznaczanie aktywności mieloperoksydazy (MPO) w ekstraktach bioptatów pobranych z małżowin usznych	32
3.2.7. Test supresji „transfer in” reakcji CHS	33
3.2.8. Adoptywny transfer reakcji CHS typu „transfer out”	35
3.2.9. Test proliferacji	36
3.2.10. Ocena fenotypu komórki regulacyjnej metodą „negatywnej selekcji”	37
3.2.11. Analiza cytofluorymeryczna (FACS)	37
3.2.12. Hodowla komórkowa oraz oznaczanie poziomu cytokin w supernatantach metodą ELISA	38
3.2.13. Inkubacja komórek na płytkach z wkładami półprzepuszczalnymi	39
3.2.14. Adoptywny transfer i blokowanie CTLA-4 (CD152) <i>in vitro</i>	39
3.3. Analiza statystyczna	42

4.1. Naskórna aplikacja antygeny białkowego przed wywołaniem reakcji Tc1 CD8 ⁺ zależnej prowadzi do jej zahamowania	43
4.2. Przed wywołaniem reakcji CHS EC aplikacją antygeny białkowego prowadzi do zmniejszenia intensywności reakcji zapalnej w małżowinie usznej	44
4.3. EC aplikacja antygeny białkowego hamuje proliferację komórek Tef <i>in vitro</i>	48
4.4. Stan tolerancji immunologicznej indukowany EC aplikacją antygeny można przenieść do naiwnych biorców przy użyciu komórek układu immunologicznego	49
4.5. Stopień zahamowania reakcji CHS zależy od ilości przeniesionych komórek Treg	50
4.6. Naskórnio indukowane komórki Treg należą do populacji limfocytów TCRαβ ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	51
4.7. Stan tolerancji immunologicznej indukowany EC aplikacją antygeny białkowego jest antygenowo nieswoisty	55
4.8. Stan tolerancji immunologicznej indukowany EC aplikacją antygeny białkowego zanika z czasem	59
4.9. Komórki regulacyjne indukowane EC aplikacją antygeny hamują fazę indukcyjną i efektorową reakcji CHS	60
4.10. Cytokiny nie biorą udziału w naskórnio indukowanej supresji	61
4.11. Substancje rozpuszczalne nie biorą udziału w naskórnio indukowanej supresji	62
4.12. Naskórnio indukowana supresja wymaga bezpośredniego kontaktu pomiędzy komórkami Treg i Tef	64
4.13. Molekuła CTLA-4 odgrywa kluczową rolę w EC indukowanej supresji	66

7. LITERATURA	77
----------------------	-----------

8. STRESZCZENIE	96
------------------------	-----------

SUMMARY	99
----------------	-----------

Ab	przeciwciało (ang. antibody)
ACD	alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ang. allergic contact dermatitis)
Ag	antygen (ang. antigen)
APC	komórka prezentująca antygen (ang. antigen presenting cell)
C	dopełniacz (ang. complement)
cAMP	cykliczny 3'5'-adenozynomonofosforan (ang. adenosine 3',5'-cyclic monophosphate)
CCL	ligand chemokiny typu CC (ang. CC chemokine ligand)
CCR	receptory dla chemokin podklasy CC (ang. receptor CC chemokin)
CD	czynnik różnicowania (ang. cluster of differentiation)
CD40L	ligand receptora CD40 (ang. CD40 ligand)
CHS	reakcja nadwrażliwości kontaktowej (ang. contact hypersensitivity)
CIA	kolagenowe zapalenie stawów (ang. collagen induced arthritis)
CLA	antygen limfocytów zasiedlających skórę (ang. cutaneous lymphocyte associated antigen)
COLL II	kolagen typu II (ang. collagen II)
CTLA-4	antygen-4 związany z limfocytom T cytotoksycznym (ang. cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4)
CXCL	ligand chemokiny typu CXC (ang. CXC chemokine ligand)
CXCR	receptory dla chemokin podklasy CXC (ang. receptor CXC chemokin)
DC	komórka dendrytyczna (ang. dendritic cell)
DDC	skórne komórki dendrytyczne (ang. dermal dendritic cells)
DC-SIGN	nieintegryna swoista dla komórek dendrytycznych chwytająca ICAM-3 (ang. dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin)
DNCB	dinitrochlorobenzen (ang. dinitrochlorobenzene)

DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (dinitrofluorobenzen) (ang. dinitrofluorobenzene)
DNP-BSA	albumina bydlęca skoniugowana z dwunitrofenylem (ang. dinitrophenylated bovine serum albumin)
DPBS	pozbawiona jonów wapnia i magnezu, zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna (ang. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
DTH	nadwrażliwość typu późnego (ang. delayed-type hypersensitivity)
EAE	eksperymentalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis)
EC	naskórna (ang. epicutaneous)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	analiza cytofluorymetryczna (ang. fluorescence-activated cell sorting)
Fas	receptor dla cytokin nadrodziny TNF (ang. TNF receptor superfamily member)
FasL	ligand receptora Fas (ang. Fas ligand)
FcR	receptor dla fragmentu Fc przeciwciała (ang. Fc receptor)
FCS	płodowa surowica cielęca (ang. fetal calf serum)
FITC	izotiocyanian fluoresceiny (ang. fluorescein isothiocyanate)
Foxp3	czynnik transkrypcyjny limfocytów T regulatorowych (ang. forkhead box transcription factor)
FSC	natężenie światła rozproszonego w kierunku biegu promienia lasera (ang. forward scatter)
GALT	tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (ang. gut-associated lymphoid tissue)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i monocytów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HEPES	N-(2-hydroksyetyl) piperazyna-N'-2-kwas 2 etanosulfonowy
HEV	żyłka pozawłosowata z wysokim śródbłonkiem (ang. high endothelial venule)
HLA	antygeny ludzkich leukocytów kodowane w MHC (ang. human leukocyte antigens)
i.v.	dożylnie (ang. intravenous)
ICAM	międzykomórkowa molekula adhezyjna (ang. intercellular adhesion molecule)

ICOS	kostymulator indukowany (ang. inducible co-stimulator)
IFN	interferon (ang. interferon)
Ig	immunoglobulina (ang. immunoglobulin)
IL	interleukina (ang. interleukin)
IL-1R1	receptor dla IL-1 typu I (ang. interleukin 1 receptor, type I)
IP	białko indukowane przez interferon (ang. interferon inducible protein)
KLH	hemocjanina mięczaka skałoczepe (ang. keyhole limpet hemocyanin)
LC	komórki Langerhansa (ang. Langerhans' cells)
LFA	antygen związany z czynnością limfocytów (ang. Lymphocyte function-associated antigen)
LN	węzeł chłonny (ang. lymph node)
LNC	komórki węzłów chłonnych (ang. lymph node cells)
LT	leukotrieny (ang. leukotrienes)
mAb	przeciwciała monoklonalne (ang. monoclonal antibody)
MBP	zasadowe białko mieliny (ang. myelin basic protein)
MHC	główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)
MIP	białko zapalne makrofagów (ang. macrophage inflammatory protein)
MLN	węzeł chłonny krezkowy (ang. mesenteric lymph node)
MLNC	komórki węzłów chłonnych krezkowych (ang. mesenteric lymph node cells)
MMP	metaloproteinaza macierzy (ang. matrix metalloproteinase)
MPO	mieloperoksydazy (ang. myeloperoxidase)
MS	stwardnienie rozsiane (ang. multiple sclerosis)
NF-AT	czynnik jądrowy pobudzonych limfocytów (ang. nuclear factor of activated T cell)
NK	komórka NK (ang. natural killer - naturalny zabójca)
NKT	limfocyt NKT (ang. natural killer T lymphocyte)
OVA	owoalbumina (ang. ovoalbumin)
OX	oksazon (ang. oxazolone [4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one])

OX-Ig	mysie immunoglobuliny (Ig) wyznakowane OX
PCI	chlorek pikrylu (ang. picryl chloride); TNP-Cl lub TNCB
PE	fikoerytryna (ang. phycoerythrin)
per os	doustnie
PGD₂	prostaglandyna D ₂ (ang. prostaglandin D ₂)
RANTES	regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T (ang. regulated on activation normal T cells expressed and secreted)
RC	dopełniacz króliczy (ang. rabbit complement)
ROI's	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen intermediates)
RPMI	RPMI 1640, podłoże do hodowli komórek
SN	supernatant (ang. supernatant)
SPL	śledziona (ang. spleen)
SPLC	komórki śledziony (ang. spleen cells)
SSC	natężenie światła rozproszonego w kierunku prostopadłym do kierunku biegu promienia lasera (ang. side scatter)
TAP	białko transportujące fragmenty antygeny (ang. transporter associated with antigen processing)
TARC	rodzina chemokin (ang. thymus and activation-regulated chemokine)
Tc	limfocyt cytotoksyczny (ang. T cytotoxic cell)
TCR	receptor limfocytów T (ang. T-cell receptor)
Tef	limfocyt T efektorowy (ang. T effector cell)
TGF	transformujący czynnik wzrostu (ang. transforming growth factor)
Th	limfocyt pomocniczy (ang. T helper cell)
Thy	grasica (ang. thymus)
TNCB	trinitrochlorobenzen (ang. trinitrochlorobenzene); PCI lub TNP-Cl
TNF	czynnik martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor)
TNF-R2	receptor 2 dla TNF (ang. TNF-receptor 2)
TNP	trinitrofenyl (ang. trinitrophenyl)

TNP-CI	chlorek trinitrofenylu (ang. trinitrophenyl chloride); PCI lub TNCB
Tr1	limfocyt regulacyjny typu 1 (ang. type 1 regulatory T cell)
Treg	limfocyt T regulacyjny (ang. regulatory T cell)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ang. ultraviolet radiation)
VCAM	cząsteczka adhezyjna śródbłonna naczyniowego (ang. vascular cell adhesion molecules)
VLA	antygen bardzo późny (ang. very late antigen)

Indeks ⁺ lub ⁻ oznacza istnienie (⁺) lub brak (⁻) odpowiedniej cechy

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

1.1. REAKCJA NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Nadwrażliwość kontaktowa (CHS) jest reakcją immunologiczną rozwijającą się po miejscowej ekspozycji (skóra, błony śluzowe) na substancje niskocząsteczkowe zwane haptenami; jest ona jedną z form nadwrażliwości typu późnego (DTH delayed type hypersensitivity) [1]. Reakcja CHS przebiega w dwóch kolejno występujących po sobie etapach. Hapteny łącząc się kowalencyjnie z białkami ustroju tworzą neoantygeny, które indukują powstanie uczulonych limfocytów, a przy powtórным zetknięciu się z homologicznym związkiem uczulającym dochodzi do wywołania reakcji immunologicznej, objawiającej się zaczerwienieniem, obrzękiem z tworzeniem się pęcherzy, złuszczeniem się naskórka oraz świądem w miejscu depozycji haptenu [2].

Reakcja CHS jest procesem złożonym, w którym uczestniczą m.in. komórki prezentujące antygen (APC), komórki efektorowe limfocyty Th1 CD4⁺ lub Tc1 CD8⁺ mastocyty, limfocyty B-1, komórki NKT oraz leukocyty krwi obwodowej (monocyty i neutrofile) [3, 4]. Ostatnie badania wskazują, że izolowane z wątroby komórki NK mogą również wywoływać reakcję CHS [5].

1.1.1. KONTAKTOWE ZAPALENIE SKÓRY.

Klasycznym przykładem reakcji CHS u ludzi jest alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD, allergic contact dermatitis). Stale rosnąca liczba osób cierpiących na schorzenia alergiczne, stwarza coraz większe problemy natury społeczno-ekonomicznej odbijając się na jakości życia pacjentów, a tym samym na wydajności pracy. Kontaktowe zapalenie skóry powstające w wyniku ekspozycji na substancje chemiczne w miejscu pracy stanowi około 30% wszystkich chorób zawodowych, w tym aż 80% z tych chorób dotyczy rąk [6].

Ilość czynników etiologicznych ACD jest bardzo wysoka, w samym przemyśle stosuje się ponad 100000 substancji chemicznych, a każdego roku syntetyzuje się 2000 nowych. W chwili obecnej zidentyfikowano ponad 3700 cząsteczek, które mogą być alergenami kontaktowymi [7]. Do substancji powszechnie wywołujących uczulenia

kontaktowe u ludzi zaliczamy: jony metali ciężkich (chrom, nikiel, żelazo, kobalt), lateks, terpentynę, substancje zapachowe oraz konserwujące zawarte w kosmetykach (np. p-fenylenodwuamina), niektóre leki (np. neomycyna, benzokaina, antybiotyki β -laktamowe tj. penicyliną), substancje chemiczne wytwarzane przez rośliny (pentadekakatechol – substancja zawarta w bluszczu trującym) jak również hydrochinon – używany w przemyśle fotograficznym [8, 2].

1.1.2. REAKCJA CHS U ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH.

Wiedza na temat patofizjologii ACD pochodzi głównie z modeli zwierzęcych, w których wywołuje się indukowane haptenami zapalenie skóry, tzw. reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Reakcję taką można wywołać u myszy, świnek morskich [9] oraz szczurów [10].

U zwierząt doświadczalnych, w tym również u myszy, reakcję CHS wywołuje się poprzez aplikację roztworu haptenu w rozpuszczalniku organicznym na uprzednio ogoloną skórę [1]. Do najczęściej używanych haptenu należą: chlorek pikrylu (PCI; TNP-Cl – chlorek trinitrofenylu, TNCl - trinitrochlorobenzen), dinitrofluorobenzen (DNFB), dinitrochlorobenzen (DNCl) oraz oksazon (OX).

W zależności od szczepu myszy oraz rodzaju haptenu użytego do immunizacji, reakcja CHS może przebiegać przy współudziale swoistych limfocytów pomocniczych Th1 CD4⁺ lub swoistych limfocytów cytotoksycznych Tc1 CD8⁺. Pierwszy typ odpowiedzi można indukować immunizując myszy szczepu CBA/J o haplocybie H-2^k haptenu TNP-Cl [11, 12]. Natomiast reakcję, w której funkcję efektorową pełnią limfocyty Tc1 można wywołać u myszy szczepu C57BL/6 (haplocyb H-2^b) aplikując na ogoloną skórę TNCl, DNFB, DNCl, lub OX oraz u myszy szczepu BALB/c (haplocyb H-2^d) podając na skórę DNFB, DNCl lub OX [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Jednakże według niektórych doniesień nie można wywołać odpowiedzi spolaryzowanej w jednym kierunku, a komórki efektorowe Th1 CD4⁺ i Tc1 CD8⁺ współuczestniczą w reakcji, wywołując reakcję CHS u myszy szczepu C57BL/6 uczulonych DNFB lub OX [21].

Reakcja CHS, bez względu na rodzaj komórek efektorowych, przebiega w dwóch kolejno po sobie występujących etapach, obejmujących fazę indukcyjną oraz fazę efektorową. W niniejszej pracy ograniczono się do dokładnego opisu badanej reakcji CHS zależnej od komórek Tc1.

1.2.1. FAZA INDUKCJI REAKCJI CHS.

Faza ta rozpoczyna się w chwili pierwszego kontaktu z haptenami, prowadzi do pochłonięcia haptenu związanego z białkami naskórka przez komórki dendrytyczne (DC), a następnie do powstania antygenowo swoistych komórek T CD4⁺ lub T CD8⁺ w węzłach chłonnych oraz wytworzenia się komórek pamięci immunologicznej. Jak wykazano po raz pierwszy w reakcji CHS Th1 zależnej, uczulenie haptenem aktywuje także komórki NKT wątroby oraz limfocyty B-1 jamy otrzewnej. W modelu tym, limfocyty T efektorowe emigrują z węzłów chłonnych i rozpoczynają typową dla siebie wędrówkę pomiędzy krwią, a narządami chłonnymi. Podobne obserwacje poczyniono w modelu CHS Tc1 zależnej. W fazie indukcji nie występują objawy kliniczne.

Komórki NKT w wątrobie ulegają aktywacji przez uwolnienie w następstwie uczulenia haptenem endogennych glikolipidów rozpoznawanych w kontekście antygenów CD1a [22, 23]. Komórki te już po siedmiu minutach od immunizacji wydzielają IL-4 która stymuluje antygenowo swoisty limfocyt B-1. Limfocyty B-1 (zwane komórkami fazy wczesnej) o fenotypie Thy1⁺ CD5⁺ CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ ulegają aktywacji w jamie otrzewnej już w pierwszej godzinie od immunizacji haptenem [24, 25]. Następnie komórki B-1 wędrują do śledziony i lokalnych węzłów chłonnych, gdzie w ciągu jednego dnia przekształcają się w komórki syntetyzujące IgM, swoiste dla użytego haptenu TNP-CI [26].

W modelu reakcji CHS zależnej od komórek CD8⁺ również występuje podobny mechanizm inicjacji reakcji CHS. Z dotychczasowych doniesień wynika, że naskórna aplikacja haptenu DNFB (u myszy szczepu BALB/c) powoduje powstanie komórki fazy wczesnej o unikalnym fenotypie Thy1⁺ CD5⁺ CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻, która jest antygenowo swoista i ulega pełnej aktywacji w obecności IL-4 uwalnianej przez limfocyty NKT [27,28]. Wykazano także, że w reakcji CHS Tc1 zależnej istotną rolę odgrywają również komórki TCRγδ⁺.

1.2.2. HAPTENY.

Hapteny są niskocząsteczkowymi substancjami (mniej niż 1kD), a ich penetracja przez naskórek zależy głównie od polarności cząsteczki, następuje szybciej dla cząsteczek lipofilnych a wolniej dla haptenów hydrofilnych [29]. Hapteny nie są immunogenne, dopiero po kowalencyjnym bądź nie-kowalencyjnym połączeniu z białkami naskórka, tworzą kompleksy zwane neoantygenami, i wtedy nabywają immunogenności. Większość haptenów jest cząsteczkami elektrofilowymi, które łączą się z resztami nukleofilowymi białek znajdujących się w naskórku [30]. Jony metali nie wiążą się kowalencyjnie, lecz tworzą słabe połączenia z resztami aminokwasowymi białek. Hapteny często występują w postaci nieaktywnych pro-haptenów, które wymagają dodatkowego metabolizmu *in vivo* w naskórku. Przykładem jest poliaromatyczny węglowodór dimetylobenzantracen (DMBA), p-fenilenodwuamina oraz substancje fotouczulające, które muszą być aktywowane przez światło UV, by wiązać się z białkami naskórka [31, 32]. Niektóre sole metali ulegają przekształceniu chemicznemu w skórze, np. sześciowartościowa sól chromu przekształcona w trójwartościową staje się wysoce reaktywną formą zdolną wiązać się z białkami [33].

W chwili obecnej nie jest do końca jasne dlaczego niektóre hapteny preferencyjnie dają odpowiedź Th1 lub Tc1 zależną. Hapteny mogą wiązać się z białkami występującymi pozakomórkowo lub mogą się przyłączać do białek powierzchniowych na komórkach, następnie zostać pochłonięte i przetworzone wewnątrz przedziału endosomalno-lizosomalnego i zaprezentowane w kontekście MHC klasy II limfocytom CD4⁺. Natomiast aż kilka mechanizmów może się przyczyniać do tego, że hapteny zostaną zaprezentowane komórkom Tc1. Hapteny hydrofobowe rozpuszczalne w tłuszczach mogą penetrować przez błonę komórkową i łączyć się z białkami w cytoplazmie, a następnie być prezentowane w kontekście MHC klasy I, np. DNFB oraz substancja zawarta w bluszczu trującym - pentadekakatechol [34]. Alternatywnie, hapteny mogą wiązać się do białek pozakomórkowych, które mają odpowiednią konformację cząsteczkową, aby być pochłaniane przez fagolizosomy, a następnie prezentowane przez molekuły MHC klasy I [35]. Ponieważ hapteny łączą się z resztami aminokwasowymi jest również możliwe, że część haptenów może bezpośrednio wiązać się do peptydów wewnątrz rowka wiążącego MHC klasy I lub II, bez wcześniejszego przetwarzania wewnątrzkomórkowego [36, 37]. Z kolei nikiel może zachowywać się jak superantygen i być bezpośrednio wiązany do receptora TCR / MHC, poza rowkiem wiążącym [38, 39, 40].

Hapteny zostały sklasyfikowane ze względu na możliwość wywołania reakcji ACD u człowieka. Silne hapteny (np. OX lub DNFB), zazwyczaj wywołują reakcje nadwrażliwości u wszystkich ludzi. Natomiast większość kontaktowych alergenów zalicza się do słabych

haptenów, które wywołują ACD jedynie u około 5% osób dla soli metali i poniżej 0,01% dla substancji takich jak p-fenylenodwuamina czy eugenol [4]. Nie wiadomo skąd wynika różnica w zdolności haptenów do generowania CHS.

Reakcja nadwrażliwości kontaktowej dla słabych i średnich haptenów może rozwinąć się po latach ciągłej ekspozycji na dany związek uczulający. Natomiast dla silnych haptenów można wywołać reakcję już po pierwszym kontakcie z haptenem tzw. pierwotna ACD. Reakcja ta ma identyczny przebieg jak w klasycznej CHS składającej się z fazy indukcyjnej i efektorowej [41].

1.2.3. POCHŁANIANIE ANTYPGENÓW, DOJRZEWANIE I MIGRACJA KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH.

W reakcji CHS biorą udział dwa rodzaje komórek dendrytycznych (DC, dendritic cells): komórki Langerhansa (LC, Langerhans cells) występujące w naskórku oraz skórne komórki dendrytyczne (DDC, dermal dendritic cells) w skórze właściwej [42]. Jednakże dokładny udział w wywołaniu fazy indukcyjnej oraz fenotyp komórki DDC nie jest do końca poznany. Komórki LC ulegają funkcjonalnej przemianie z komórki rozpoznającej i pochłaniającej antygen w dojrzałą komórkę DC prezentującą antygen, o silnych właściwościach immunostymulujących [43]. W reakcji zależnej od komórek Tc1 komórki dendrytyczne wykazują fenotyp MHC klasy I⁺ / II⁺ [44, 45].

Naskórna aplikacja haptenu jest czynnikiem wywołującym mobilizację i migrację komórek dendrytycznych ze skóry do węzłów chłonnych [46]. Zaledwie po piętnastu minutach od aplikacji haptenu komórki LC zostają pobudzone do syntetyzowania mRNA dla IL-1 β [47]. Wydzielana IL-1 β działa autokrynnie na komórki LC poprzez receptor IL-1RI oraz pobudza keranocyty do syntezy GM-CSF oraz TNF- α , który wiążąc się z receptorem TNF-R2 na komórkach LC jest sygnałem do wędrówki tych komórek z naskórka do węzłów chłonnych [48, 49, 50]. W naskórku komórki LC pozostają w kontakcie z keranocytami za pośrednictwem E-kadheryn. Połączenie TNF- α i IL-1 β z ich receptorami na LC powoduje obniżenie ekspresji E-kadheryn i cząsteczek adhezyjnych w błonie komórkowej LC powodując utratę połączeń z otaczającymi keranocytami oraz nawiązanie interakcji ze strukturami błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej [51, 52]. Jednakże niektóre badania dowodzą, że nadrzędną cytokiną odpowiedzialną za migrację LC aktywowanych haptenem do węzłów chłonnych nie jest IL-1 β i TNF- α lecz IL-18 [53].

Aby LC mogły przejść z naskórka do skóry właściwej i potem do węzłów chłonnych wydzielają enzymy, metaloproteinazy MMP3 i MMP9, które powodują degradację cząsteczek adhezyjnych i trawienie białek błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej [54]. Po rozluźnieniu połączeń z keranocytami, LC wydłużają wypustki dendrytyczne

i „prześlizgują się” między komórkami naskórka w kierunku błony podstawnej [55]. Metaloproteiny są również odpowiedzialne za przejście E-kadheryn i pro-TNF- α w formy aktywne biologicznie. Kiedy LC znajdują się w skórze właściwej następuje wzrost ekspresji receptora chemokinowego CCR7, dla którego ligandami są chemokiny MIP-3 β (CCL19) i CCL21. Interakcja między CCL21 i CCR7 jest niezbędna by komórki LC przedostały się do aferentnych naczyń limfatycznych i dalej jako komórki welonowate dotarły wraz z limfą do strefy przykorowej węzłów chłonnych, gdzie przekształcają się w komórki dendrytyczne splatające [56].

Wspomniane komórki dendrytyczne przetwarzają i prezentują antygen limfocytom T. Antygeny, które powstają wewnątrzkomórkowo są przetwarzane i prezentowane w kontekście MHC klasy I, limfocytom TCR $\alpha\beta$ CD8⁺. Zdenaturowane białka cytoplazmatyczne łączą się z ubikwitiną i w proteasomach są degradowane na peptydy o długości 8 – 10 aminokwasów. Dalej transportowane są przez retikulum endoplazmatyczne, aby połączyć się z MHC I. Transport odbywa się przy udziale produktów genów TAP-1 i TAP-2. Następnie kompleksy peptyd – MHC I są przenoszone na powierzchnię komórki APC przez aparaty Goldiego i prezentowane naiwnym limfocytom T [57].

Obecność w otoczeniu TNF- α i IL-1 β powoduje wzrost ekspresji molekuł adhezyjnych tj. CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), $\alpha 6$ integryny i różnych izoform CD44, które zapewniając interakcje LC z macierzą pozakomórkową umożliwiają migrację komórek LC. Czynniki odpowiedzialne za migrację LC zaangażowane są również w proces dojrzewania tych komórek. Ekspresja receptorów takich jak receptor mannozowy, FcR i CD1a spada podczas dojrzewania komórek LC, jak również zanikają ziarnistości Birbecka, a mechanizm odpowiedzialny za makropinocytozę i fagocytozę antygenów jest blokowany. Dochodzi do wzrostu ekspresji antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I i II, molekuł kostymulujących: CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 i receptorów chemokinowych CCR4, CCR7, CXCR4 na powierzchni LC [58, 59].

1.2.4. AKTYWACJA LIMFOCYTÓW T EFEKTOROWYCH CHS.

Cyrkulujące naiwne limfocyty CD4⁺ i CD8⁺ przechodzą do strefy parakortykalnej węzła chłonnego poprzez kapilary z wysokim śródbłonkiem (HEV) w odpowiedzi na chemokiny wydzielane przez komórki DC [60]. Aktywacja naiwnych limfocytów T wymaga dwóch sygnałów: interakcji receptora TCR z MHC z peptydem w rowku wiążącym oraz sygnału kostymulującego i sekrecji cytokin i chemokin wydzielanych przez komórki DC. Połączenie TCR z kompleksem peptyd – MHC I aktywuje czynnik NF-AT, który reguluje

transkrypcję genu dla IL-2, która jest główną cytokiną odpowiedzialną za proliferację i aktywację komórek T. Fizyczny kontakt między limfocytami T i komórką APC powoduje przebudowę błony komórkowej pozwalając na interakcję receptorów TCR – MHC i połączenie się molekuł kostymulujących. Błona komórkowa dojrzałych DC wykazuje wysoki poziom molekuł niezbędnych do aktywacji limfocytów T. Pośród cząstek zaangażowanych w interakcję komórek DC i limfocytów T znajdują się: CD40L łączący się z CD40 znajdującym się na limfocycie T, integryna CD54 łączącą się z LFA-1 (CD11a/CD18), CD58 łączącą się z CD2 oraz lektyna DC-SIGN (CD209) łączącą się z ICAM-3/2 [61]. Następnie aktywowane limfocyty T proliferują i różnicują się w komórki pamięci oraz komórki $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+$ (Tc1) efektorowe fazy późniejszej reakcji CHS. Komórki efektorowe pojawiają się po około czterech dniach od depozycji haptenu na skórze.

1.2.5. MIGRACJA LIMFOCYTÓW T EFEKTOROWYCH DO KRWI I SKÓRY.

Kiedy limfocyty T zostaną zaktywowane emigrują z węzłów chłonnych przez eferentne naczynia limfatyczne do krwioobiegu, co jest związane z wydzielaniem chemokin i modyfikacją ekspresji receptorów dla adresyn. Uczulone limfocyty T mogą stać się komórkami efektorowymi, które migrują do miejsca zapalenia lub komórkami pamięci, które cyrkulują w organizmie nawet latami aż przy kolejnym kontakcie z haptenem staną się komórkami efektorowymi.

Powstają dwa typy komórek T pamięci. Pierwszy rodzaj komórek pamięci obwodowej stanowią komórki T nie posiadające receptora CCR7. Są to limfocyty, które występują w skórze i krwi, natomiast nie mogą recyrkulować do węzłów chłonnych. Przy kolejnym kontakcie z haptenem, działają natychmiast jako komórki efektorowe wydzielając IFN- γ . Migracja komórek T z krwi do skóry zachodzi przez kapilary HEV poprzez interakcje między receptorami CLA i CCR4 z ich ligandami E- i P-selektyną oraz TARC (CCL17) znajdującymi się na komórkach endotelialnych. Konieczna jest również interakcja między VLA-4 i LFA-1 na limfocycie T z VCAM-1 i ICAM-1 na komórkach endotelialnych [62]. Drugi rodzaj pamięci, to pamięć centralna, związana z limfocytami T, które posiadają receptor CCR7 i mają zdolność recyrkulacji do węzłów chłonnych, lecz nie mogą być rekrutowane do tkanek. Limfocyty te mają za zadanie stymulować komórki dendrytyczne i przy kolejnym kontakcie z antygenem przekształcają się w komórki CCR7^- [63].

1.2.6. FAZA EFEKTOROWA REAKCJI CHS.

Faza efektorowa reakcji CHS rozwija się lokalnie w miejscu wywołania reakcji tj. po powtórnej aplikacji haptenu w innym miejscu niż w czasie immunizacji. W reakcji tej można wyróżnić dwie kolejno po sobie występujące fazy: fazę wczesną występującą już dwie godziny od kolejnego kontaktu z haptenem, gdzie kluczową rolę odgrywają inicjujące limfocyty B-1, które pod wpływem IL-4 uwalnianej przez limfocyty NKT wydzielają przeciwciała IgM oraz fazę późną rozwijającą się po około 24 godzinach, a mediowaną przez efektorowe limfocyty $T\alpha\beta^+$ [64].

W modelu reakcji CHS indukowanej haptenem TNP zależnej od komórek Th1 $CD4^+$, wytworzone po uczuleniu przeciwciała IgM anty-TNP swoiście reagują z haptenem ponownie aplikowanym na skórę, tworząc kompleksy immunologiczne aktywujące układ dopełniacza na drodze klasycznej [65, 66]. W trakcie aktywacji komplementu dochodzi do powstania między innymi fragmentu C5a, który poprzez receptory znajdujące się w błonie komórkowej aktywuje mastocyty i płytki krwi prowadząc do uwolnienia wielu czynników naczynioruchowych takich jak: serotonina, cytokiny (TNF- α , GM-CSF), chemokiny oraz leukotrieny (LT) i prostaglandyny PGD_2 [1, 67, 68]. Czynniki te stymulują endotelium do ekspresji molekuł adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, co ułatwia toczenie się, adhezję i przechodzenie krążących limfocytów T do miejsca zapalenia [69]. Limfocyty B-1 dodatkowo rekrutują do miejsca zapalenia limfocyty $T\gamma\delta^+$, które prawdopodobnie powstają w śledzionie podczas fazy indukcyjnej i są komórkami asystującymi limfocytom $T\alpha\beta$ efektorowym [70, 71]. Ich funkcja nie jest do końca jasna, ale wiadomo, że są komórkami niezbędnymi do rozwinięcia się pełnej odpowiedzi zapalnej. W modelu reakcji CHS zależnej od limfocytów Tc1 $CD8^+$ zachodzą takie same procesy inicjujące fazę efektorową jak w modelu Th1 zależnym [27, 28, 72, 73, 74].

Przyciąganie cyrkulujących limfocytów T z naczyń następuje dzięki interakcji L-selektyny i receptorów zasiedlania CLA (cutaneous lymphocyte-associated antygen) na limfocycie T z P- i E-selektyną na komórkach śródbłonka, co powoduje toczenie się limfocytów po śródbłonku [75]. Adhezja komórek T do śródbłonka następuje dzięki interakcji integryny LFA-1 (CD11a/CD18) z receptorem ICAM-1 (CD54) na śródbłonku i VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) z VCAM-1. To powoduje zatrzymanie komórek T na śródbłonku, które następnie migrują do skóry właściwej i dalej do miejsca depozycji haptenu [76].

Limfocyty Tc1 efektorowe po rozpoznaniu antygeny w kontekście MHC klasy I na komórkach LC uwalniają wiele cytokin. W tym m.in.: IFN- γ , który wzmacnia produkcję w skórze: IP-10, IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF i MIP-2 (CXCL8), które wywołują masywny napływ neutrofilów, komórek DC oraz monocytów, które przekształcają się w makrofagi

[77, 78]. IFN- γ wydzielany przez limfocyty CD8⁺ aktywuje miejscowo występujące makrofagi i powoduje uwalnianie wolnych rodników tlenowych (ROI's).

Obecność haptenu nie tylko powoduje rekrutację komórek efektorowych T, ale także aktywuje komórki rezydujące w skórze, m.in. keranocyty, które są głównym źródłem GM-CSF, TNF- α i IL-1 [79]. Keranocyty wydzielają także chemokinę CXCL1, która jest chemoatraktantem dla neutrofilów. Intensywność napływu neutrofilów wpływa na ilość limfocytów efektorowych Tc1, które są rekrutowane do miejsca zapalenia, a tym samym wpływa to na intensywność reakcji CHS [80]. Według ostatnich badań miejscowo występujące mastocyty, są ważnymi komórkami regulatorowymi odpowiedzialnymi za wzmocnienie zapalenia. Mastocyty produkują TNF- α i MIP-2, które są niezbędne do rekrutacji neutrofilów [72]. Niektóre doniesienia mówią także, że oprócz IFN- γ ważną rolę w reakcji CHS odgrywa IL-17A, która jest produkowana przez komórki CD8⁺ T_{IL-17}. Cytokina ta prawdopodobnie jest odpowiedzialna za rekrutację neutrofilów do miejsca zapalenia [81, 82].

Ponadto w trakcie reakcji CHS, komórki CD8⁺ manifestują swoją cytotoksyczność poprzez interakcję białek Fas / FasL oraz wyrzut perforyn i grzymów [16, 83, 84]. Głównym celem ataku cytotoksycznego są keranocyty znajdujące się w miejscu zapalenia, które giną na drodze apoptozy [85]. Uszkodzenie naskórna ułatwia penetrację haptenu obecnego w skórze, który wzmacnia zapalenie. Perforyny, uwolnione przez limfocyty CD8⁺ przyczyniają się do produkcji RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β , które mediuje rekrutację monocytów i granulocytów [86].

Wynikiem opisanych zmian w miejscu reakcji jest zaczerwienienie i obrzęk. Natomiast za powolne ustępowanie objawów zapalenia odpowiedzialne są komórki T regulatorowe CD4⁺, które limitują uszkodzenia.

1.3. REGULACJA REAKCJI NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Reakcja CHS mediowana przez komórki Tc1 CD8⁺, które wydzielają IFN- γ jest negatywnie regulowana przez limfocyty T CD4⁺, co zostało potwierdzone w wielu ośrodkach naukowych w różnych modelach zwierzęcych, m.in. odpowiedź myszy szczepu BALB/c na hapteny DNFB i OX czy też reakcja u myszy szczepu C57BL/6 na immunizację TNCB lub DNFB [18, 87, 88, 89, 90]. Komórki regulacyjne (Treg) CD4⁺ regulują zarówno długość i nasilenie reakcji CHS i działają w fazie indukcyjnej i efektorowej odpowiedzi.

Wykazano, że komórki CD8⁺ produkują IL-2, która jest niezbędna dla funkcjonowania komórek Treg CD4⁺CD25⁺ [91].

Komórki T efektorowe (Tef) CD8⁺ oraz komórki Treg CD4⁺ powstają w fazie indukcyjnej reakcji CHS poprzez kontakt z tymi samymi komórkami prezentującymi antygen. Jednakże komórki Treg CD4⁺ i Tef CD8⁺ powstają niezależnie od siebie [19, 92]. Inne badania wykazały, że komórki DC, które aktywują komórki regulacyjne muszą posiadać na swojej powierzchni antygeny zgodności tkankowej MCH klasy II [45]. Najnowsze badania nad regulacją reakcji CHS wykazały, że komórka regulacyjna ma fenotyp CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ oraz że jest aktywowana w fazie indukcji podczas immunizacji haptenem. W fazie indukcji odpowiedzi komórki Treg eliminują komórki DC na drodze apoptozy zależnej od interakcji Fas-FasL, ograniczając tym samym indukcję komórek Tef CD8⁺ [93]. Dojrzałe komórki DC, prezentujące pochłonięte kompleksy haptenu-białko w węzłach chłonnych wykazują ekspresję molekuly Fas, podczas gdy populacja komórek Treg posiada receptor FasL. Konsekwencją interakcji Fas - FasL jest spadek ilości komórek DC zdolnych do indukcji komórek Tef [94, 95]. W innym ośrodku naukowym wykazano, że reakcja CHS na haptenu DNFB jest regulowana przez komórki Treg antygenowo swoiste, które mają wysoką ekspresję markera ICOS i wydzielają IFN- γ , IL-10 oraz IL-17 [96].

Inne badania wykazały, że komórki regulacyjne znajdujące się w węzłach chłonnych hamują reakcję CHS w fazie indukcji poprzez nawiązanie szczelinowych połączeń międzykomórkowych z komórkami DC (gap junctions). Komunikacja ta powoduje przepływ przekazników m.in. cAMP i jonów wapnia, co powoduje obniżenie ekspresji molekuł kostymulujących CD86 na powierzchni komórek DC znosząc aktywację i proliferację limfocytów T CD8⁺ [97].

Z kolei Gorbachev i wps. wykazali, że monoklonalne przeciwciało anti-CD154 powoduje zahamowanie rozwoju komórek CD8⁺. Reakcja ta nie polega na bezpośrednim blokowaniu interakcji między białkiem kostymulującym CD40 obecnym na komórkach DC, a receptorem CD154 obecnym na komórkach T, lecz mechanizm ten jest związany z pośrednim oddziaływaniem mAb-anti-CD154 na komórki regulatorowe, które ograniczają zdolność komórek DC do aktywowania komórek T CD8⁺ [98].

W fazie efektorowej CHS następuje szybka rekrutacja komórek CD8⁺ Tef, a następnie obserwowany jest powolny napływ komórek CD4⁺ Treg, odpowiedzialnych za hamowanie objawów zapalenia. Różny przyływ limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ może wynikać z różnej ekspresji receptorów chemokinowych. Rekrutacja komórek Tc1 jest pod kontrolą IP-10 (CXCL10). Natomiast rekrutacja limfocytów CD4⁺ jest pod kontrolą MDC (CCL22) oraz TARC (CCL17) i ich receptora CCR4 na aktywowanych limfocytach T CD4⁺ [61].

Komórki Treg $CD4^+CD25^+$ w fazie efektorowej reakcji CHS Tc1 zależnej, wywołanej haptenem TNCB hamują reakcję zapalną ograniczając napływ leukocytów do miejsca toczącej się reakcji zapalnej. Ograniczenie napływu leukocytów do miejsca zapalenia jest wynikiem upośledzenia procesu toczenia i przylegania leukocytów do komórek śródbłonka naczyń [90]. Wykazano również, że kontakt bezpośredni między komórką Tef, a komórką Treg nie jest konieczny dla osiągnięcia supresji, natomiast niezbędna jest obecność IL-10. Możliwe jest, że IL-10 hamuje interakcje adhezyjne leukocyt / endotelium poprzez spadek ekspresji E-selektyny lub powoduje spadek wydzielania TNF- α w miejscu zapalenia, co następnie ogranicza ekspresję ICAM-1 na śródbłonku. Kolejne badania tego samego zespołu wykazały, że naturalnie występujące komórki Treg $CD4^+CD25^+$ hamują reakcję CHS w fazie efektorowej poprzez uwalnianie adenozyiny w wyniku interakcji CD39 / CD73. Adenozyina hamuje ekspresję E- i P-selektyny uniemożliwiając tym samym adhezję leukocytów do śródbłonka [99].

Badania w modelu Tc1-zależnej CHS indukowanej haptenem OX wykazały, że istnieją dwie populacje komórek Treg $CD4^+CD25^+$ i $CD4^+CD25^-$ Tr1. Komórki Treg $CD4^+CD25^+$ wymagają bezpośredniego kontaktu z komórką Tef, lecz same nie wydzielają cytokin. Natomiast komórki te aktywują inną populację komórek regulacyjnych, zwaną komórkami Tr1, które wydzielają IL-10 oraz TGF- β [100]. W ludzkim modelu reakcji CHS na nikiel dowiedziono, że komórki regulacyjne Tr1, poprzez wydzielanie IL-10 blokują dojrzewanie i różnicowanie komórek DC oraz hamują produkcję IL-12 [101]. Inne publikacje donoszą, że komórka regulacyjna Tr1 $CD4^+$ działa poprzez wydzielanie IL-4 oraz IL-10 [77, 102].

Kolejnym mechanizmem regulującym negatywnie odpowiedź CHS jest supresja wywołana poprzez naskórną (EC) aplikację antygeny białkowego. Badania nad naskórną indukowaną supresją są prowadzone w Katedrze Biologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum i zostaną szczegółowo omówione w rozdziale 1.4.

W literaturze światowej jest niewiele doniesień na temat pozytywnej regulacji reakcji CHS zależnej od komórek Tc1. Wiadomo jedynie, że podanie mAb anti-IL-12 powoduje zahamowanie reakcji Tc1 zależnej, sugerując że IL-12 ma istotną rolę w indukowaniu reakcji CHS [103]. Późniejsze badania potwierdziły tę hipotezę, udowadniając, że podawanie IL-12 podczas immunizacji haptenem znosi efekt supresyjny komórek Treg $CD4^+$ powodując nasilenie i przedłużenie czasu trwania reakcji CHS [104].

Powszechnie wiadomo, że podanie antygeny na błony śluzowe lub drogą pokarmową, poza wywołaniem lokalnej odpowiedzi immunologicznej na śluzówkach prowadzi jednocześnie do powstania stanu tolerancji na obwodzie. Zjawisko to leży u podstaw tolerancji śluzówkowej (np. tolerancja pokarmowa) i zabezpiecza organizm przed indukcją odpowiedzi na antygeny niepatogenne. Doustne podanie niskiej dawki antygeny prowadzi do wystąpienia aktywnej supresji, natomiast traktowanie wysoką dawką antygeny prowadzi do anergii klonalnej i deplecji limfocytów efektorowych [105]. Odmianą tolerancji śluzówkowej jest supresja wywołana podaniem antygeny donosowo. Jej mechanizm wydaje się być podobny do tego, który występuje w przypadku tolerancji pokarmowej.

W wielu modelach zwierzęcych, stanowiących odpowiedniki ludzkich chorób autoimmunizacyjnych, bada się wpływ podawania autoantygenów drogą pokarmową na rozwój choroby. Stwierdzono, że podanie odpowiednich antygenów *per os* prowadzi do złagodzenia przebiegu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia rdzenia kręgowego i mózgu (EAE), eksperymentalnego zapalenia stawów (CIA), eksperymentalnego zespołu antyfosfolipidowego, eksperymentalnej insulinozależnej cukrzycy (IDDM), eksperymentalnej autoimmunologicznej miastonii (EAMG) oraz eksperymentalnego zapalenia nerwów obwodowych (EAN). Jednakże określenie mechanizmu tolerancji pokarmowej jest trudne, ze względu na różny wiek testowanych zwierząt, podłoże genetyczne, rodzaj mikroflory bakteryjnej, dawkę oraz strukturę podawanego antygeny. Skuteczność doustnego lub donosowego podania antygeny w terapii testowano także u chorych na stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie błony naczyniowej oka oraz u pacjentów z alergią na nikiel [106].

Metale ciężkie takie jak nikiel czy chrom mogą wywołać reakcję CHS. Wykazano, że można wytworzyć tolerancję pokarmową na te metale w modelu zwierzęcym u myszy oraz świnek morskich. Wytworzone komórki Treg należą do populacji limfocytów T CD8⁺, są antygenowo swoiste i można je „przeszczepić” do naiwnych biorców. Stan areaktywności immunologicznej utrzymuje się minimum przez okres dwóch lat [107, 108]. U chorych z alergią na nikiel zaobserwowano osłabienie objawów chorobowych na skutek spadku ilości limfocytów T reaktywnych [109].

Dotychczasowe badania nad tolerancją pokarmową wykazały, że karmienie szczurów rasy Lewis małymi dawkami zasadowego białka mieliny (MBP) hamuje rozwój EAE powodując powstanie komórek regulacyjnych CD8⁺, które hamują komórki efektorowe Th1. Badania te potwierdzono na myszach transgenicznym, gdzie wykazano, że

powstające komórki regulacyjne należą do populacji CD8⁺ jak również CD4⁺. Opisane komórki regulacyjne są identyczne pod względem budowy TCR oraz restrykcji MHC komórek efektorowych Th1, lecz wydzielają cytokiny przeciwzapalne (TGF-β, IL-4, IL-10), które hamują działanie komórek efektorowych [110, 111].

Inne badania wykazały, że doustne podanie niskiej dawki DNFB, poprzedzające skórną immunizacją DNFB powoduje zahamowanie reakcji CHS poprzez wytworzenie komórek regulacyjnych CD4⁺, które osłabiają rozwój komórek CD8⁺ Tef w węzłach chłonnych [17].

Podawanie dużych dawek antygeny drogą pokarmową powoduje przenikanie antygeny do krążenia w postaci natywnej lub jedynie częściowo zmienionej. U myszy traktowanych dużymi dawkami owoalbuminy (OVA) obserwuje się delecję klonów antygenowo swoistych limfocytów T. Ponadto pod wpływem dużych dawek antygeny powstają limfocyty regulacyjne CD4⁺, które są nieswoiste antygenowo, wykazują dużą ekspresję molekuly FasL oraz wydzielają IL-10 i TGF-β. Prawdopodobnie komórki te powstają w wątrobie lub tkance limfatycznej przewodu pokarmowego (GALT) [112].

Z kolei w zwierzęcym modelu kolagenowego zapalenia stawów (CIA), podanie kolagenu typu II (COLL II) drogą pokarmową przed wywołaniem choroby, powoduje powstanie w kępkach Payera limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Wspomniane komórki regulacyjne hamują syntezę IFN-γ oraz przeciwciał IgG2a, przy jednoczesnym wzroście produkcji przeciwciał o izotypie IgG1. Ponadto u zwierząt traktowanych COLL II zaobserwowano powstawanie limfocytów Th2, produkujących IL-4 i IL-10 oraz limfocytów Th3 wydzielających TGF-β [113]. Podobne efekty zaobserwowano podczas podania COLL II myszom drogą donosową [114]. Niestety pozytywne wyniki badań na zwierzętach nie przyniosły efektów u ludzi. Prawdopodobnie obserwowany brak efektu spowodowany jest różną budową układu pokarmowego, inną budową COLL II w zależności od gatunku, jak również może wynikać z różnic w dawce podawanego antygeny [115].

1.5. TOLERANCA IMMUNOLOGICZNA INDUKOWANA NASKÓRNĄ APLIKACJĄ ANTYGENU BIAŁKOWEGO

Skórę przez szereg lat traktowano jako miejsce, w którym stosunkowo łatwo można indukować silną odpowiedź immunologiczną, której klasycznym przykładem jest reakcja CHS, podczas gdy skórze jako miejscu, w którym można indukować tolerancję nie poświęcano większej uwagi [25]. Ponieważ skóra i błony śluzowe mają podobną funkcję

w organizmie, jest prawdopodobne, że EC aplikacja antygeny poza wywołaniem lokalnej odpowiedzi immunologicznej może również indukować stan tolerancji na obwodzie przy spełnieniu określonych warunków immunizacji. Wykazano, że u myszy EC podanie białka OVA prowadzi do wywołania alergicznego zapalenia skóry przy udziale limfocytów Th2 wydzielających IL-4 [116]. Ponadto wykazano, że immunizacja antygenem białkowym prowadzi do rozwoju astmy u myszy [117]. W oparciu o wspomniane obserwacje można przypuszczać, że aplikacja antygeny białkowego na skórę przy spełnieniu odpowiednich warunków immunizacji może indukować postawanie komórek T produkujących cytokiny przeciw zapalne, zdolne do zahamowania odpowiedzi Th1 zależnej.

Badania prowadzone od kilku lat w Katedrze Biologii Medycznej UJ CM wykazały, że faktycznie EC aplikacja antygeny białkowego w postaci opatrunku z gazy lub emulsji w kremie wywołuje stan tolerancji, prowadzący do zahamowania odpowiedzi komórkowej na TNP w modelu CHS $CD4^+$ Th1 zależnej [118, 119, 120, 121]. Supresja reakcji CHS wywołana EC podaniem antygeny białkowego nie wykazuje swoistości antygenowej i jest wynikiem działania limfocytów $TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^+$ wywierających swoje działanie regulacyjne za pośrednictwem uwalnianego TGF- β [122].

Dalsze badania prowadzone w modelach zwierzęcych schorzeń autoimmunizacyjnych wykazały, że EC aplikacja antygeny białkowego hamuje rozwój oraz łagodzi przebieg EAE [123, 124, 125, 126] oraz CIA [127, 128]. Co więcej supresja indukowana poprzez skórę jest równie skuteczna w spowolnieniu reakcji odrzucania przeszczepu [129]. Skuteczność naskórnego podania antygeny w terapii testowano także u chorych na stwardnienie rozsiane (MS). Pacjentom aplikowano naskórnymi peptydy mieliny, co powodowało aktywację komórek LC w skórze oraz powstanie unikalnej populacji komórek DC w węzłach chłonnych. Ponadto obserwowano powstanie Treg1, które silnie hamowały autoreaktywne limfocyty T skierowane przeciw antygenom mieliny, uwalniając IL-10 i ograniczając produkcję IFN- γ i TGF- β [130].

We wszystkich opisanych układach badanych testowano skuteczność EC indukowanej tolerancji w negatywnej regulacji odpowiedzi CHS $CD4^+$ Th1 zależnej. W chwili obecnej nie jest wiadome, czy EC aplikacja antygeny białkowego jest w stanie negatywnie regulować odpowiedź komórkową zależną od limfocytów $CD8^+$ Tc1. W związku z tym, w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę oceny skuteczności EC indukowanej supresji w hamowaniu $CD8^+$ Tc1 zależnej reakcji CHS [131, 132].

1. Sprawdzenie hipotezy: „Czy możliwe jest zahamowanie reakcji nadwrażliwości kontaktowej Tc1 CD8⁺ zależnej, poprzez naskórną aplikację antygeny białkowego DNP-BSA skoniugowanego z albuminą bydlęcą i określenie optymalnej dawki antygeny, która hamuje reakcję zapalną.
2. Próba przeniesienia stanu tolerancji immunologicznej na naiwnych syngenicznych biorców za pomocą komórek narządów limfatycznych wyizolowanych od dawców EC toleryzowanych antygenem białkowym DNP-BSA oraz określenie minimalnej ilości komórek zdolnych do hamowania reakcji CHS.
3. Określenie fenotypu i swoistości antygenowej komórek odpowiedzialnych za zjawisko EC indukowanej tolerancji oraz ocena czasu trwania wywołanej supresji.
4. Określenie mechanizmu EC indukowanej supresji.

3.1.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE.

W doświadczeniach wykorzystano samce i samice szczepu BALB/c (haplotyp H-2^d) i szczepu C57BL/6 (haplotyp H-2^b), które pochodziły ze zwierzętarni Katedry Biologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Wykorzystano również samce i samice szczepu B10.PL (haplotyp H-2^u) oraz wywodzące się z niego szczepy defektywne: TCR δ ^{-/-} (myszy nie posiadające limfocytów T z receptorem TCR $\gamma\delta$), CD1d^{-/-} (myszy nie posiadające limfocytów NKT CD1d zależnych), oraz β_2m (myszy, u których brak limfocytów CD8⁺). Wymienione szczepy były darem Dr C. A. Janeway, Jr. (Yale University School of Medicine, Howard Hughes Medical Institute, New Haven, CT, USA).

Wszystkie myszy były w wieku 8-10 tygodni, były karmione jałową paszą Labofeed H z wytwórni pasz „Morawski” i pojone autoklawowaną wodą. Badania były prowadzone zgodnie z wymogami Komisji Bioetycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Jagiellońskiego, na podstawie zezwolenia nr Zi/299/2006. Każda badana grupa eksperymentalna zwierząt składała się średnio z pięciu myszy, a doświadczenia powtarzano trzykrotnie.

Zwierzęta doświadczalne były poddawane narkozie Vetbutalowej do procedur przyżyciowych oraz eutanazji.

3.1.2. ODCZYNNIKI.

[³H]-tymidyna (Lacomed, Rez, RC, USA); 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB; Sigma, St. Louis, MO, USA); 2-merkaptotanol (Sigma, St. Louis, MO, USA); aceton (Chempur, Piekary Śląskie, Polska); aminokwasy (NEAA; Gibco, Grand Island, NY, USA); błękit Evans’a (Evans blue; Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA); błękit trypanu (Gibco, Grand Island, NY, USA); bufor HEPES (Gibco, Grand Island, NY, USA); formamid (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA); hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); KH₂PO₄ bezwodny (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA); króliczy

dopełniacz o niskiej toksyczności (RC; Pel-Freeze Biologicals, Brown Deer, WI, USA); kwas pirogronowy (PA; Sigma, St. Louis, MO, USA); L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA); mAb anty-mysie / szczurze Foxp3-APC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); mAb anty-mysie CD152 (CTLA-4) (Biolegend, San Diego, CA, USA); mAb anty-mysie CD25-PE IL-2R α , p55 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); mAb anty-mysie CD4-PE-Alexa Fluor 610 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA); mAb anty-mysie TCR β -FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); mAb chemiczne IgG – kontrola izotypowa (Biolegend, San Diego, CA, USA); Na₂HPO₄ x 7 H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); oliwa z oliwek Extra Vergine (Costad'Oro, Spoleto, Włochy); ortodianizynodihydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); penicylina i streptomycyna (Gibco, Grand Island, NY, USA); perhydrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); płodowa surowica cielęca (FCS; PAA Laboratories, Pasching, Austria); podłoże hodowlane RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA); standard dla białka (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy); standard dla MPO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna bez jonów Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺ (DPBS; Sigma, St. Louis, MO, USA); zestaw do separacji mysich komórek T CD4⁺CD25⁺ (Miltenyi BioTek GmbH, Auburn, CA, USA).

3.1.3. ANTYGENY BIAŁKOWE.

Albumina surowicy bydlęcej skoniugowana z dwunitrofenylem (DNP-BSA; Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA, USA), współczynnik podstawienia wynosi 31 cząsteczek DNP na jedną molekułę BSA (DNP₃₁-BSA); białko jaja kurzego (OVA - owoalbumina; ovalbumin, grade V; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); białko zasadowe mieliny z rdzenia kręgowego i mózgu świnki morskiej (MBP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz immunoglobuliny mysie skoniugowane z oksazolonem (OX-Ig; OX - 4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Immunoglobuliny (Ig) zostały wyizolowane z surowicy szczepu myszy CBA/J metodą McKinney'a i Parkinson'a [133], a następnie wyznakowane haptenem OX według metody opracowanej przez Eisena'a [134]. Uzyskane w ten sposób Ig, wyznakowane OX posiadały współczynnik podstawienia 20 cząsteczek OX na jedną molekułę Ig (OX₂₀-Ig). Procedurę znakowania mysich Ig wykonał dr hab. n. przyr. Krzysztof Bryniarski z Katedry Immunologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum.

3.1.4. PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE WYKORZYSTANE W EKSPERYMENTACH OCENIAJĄCYCH FENOTYP KOMÓRKI REGULACYJNEJ.

Do selekcji negatywnej użyto przeciwciała monoklonalne (mAb) anty-mysie oczyszczone na białku A (protein A) [135] uzyskane z supernatantów produkowanych przez następujące linie komórkowe: anty-TCR β (klon H57-597) otrzymane od Dr R. Kubo (Cytel Inc., La Jolla, CA., USA); anty-TCR δ (klon UC7-13D5) uzyskane od Dr J. Bluestone (University of California, San Francisco, CA., USA); anty-CD4 (klon TIB 207) i anty-CD8 (klon TIB 105.3) będące darem Dr C. A. Janeway, Jr. (Yale University School of Medicine, Howard Hughes Medical Institute, New Haven, CT. USA). Wymienione mAb były wyprodukowane przez dr hab. n. przyr. Krzysztofa Bryniarskiego oraz dr Marię Ptak z Katedry Immunologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Ponadto użyto przeciwciała anty-mysie CD25, IL2-R łańcuch α , p55 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.1.5. ODCZYNNIKI ZASTOSOWANE DO POMIARU STĘŻENIA CYTOKIN W TEŚCIE ELISA.

Do oznaczeń cytokin użyto następujących zestawów: zestaw do pomiaru stężenia IFN- γ (BD OptEIA Set Mouse IFN- γ ; BD Biosciences San Diego, CA, USA); zestaw do pomiaru stężenia IL-4 (BD OptEIA Set Mouse IL-4; BD Biosciences San Diego, CA, USA); zestaw do pomiaru stężenia IL-10 (BD OptEIA Set Mouse IL-10; BD Biosciences San Diego, CA, USA); zestaw do pomiaru stężenia IL-12 (BD OptEIA Set Mouse IL-12 (p40); BD Biosciences San Diego, CA, USA); zestaw do pomiaru stężenia IL-13 (DuoSet ELISA mouse IL-13; R&D Systems Inc., McKinley Place, NE, USA); zestaw do pomiaru stężenia IL-17E (DuoSet ELISA mouse IL-17E; R&D Systems Inc., McKinley Place, NE, USA) oraz zestaw do pomiaru stężenia TNF- α (BD OptEIA Set Mouse TNF- α ; BD Biosciences, San Diego, CA, USA);

W oznaczeniach poziomu TGF- β użyto następujących przeciwciał: mAb anty-TGF- β 1 opłaszczające szczurze anty-mysie, anty-ludzkie, anty-świńskie (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) i mAb anty-TGF- β detekcyjne biotynylowane szczurze anty-mysie, anty-ludzkie, anty-świńskie (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Dodatkowo wykorzystano: H₂SO₄ (Chempur, Piekary Śląskie, Polska); HCl (Chempur, Piekary Śląskie, Polska); NaHCO₃ (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA); NaOH (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA); streptawidyna znakowana peroksydazą chrzanową HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); substrat TMB do testu ELISA (BD OptEIA; BD Biosciences, San Diego, CA, USA);

TGF- β 1 standard (R&D Systems Inc., McKinley Place, NE, USA); Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.1.6. MATERIAŁY I APARATURA.

Jałowy sprzęt jednorazowy wykonany z plastiku: probówki, pipety, szalki Petriego (Sarstedt, Nümbrecht, Germany); kolumny MD i MS do separacji magnetycznej (Miltenyi BioTec Inc., Auburn, CA, USA); komora Bürkera do liczenia komórek (Fein Optik, Wiedeń, Austria); okrągłodenne 96-dołkowe płytki hodowlane (BD Falcon, Franklin Lakes, NY, USA); opatrunek z gazy (DuoDerm Extra Thin; ConvaTec, Princeton, NJ, USA); plaster (3M Viscoplast S.A., Polska); płytki do hodowli komórkowej 75 mm, z insertem z półprzepuszczalnej błony o średnicy porów 0,4 μ m (Costar Corning Inc., Corning, NY, USA); płytki do pomiaru absorbancji 96-dołkowe MaxiSorp (NUNC Thermo Fisher Scientific Inc, Rochester, NY, USA); płytki do pomiaru białka 96-dołkowe (NUNC Thermo Fisher Scientific Inc, Rochester, NY, USA); płytki z płaskim dnem do hodowli komórkowych 24-dołkowe (BD Falcon, Franklin Lakes, NY, USA); śruba mikrometryczna (Mitutoyo, Tokyo, Japan); wycinak do pobierania wycinków tkankowych - biopsy punch 0,6 mm (Fray Products Corp., Buffalo, NY, USA);

Cytofluorymetr przepływowy (FACS Calibur S, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA); czytnik absorbancji Syngery HT (Miltenyi BioTek Inc., Auburn, CA, USA); inkubator CO₂ (Heraeus Instruments, Hannau, Niemcy); komora laminarna do pracy jałowej (Heraeus Instruments, Hannau, Niemcy); licznik scyntylicyjny promieniowania β (Liquid scintillation counter 1205; Wallac, Waltham MA, USA); łożnia wodna (DHN sp. z o.o., Warszawa, Polska); magnes do separacji MidiMACS (Miltenyi BioTek Inc., Auburn, CA, USA); mikroskop optyczny (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany); urządzenie do zbierania komórek w teście proliferacji (Combi Cell Harvester; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA); vortex (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Niemcy); waga analityczna (Sartorius AG, Goettingen, Germany); wirówka z chłodzeniem (Heraeus Instruments, Hannau, Niemcy); zamrażarka wysokiego mrożenia (Sanyo GmbH, Niemcy).

3.2.1. INDUKCJA STANU TOLERANCJI PRZEZ NASKÓRNĄ (EC) APLIKACJĘ ANTYGENU BIAŁKOWEGO.

W grupie myszy, w której wywoływano stan tolerancji, w dniu „0” na ogoloną skórę grzbietu aplikowano opatrunek z gazy o powierzchni 1 cm² nasączony 100 µl roztworu antygeny białkowego DNP-BSA (albumina surowicy bydlęcej skoniugowana z dwunitrofenylem) rozpuszczonego w DPBS w ilości 100 µg / mysz. Dodatkowo dołączono grupę myszy, której w opatrunku aplikowano wyłącznie 100 µl / mysz DPBS. Grupa ta stanowiła kontrolę pozytywną. Opatrunki zostały przymocowane do grzbietu za pomocą plastra i pozostawione przez cztery dni. Po usunięciu opatrunków zastępowano je świeżymi gazikami z antygenem, które pozostawiono przez kolejne trzy dni.

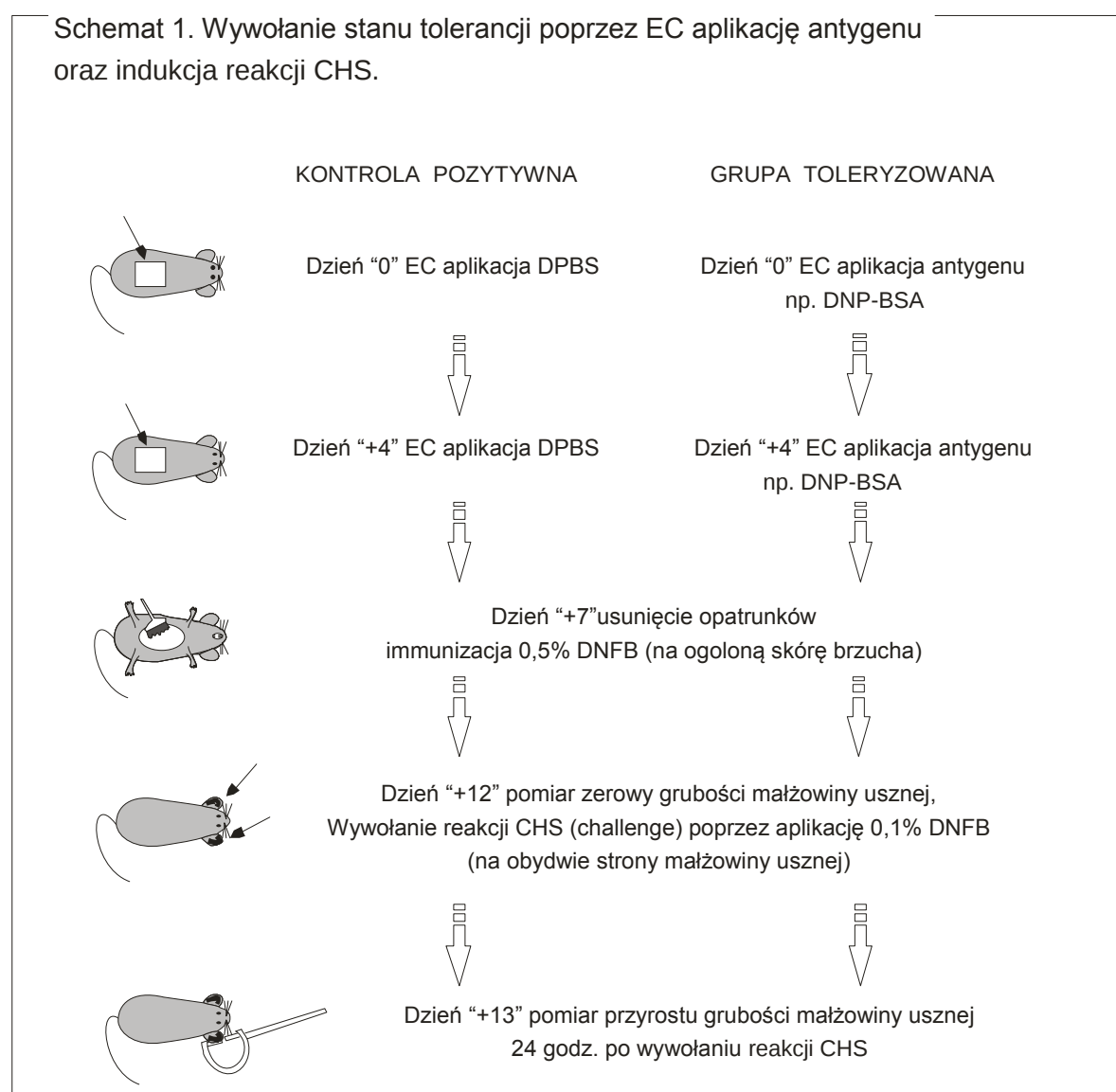
W doświadczeniach określających swoistość antygenową wywoływanej supresji, zwierzętom aplikowano w opatrunku 100 µg / mysz DNP-BSA, OVA (białko jaja kurzego), MBP (białko zasadowe mieliny) lub OX-Ig (immunoglobuliny mysie skoniugowane z oksazolonom) w 100 µl DPBS przez okres siedmiu dni.

W dniu „+7” opatrunki zostały zdjęte, a zwierzęta aktywnie uczulano haptenem DNFB w celu wywołania reakcji nadwrażliwości kontaktowej (procedura 3.2.2.) lub pobierano narządy limfatyczne (procedura 3.2.7.). Przebieg doświadczenia przedstawiono na Schemacie 1.

3.2.2. WYWOŁANIE I POMIAR REAKCJI NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ (CHS) Tc1 CD8⁺ ZALEŻNEJ *IN VIVO* U MYSZY.

Po tygodniowej toleryzacji antygenem białkowym bądź traktowaniu samym DPBS, (dzień „+7”, Schemat 1) myszy aktywnie uczulano haptenem w celu indukcji reakcji CHS. W tym celu po usunięciu opatrunków, na ogoloną skórę brzucha o powierzchni 2 cm², zwierzętom aplikowano 25 µl haptenu DNFB (dinitrofluorobenzen) o stężeniu 0,5% rozpuszczonego w roztworze aceton:oliwa z oliwek (w stosunku 4:1). Pięć dni później (dzień „+12”, Schemat 1) myszy ponownie eksponowano na haptenu wywołując fazę efektorową CHS (tzw. challenge) podając zwierzętom na każdą stronę małżowiny usznej 5 µl haptenu DNFB o stężeniu 0,1% rozpuszczonego z roztworze aceton:oliwa z oliwek (w stosunku 4:1). Po upływie 24 godz. dokonywano pomiaru przyrostu grubości małżowiny usznej za pomocą śruby mikrometrycznej. Pomiar zerowy wykonywano tuż przed podaniem haptenu na uszy [44, 136, 137]. Wyniki wyrażono w jednostkach $\times 10^{-2}$ mm $\pm$ SE.

Nieswoistą reakcję zapalną uszu określano u zwierząt naiwnych, które stanowiły kontrolę negatywną, u których wywoływano reakcję efektorową (challenge). W tej grupie myszom aplikowano na skórę brzucha wyłącznie roztwór aceton:oliwa, a następnie podawano im hapten DNFB na uszy (wywołanie tylko fazy efektorowej CHS). Grupa kontroli negatywnej była dołączona do wszystkich niżej opisanych eksperymentów. Przyrost grubości małżowiny usznej w kontroli negatywnej po 24 godz. od aplikacji haptenu na uszy, średnio wyniósł 2 jednostki. Wartość kontroli negatywnej odejmowano od pomiarów uzyskanych w grupach badanych.



3.2.3. TEST PRZEPUSZCZALNOŚCI BŁĘKITU EVANS'A PRZEZ NACZYNIA WŁOSOWATE.

24 godz. po wywołaniu reakcji CHS zwierzętom podano dożylnie (*i.v.*) 8,3 μ l 1% błękitu Evans'a na gram masy ciała. Po godzinie myszy zabito i z każdego ucha pobrano jednakowej wielkości bioptat o średnicy 6 mm przy pomocy wycinaka (Biopsy punch). Następnie w celu ekstrakcji barwnika z bioptatu do roztworu, bioptaty zanurzono w 0,5 ml formamidu i inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂, przez 18 godzin. Stężenie błękitu Evans'a oznaczono metodą kolorymetryczną. Absorbancję mierzono przy długości fali λ =565 nm. Stężenie próbek badanych odczytano z krzywej standardowej (użyte stężenia standardu błękitu Evans'a wyniosły od 0,23 do 30 μ g barwnika / ml formamidu).

3.2.4. POMIAR WAGI BIOPTATÓW POBRANYCH Z MAŁŻOWIN USZNYCH.

24 godz. od aplikacji haptenu na uszy (challenge) myszy zabito i z każdego ucha pobrano jednakowej wielkości bioptat o średnicy 6 mm przy pomocy wycinaka (Biopsy punch). Następnie każdy wycinek ważono na wadze analitycznej. Wagę bioptatów wyrażono w mg.

3.2.5. OZNACZANIE IFN- γ W EKSTRAKTACH BIOPTATÓW POBRANYCH Z MAŁŻOWIN USZNYCH.

24 godz. od aplikacji haptenu DNFB na uszy myszy zabito i z każdego ucha pobierano jednakowej wielkości bioptat o średnicy 6 mm przy pomocy wycinaka (Biopsy punch). Każdy wycinek homogenizowano w 150 μ l DPBS przez 5 min., posługując się ręcznym homogenizatorem. Następnie każdą próbkę uzupełniono DPBS do objętości 0,5 ml. Próbkę wirowano przy prędkości 4000 obr / min. przez 3 min. w temperaturze pokojowej. Supernatanty zbierano i zamrażano w temp. -80°C. Poziom IFN- γ oznaczono testem ELISA.

3.2.6. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI MIELOPEROKSYDAZY (MPO) W EKSTRAKTACH BIOPTATÓW POBRANYCH Z MAŁŻOWIN USZNYCH.

24 godz. po wywołaniu reakcji CHS myszy zabijano i z każdego ucha pobrano jednakowej wielkości bioptat o średnicy 6 mm przy pomocy wycinaka do miękkich tkanek (Biopsy punch). Następnie każdy wycinek homogenizowano w 150 μ l buforu do

homogenizacji (0,5% roztwór hexadecyltrimethylammonium bromide w 50 mmol buforze fosforanowym KH_2PO_4 / Na_2HPO_4) przez 5 min., używając ręczny homogenizator. Po zakończeniu rozdrabniania każdą próbkę uzupełniono buforem do homogenizacji do objętości 0,5 ml. Homogenat zamrażano w temp. -20°C przez 15 min., następnie rozmrożono w temperaturze pokojowej. Procedurę powtórzono trzykrotnie. Próbki wirowano przy prędkości 4000 obr / min. przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Supernatanty zbierano i oznaczano aktywność MPO metodą kolorymetryczną. Stężenie wyrażono w jednostkach MPO na 1 mg białka.

W celu pomiaru MPO przeprowadzono reakcję enzymatyczną nakładając na płytkę 20 μl supernatantu i 200 μl substratu dla MPO (0,167 mg / mL orto-dianizynodihydrochloride w 50 mmol buforze KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 i z 0,0005% H_2O_2). Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda=460$ nm, na 96-dołkowych płytkach do pomiaru absorbancji MaxiSorp. Stężenie próbek badanych odczytano z krzywej standardowej (użyte stężenia standardu dla MPO wyniosły od 0,008 do 0,5 j w 200 μl substratu MPO).

W celu pomiaru stężenia białka wykorzystano ilościowy pomiar aminokwasów aromatycznych, nakładając na płytkę 20 μl supernatantu i uzupełniając DPBS do objętości 200 μl . Absorbancję zmierzono przy długości fali $\lambda=280$ nm, na płytkach do pomiaru białka. Stężenie próbek badanych odczytano z krzywej standardowej (użyte stężenia standardu białkowego wyniosły od 0,015 do 1 mg białka / ml DPBS).

3.2.7. TEST SUPRESJI „TRANSFER IN” REAKCJI CHS.

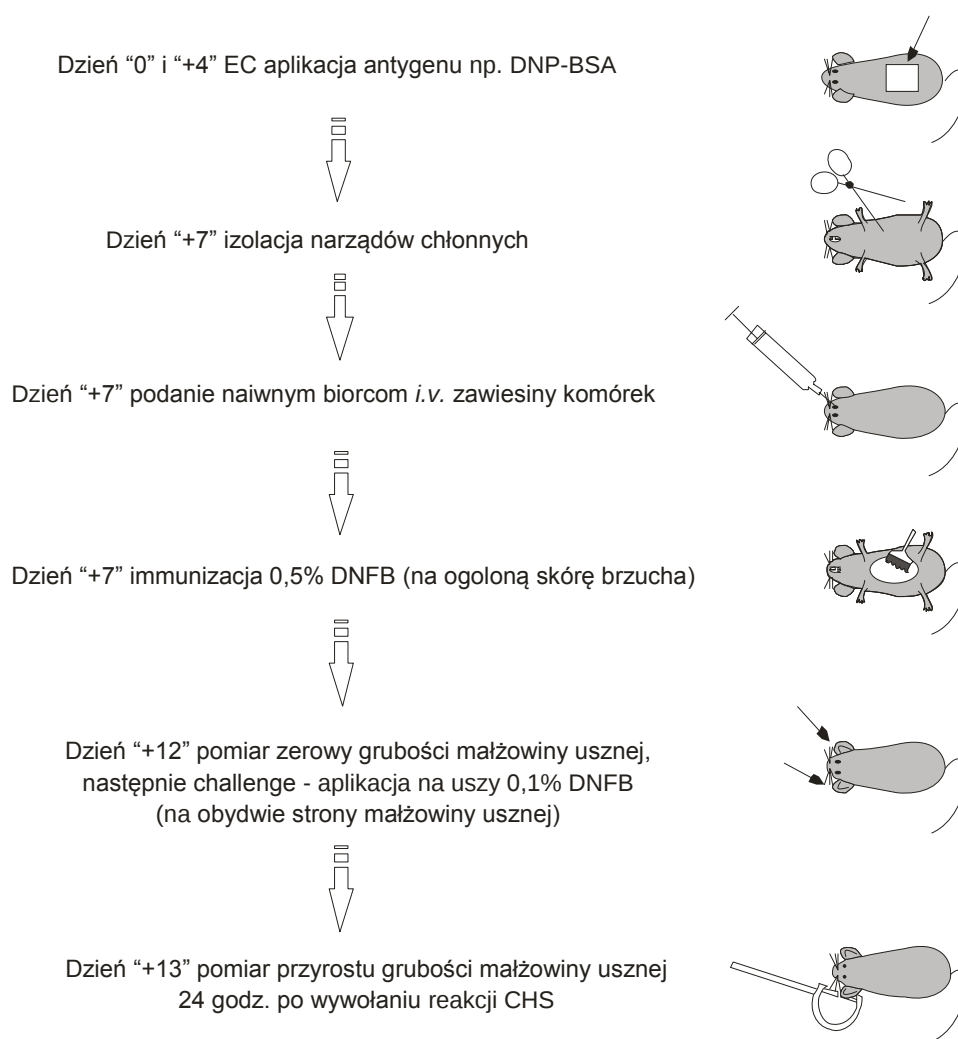
Komórki regulacyjne (Treg) indukowano przez EC aplikację antygeny białkowego (DNP-BSA, OVA, MBP lub OX-Ig) w dniach „0” oraz „+4”. W dniu „+7” usunięto gaziki z Ag, a zwierzęta zabijano i pobierano narządy limfatyczne: węzły chłonne pachowe i pachwinowe (LN), węzły chłonne krezkowe, śledziony (SPL) i grasic.

Pozyskane narządy limfatyczne mechanicznie rozdrabniano i zawieszano w jałowym DPBS z dodatkiem 1% FCS (płodowa surowica cielęca). Komórki węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych (LNC), śledzion (SPLC), węzłów chłonnych krezkowych (MLNC) i grasic (Thy) uwolnione mechanicznie z macierzy międzykomórkowej, oddzielano od resztek tkanek za pomocą gazy nylonowej (średnica oczek 100 μm), a następnie wirowano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C), ponownie zawieszano w jałowym DPBS z 1% FCS i wirowano. Po drugim wirowaniu komórki zawieszano w 1 ml jałowego DPBS. Oceniano mikroskopowo pod względem ilości i żywotności (metoda

barwienia błękitem trypanu). Żywotność komórek wyniosła średnio 97% we wszystkich eksperymentach.

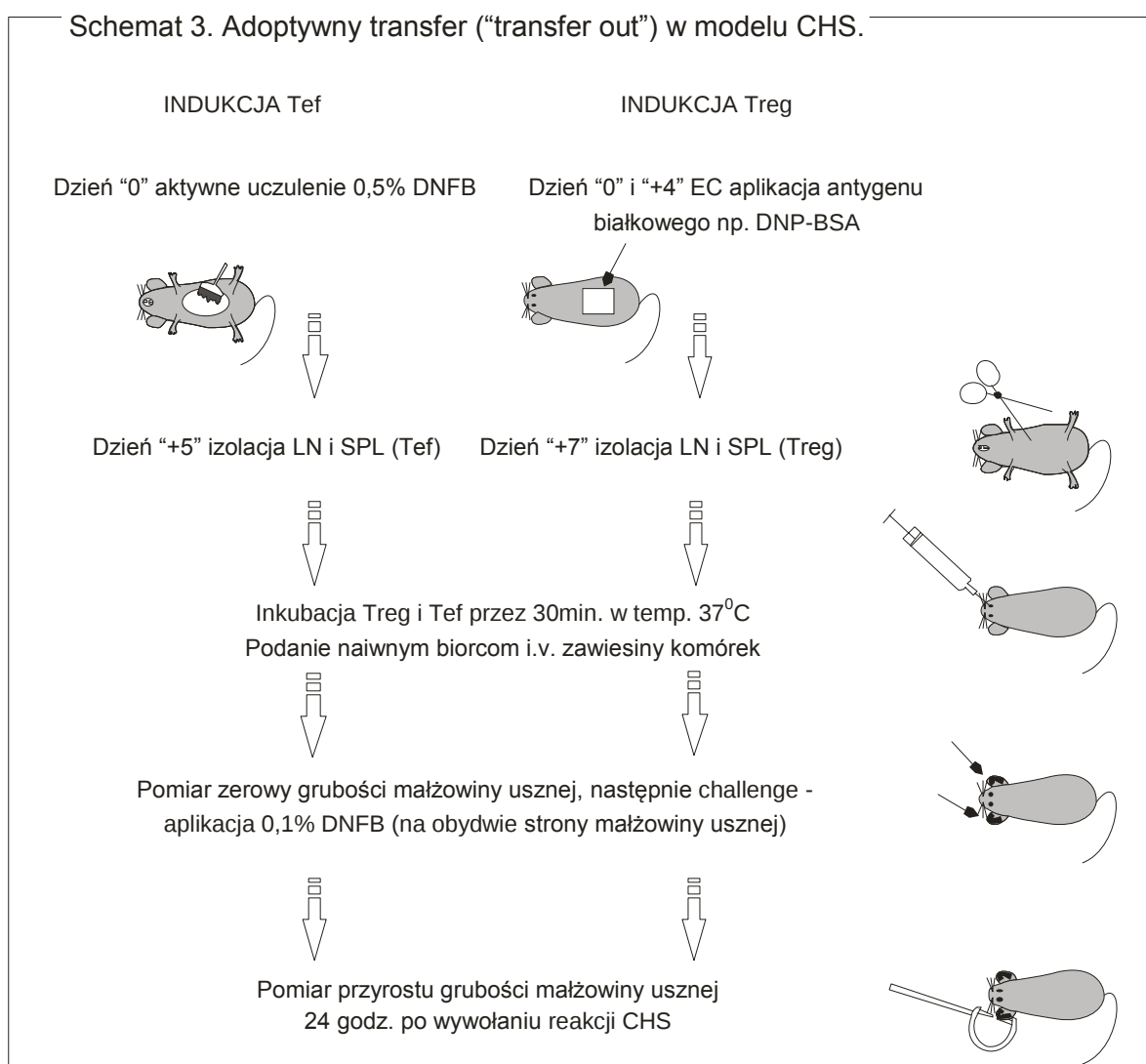
Uzyskane komórki podawano drogą dożylną (*i.v.*) naiwnym biorcom w objętości 200 μ l (ilość podawanych komórek Treg jest zależna od rodzaju doświadczenia). Godzinę później indukowano reakcję CHS poprzez immunizację 0,5% DNFB. W kontroli pozytywnej zwierzęta nie otrzymały komórek Treg, a jedynie zostały aktywnie uczulone haptenem. W piątym dniu od uczulenia wszystkim grupom badanym oraz kontroli negatywnej (naiwne myszy) podawano na uszy hapten 0,1% DNFB (challenge), zgodnie z procedurą w opisaną w punkcie 3.2.2. Przyrost grubości małżowiny usznej mierzono 24 godz. od aplikacji haptenu na uszy. Doświadczenie przeniesienia stanu supresji do naiwnych biorców („transfer in”) w modelu reakcji CHS przedstawiono na Schemacie 2.

Schemat 2. Przeniesienie stanu tolerancji do naiwnych biorców w modelu reakcji CHS.



3.2.8. ADOPTYWNY TRANSFER REAKCJI CHS TYPU „TRANSFER OUT”.

Model adoptywnego transferu reakcji CHS, „transfer out”, typu „cell mixing assay” przedstawiono na Schemacie 3. Polegał on na indukcji dwóch populacji komórek: EC indukowanych komórek Treg (pozyskanych zgodnie z procedurą 3.2.7.) oraz DNFB-swoistych komórek efektorowych (Tef), zdolnych do przeniesienia reakcji CHS. Dawcy komórek Tef pięć dni przed transferem, byli aktywnie uczulani 0,5% haptenem DNFB (procedura 3.2.2.).



Dawców komórek Treg (w dniu „+7”) oraz dawców komórek Tef (w dniu „+5”) zabijano, aby pobrać LN i SPL. Pozyskane narządy limfatyczne rozdrabniano i zawieszano w DPBS z 1% FCS (procedura opisana w punkcie 3.2.7.). Komórki Tef w ilości 7×10^7 / biorcę (LNC + SPLC w stosunku 1:1) inkubowano z komórkami Treg (LNC + SPLC w stosunku 1:1, ilość przenoszonych komórek jest zależna od rodzaju eksperymentu)

w 10ml jałowego DPBS z 1% FCS, przez 30 min. w temp. 37°C. Po zakończeniu inkubacji zawiesiny komórek płukano w 50 ml DPBS, wirowano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C) i zawieszano w 1ml DPBS. Uzyskane zawiesiny komórek podawano *i.v.* naiwnym biorcom w objętości 200µl / mysz. Pozytywną kontrolę transferu stanowiły myszy, które otrzymywały *i.v.* wyłącznie komórki Tef w ilości 7×10^7 / biorcę. Godzinę później u wszystkich grup wywoływano reakcję CHS, a przyrost grubości małżowiny usznej mierzono 24 godz. po podaniu haptenu na uszy, zgodnie z procedurą w opisaną w punkcie 3.2.2.

3.2.9. TEST PROLIFERACJI.

W teście proliferacji wykorzystano komórki narządów limfatycznych (LNC) pobrane od myszy uprzednio poddanych procedurze toleryzacji DNP-BSA i / lub aktywnemu uczuleniu DNFB (opisane w punkcie 3.2.7. i 3.2.8.). W odpowiednich grupach, po wyizolowaniu węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych, tkankę mechanicznie rozdrabniano i zawieszano w jałowym DPBS z dodatkiem 1% FCS. Komórki LNC uwolnione mechanicznie z macierzy międzykomórkowej, oddzielono od resztek tkanek za pomocą gazy nylonowej, a następnie wirowano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C), ponownie zawieszono w jałowym DPBS z 1% FCS i wirowano. Po drugim wirowaniu komórki zawieszono w około 4ml jałowego podłoża hodowlanego RPMI 1640. Oceniono mikroskopowo pod względem ilości i żywotności, która wyniosła średnio 97%. Zakładano hodowlę, którą prowadzono w jałowym medium RPMI 1640 zawierającym 100 U / ml penicyliny, 100 µg / ml streptomycyny, 2 mM L-glutaminy, 25 mM buforu HEPES, 5×10^{-5} M 2-merkaptoetanolu i 10% FCS. Komórki wszystkich grup badanych były hodowane w tetraplikatach w okrągło-dennych 96-dołkowych płytkach hodowlanych, w ilości 3×10^5 komórek na dołek, w obecności malejących dawek DNP-BSA. Stężenie DNP-BSA w poszczególnych rozcieńczeniach wyniosły: 300, 100 oraz 30 µg / ml. Dodatkowo dołączono kontrolę negatywną, w której komórki LNC inkubowano w medium bez antygeny, tzw. „tło”. Końcowa objętość hodowli wyniosła 200 µl / dołek. Hodowlę prowadzono w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ przez 48 godz. Następnie do wszystkich dołków hodowli dodano 0,5 µCi / dołek [³H]-tymidyny w 20 µl RPMI 1640 i komórki inkubowano przez kolejne 18 godz. Intensywność proliferacji oceniano poprzez inkorporację radioaktywnej tymidyny przy użyciu licznika scyntylicyjnego promieniowania β. Wyniki pomiarów przedstawiono na rycinie w postaci średnich arytmetycznych ± SE po odjęciu „tła” (prolifracja komórek w nieobecności antygeny).

W eksperymencie oceniającym mechanizm działania komórek Treg, komórki Treg przed założeniem hodowli były naświetlone promieniami γ (dawka 650-700 Rad), w celu zahamowania proliferacji. Wyjątkiem była grupa kontrolna, gdzie badano proliferację samych komórek Treg, które nie zostały poddane napromieniowaniu.

3.2.10. OCENA FENOTYPU KOMÓRKI REGULACYJNEJ METODĄ „NEGATYWNEJ SELEKCJI”.

Komórki regulacyjne, które indukowano poprzez EC podanie antygeny (100 μ g DNP-BSA / mysz w 100 μ l DPBS) przez tydzień, izolowano z LN i SPL dawców według procedury 3.2.7. Wyizolowane od myszy komórki LNC i SPLC inkubowano w jałowym DPBS z dodatkiem 1% FCS z monoklonalnymi przeciwciałami (mAb): anti-CD4, anti-CD8, anti-TCR β , anti-TCR δ lub anti-CD25 w ilości 1 μ g mAb na 1×10^6 komórek, w objętości 1×10^7 komórek / 1ml zawiesiny. Do każdej grupy komórek dodano rozcieńczony dopełniacz króliczy (RC) (rozcieńczenie końcowe 1:25). Kontrolę supresji stanowiła grupa, w której poddano inkubacji komórki Treg wyłącznie z RC. Inkubacja odbyła się w łaźni wodnej, w temp. 37°C i trwała 90 min. Następnie komórki płukano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C), ponownie zawieszano w jałowym DPBS z 1% FCS i wirowano. Po drugim wirowaniu komórki zawieszano w 1ml jałowego DPBS. Oceniano ilość komórek oraz ich żywotność. Tak przygotowane zawiesiny komórkowe podawano *i.v.* biorcom w ilości 5×10^7 komórek / mysz, w objętości 200 μ l.

Godzinę później myszy uczulano 0,5% DNFB na skórę brzucha, a pięć dni później wywoływano fazę efektorową reakcji CHS. Przyrost grubości małżowiny usznej mierzono 24 godz. od aplikacji haptenu na uszy.

3.2.11. ANALIZA CYTOFLUORYMERYCZNA (FACS).

Komórki węzłów chłonnych pozyskane od myszy EC traktowanych DNP-BSA lub DPBS wyizolowano zgodnie z procedurą 3.2.7. Następnie zawiesiny LNC dopełniono DPBS do objętości 50ml z dodatkiem 1% FCS i całość wirowano. Odplukane LNC zawieszano w DPBS z 1% FCS, a następnie liczono i oceniano żywotność, która wynosiła 98%. W kolejnym etapie komórki znakowano mAb sprzężonymi z odpowiednimi fluorochromami. Najpierw znakowano molekuly powierzchniowe poprzez zastosowanie następujących mAb: anti-mysie-CD25 znakowane PE, anti-mysie-TCR β znakowane FITC oraz anti-mysie-CD4 znakowane PE-Alexa Fluor 610. Znakowanie polegało na inkubacji 1×10^6 komórek z 0,1 μ g

każdego z w/w mAb w 100 μ l DPBS z 1% FCS. Zawiesiny komórkowe inkubowano przez 30 min. w temp. 4°C, chroniąc przed światłem. W kolejnym etapie znakowano molekułę wewnątrzkomórkową Foxp-3 za pomocą przeciwciała anty-mysiego / szczurzego-Foxp3 znakowanego APC, zgodnie z protokołem załączonym do zestawu testowego. Dodatkowo dołączono kontrole: kontrola negatywna stanowiła LNC nieznakowane, kontrole poszczególnych barwników, gdzie LNC znakowano pojedynczymi mAb z fluorochromem oraz kontrole izotopowe, gdzie do LNC dodawano mAb: szczurzego IgG2a znakowanego APC, chemicznego - FITC, szczurzego IgG2a - PE-Alexa Fluor 610 i szczurzego IgG1 - PE.

Następnie komórki uzupełniono jałowym DPBS do objętości 4 ml i wirowano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C). Do analizy komórki zawieszano w 300 μ L DPBS w probówkach FACS. Pomiaru dokonano przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur S, z zastosowaniem oprogramowania Cell Quest, natomiast do analizy danych użyto programu FlowJo.

3.2.12. HODOWLA KOMÓRKOWA ORAZ OZNACZANIE POZIOMU CYTOKIN W SUPERNATANTACH METODĄ ELISA.

Do hodowli komórkowych używano komórki LNC myszy, którym na skórę aplikowano DPBS (grupa kontrolna) lub DNP-BSA i / lub DNFB na skórę brzucha (procedura 3.2.7 i 3.2.8.). Komórki były hodowane w koncentracji 3×10^6 / ml w obecności jałowego antygeny DNP-BSA o końcowym stężeniu 100 μ g / ml. Hodowlę prowadzono w jałowym medium RPMI 1640, które zawierało 100 U / ml penicyliny, 100 μ g / ml streptomycyny, 2 mM L-glutaminy, 25 mM buforu HEPES, 5×10^{-5} M 2-merkaptetanolu i 10% FCS. Hodowlę przeprowadzano w tryplikatach, na płytkach Falcon 24-dołkowych z płaskim dnem, w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po upływie 48 godzin zbierano supernatanty do dalszej analizy.

Do oznaczenia stężenia cytokin IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17E, TNF- α i IFN- γ w uzyskanych supernatantach wykorzystano metodę immunoezymatyczną (ELISA) używając gotowych zestawów do pomiaru stężenia cytokin, wykorzystując płaskodenne płytki. Absorbancję odczytywano przy użyciu urządzenia do odczytu absorbancji. Stężenie próbek badanych odczytywano z krzywej standardowej.

W przypadku oznaczenia stężenia TGF- β uzyskane supernatanty umieszczano na płytkach, wstępnie zakwaszano 1 M HCl w stosunku 1:25, a następnie neutralizowano 1 M NaOH do pH 7.0 w tych samych proporcjach. Następnie płytki do pomiaru absorbancji opłaszczano szczurzym mAb anty-mysim-TGF- β , natomiast jako przeciwciało detekcyjne

użyto szczurze biotynylowane mAb anty-mysie-, anty-ludzkie-, anty-świńskie-TGF- β . Reakcję enzymatyczną wywołano dodając enzym peroksydazę chrzanową skoniugowaną ze streptawidyną oraz substrat (o-fenylodiamina z H₂O₂), a następnie reakcję zatrzymano 3M H₂SO₄. Pomiar absorbancji dokonywano przy długości fali $\lambda=492$ nm. Stężenie TGF- β w supernatantach odczytywano z krzywej standardowej, którą wykreślono wykorzystując rekombinowany mysz TGF- β . Próg oznaczalności dla TGF- β wynosił 30 pg / ml.

3.2.13. INKUBACJA KOMÓREK NA PŁYTKACH Z WKŁADAMI PÓŁPRZEPUSZCZALNYMI.

Komórki Treg i Tef pochodzące z LNC uzyskano zgodnie z procedurą 3.2.7. i 3.2.8. Tak uzyskane komórki Treg (5×10^7 / biorcę) oraz komórki Tef (7×10^7 komórek / biorcę) inkubowano *in vitro* na szalkach Petrie'go z wkładami z błony półprzepuszczalnej (system trans-well chambers), dzięki czemu w szalce umieszczono komórki Tef, natomiast we wkładzie umieszczono komórki Treg, co uniemożliwiało kontakt bezpośredni pomiędzy tymi komórkami, natomiast nie ograniczyło przepływu czynników rozpuszczalnych np. cytokin. W grupie kontroli pozytywnej zawierającej wyłącznie komórki Tef oraz w grupie kontroli supresji, gdzie komórki Treg były zmieszane z komórkami Tef, zawiesinę komórek umieszczono na szalce, bez półprzepuszczalnego wkładu. Końcowa objętość zawiesiny komórek w jałowym DPBS z 1% FCS wyniosła 10 ml. Komórki inkubowano 40 min., w temp. 37°C i w atmosferze 5% CO₂. Po zakończonej inkubacji, pobierano komórki znajdujące się na dnie szalek (komórki Treg znajdujące się na wkładzie zostały odrzucone), przenoszono do probówek, wirowano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C) i podawano *i.v.* biorcom w objętości 200 μ l.

Dwie godziny po dożylnym podaniu zawiesiny komórek, wywoływano reakcję CHS poprzez aplikację 0,1% DNFB na uszy, a reakcję CHS badano 24 godz. później.

3.2.14. ADOPTYWNY TRANSFER I BLOKOWANIE CTLA-4 (CD152) *IN VITRO*.

Komórki Treg indukowano u myszy zgodnie z procedurą 3.2.7., poprzez tygodniową aplikację antygeny białkowego DNP-BSA w ilości 100 μ g / mysz. Siódmego dnia pobrano LN i SPL, mechanicznie rozdrabniano i zawieszano w jałowym DPBS z dodatkiem 1% FCS, a następnie wirowano. Komórki SPLC zostały poddawane szokowi osmotycznemu poprzez dodanie 1 ml H₂O oraz 1 ml 1,8% DPBS. Następnie dodawano 50 ml jałowego DPBS z dodatkiem 1% FCS i całość wirowano. LNC i SPLC zmieszano w stosunku 1:1. Komórki Tef pobrano od dawców, którzy pięć dni wcześniej

byli uczulani 0,5% roztworem DNFB zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.8. Z uzyskanych zawiesin komórkowych przygotowano mieszaninę zawierającą LNC i SPLC w stosunku 1:1.

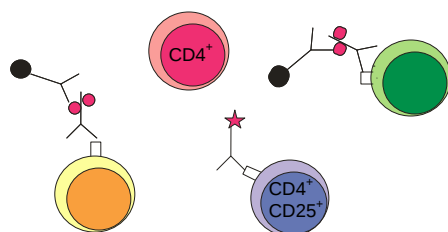
Zawiesiny LNC i SPLC od myszy EC toleryzowanych poddawano separacji za pomocą gotowego zestawu odczynników do izolacji limfocytów T $CD4^+CD25^+$ (przedstawiono na Schemacie 4). W pierwszym etapie przeprowadzono deplecję komórek $CD4^-$ poprzez dodanie koktajlu zawierającego biotynylowane mAb: anti-CD8a, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-CD49b i anti-Ter-119, co spowodowało eliminację limfocytów T $CD8^+$, limfocytów B, komórek dendrytycznych, makrofagów, komórek NK oraz komórek erytroidalnych. Dodano również anti-biotynylowane drobinę magnetyczne oraz mAb anti-CD25 znakowane fikoerytryną (PE). Tak przygotowaną mieszaninę nałożono na kolumnę umieszczoną w separatorze magnetycznym (system MACS). Poprzez płukanie kolumny buforem, uzyskano populację komórek $CD4^+$ (w tym $CD4^+CD25^+$), która nie była znakowana. Pozostałe komórki wyznakowane drobinami magnetycznymi zostały zatrzymane na kolumnie. Następnym etapem było przeprowadzenie pozytywnej selekcji i rozdzielenie komórek na populacje $CD4^+CD25^+$ i $CD4^+CD25^-$. W tym celu do zebranych komórek $CD4^+$ dodano drobinę magnetyczną wyznakowaną przeciwciałami anti-PE, a następnie mieszaninę przepuszczono przez kolumnę umieszczoną w polu magnetycznym. Frakcja, która wypłynęła zawierała komórki $CD4^+CD25^-$. Następnie kolumnę usunięto z pola magnetycznego i płukano buforem otrzymując frakcję $CD4^+CD25^+$.

Po separacji wyodrębniono dwie frakcje komórkowe: $CD4^+CD25^+$ i $CD4^+CD25^-$. Komórki zawieszano w 5 ml jałowego DPBS z 1% FCS, wirowano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C), liczone oraz oceniano ich żywotność.

Następnie komórki $CD4^+CD25^+$ i $CD4^+CD25^-$ (2×10^6 / biorcę) inkubowano w obecności, bądź bez mAb anti-mysie-CD152 ($1 \mu\text{g}$ mAb / 10^6 komórek). Dołączono kontrolę supresji, która stanowiła pełne komórki Treg, tj. wyizolowane od dawców, nie separowane (5×10^7 komórek / biorcę) oraz kontrolę izotypową, w której do limfocytów $CD4^+CD25^+$ dodano mAb chomicze-IgG ($1 \mu\text{g}$ mAb / 10^6 komórek). Inkubacja trwała 30 min., w temp. 4°C. W następnym etapie do wszystkich grup komórkowych dodano 7×10^7 komórek Tef. Każdą grupę zawieszono w 10 ml jałowego DPBS z 1% FCS i inkubowano w łaźni wodnej w temp. 37°C przez 30 min., wirowano (1200 obrotów / min., 10 min., temp. 4°C), zawieszano w jałowym DPBS i podawano *i.v.* syngenicznym biorcom, w objętości 200 μl .

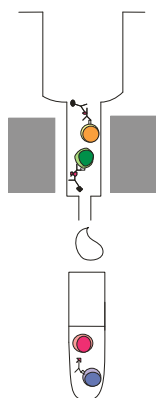
U biorców transferu, dwie godziny później wywołano fazę efektorową CHS aplikując DNFB na uszy. Po upływie 24 godz. oceniano odpowiedź w teście reakcji CHS.

Schemat 4. Izolacja komórek przy użyciu drobin magnetycznych.



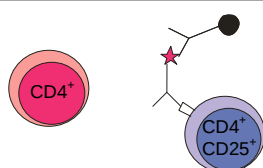
Wyznakowanie komórek $CD4^-$ biotynylowanymi mAb oraz anty-biotynylowanymi drobinami magnetycznymi

Wyznakowanie komórek $CD25^+$ mAb anty-CD-25-PE

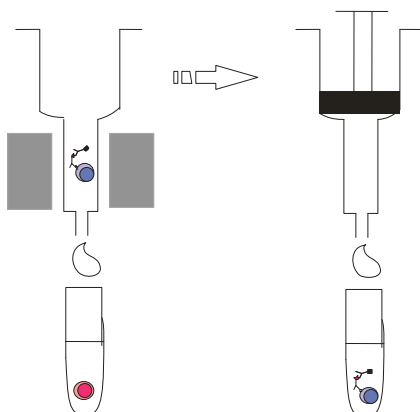


Deplecja komórek $CD4^-$ w polu magnetycznym

Wypływająca frakcja zawiera komórki bez drobin magnetycznych czyli $CD4^+$, w tym także $CD4^+CD25^+$



Wyznakowanie komórek $CD4^+CD25^+$ drobinami magnetycznymi anty-PE



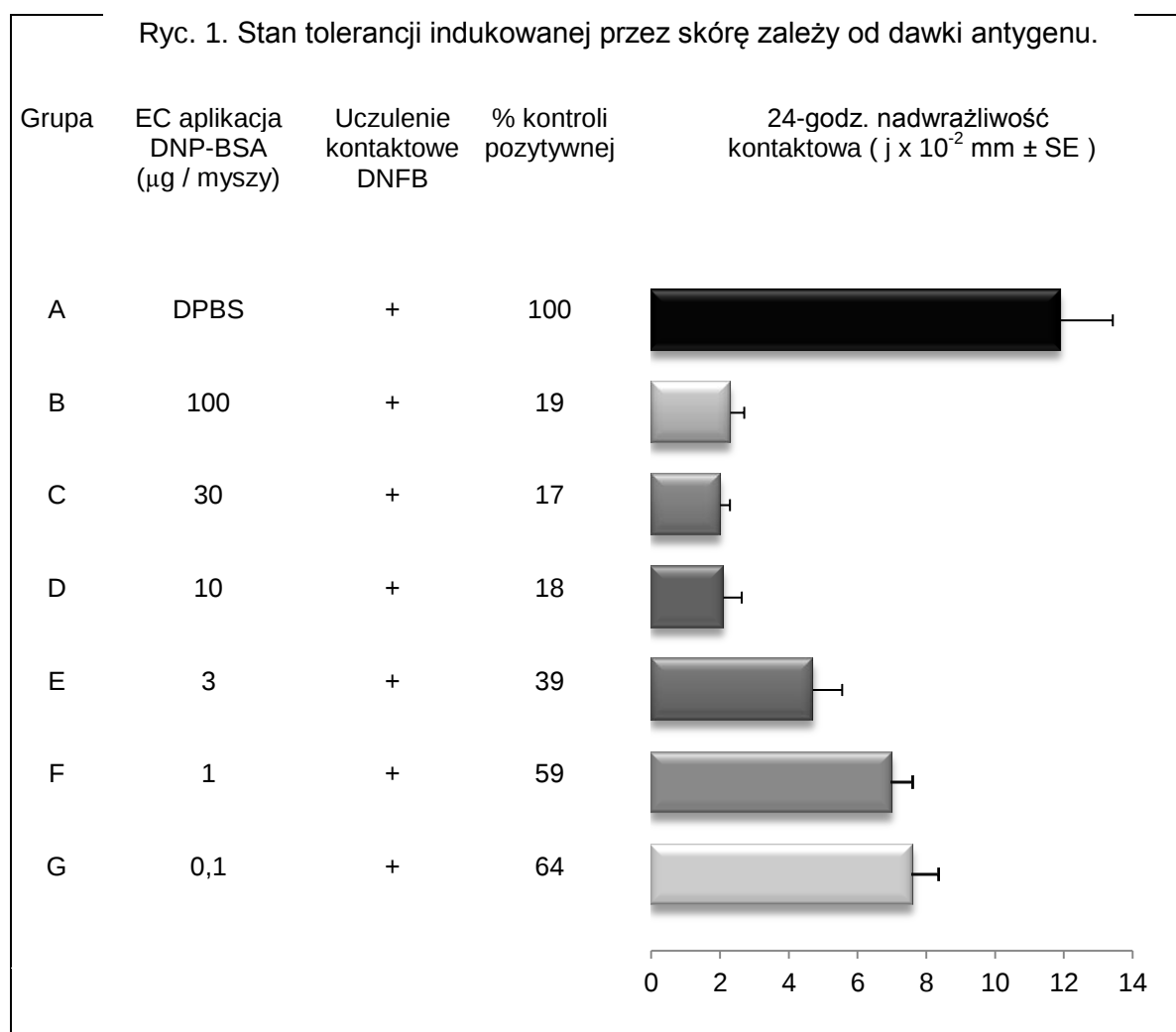
Selekcja pozytywna komórek $CD4^+CD25^+$

Wypływająca frakcja zawiera komórki $CD4^+CD25^-$, po wyjęciu kolumny z pola magnetycznego wypływająca frakcja zawiera komórki $CD4^+CD25^+$

Analizę statystyczną wyników opracowano za pomocą dwustronnego testu t-Studenta. W obliczeniach posłużono się programem Microsoft Office Excel 2007. Wartość $p \leq 0,05$ została przyjęta jako próg istotności statystycznej. Wartości wszystkich uzyskanych wyników zostały przedstawione w postaci średnich arytmetycznych $\pm$ SE. Brak znamienności statystycznej oznaczono symbolem $p=ns$.

4.1. NASKÓRNA APLIKACJA ANTYGENU BIAŁKOWEGO PRZED WYWOŁANIEM REAKCJI Tc1 CD8⁺ ZALEŻNEJ PROWADZI DO JEJ ZAHAMOWANIA.

Myszy szczepu BALB/c poddawano tygodniowej toleryzacji poprzez EC aplikację zmniejszających się dawek DNP-BSA, od 100 µg do 0,1 µg / mysz (Grupy B - G) bądź traktowano DPBS (Grupa A). W dniu 7 opatrunki usunięto i myszy immunizowano 0,5% DNFB, a pięć dni później przeprowadzano test CHS. Eksperyment przeprowadzono według procedury opisanej w Materiałach i Metodach w punktach 3.2.1 i 3.2.2.



Wyniki przedstawione na Ryc. 1 pokazują, że optymalna dawka antygeny białkowego zdolna do zahamowania CHS mieści się między 3 a 100 µg /mysz i zahamowanie reakcji waha się między 81 a 61% porównując do kontroli pozytywnej (Grupa A). Dawki 1 µg oraz 0,1µg / DNP-BSA nieznacznie hamują odpowiedź. Przyrost grubości małżowiny usznej w grupie kontroli negatywnej wyniósł 1,8 j i wartość tę odjęto od średnich wartości w grupach badanych. Istotność statystyczna: Grupy B - E vs Grupa A, $p < 0,01$; Grupy F i G vs Grupa A, $p = ns$.

Powyższe dane nie tylko dowodzą, że naskórna aplikacja antygeny DNP-BSA przed immunizacją znacząco hamuje reakcję CHS ale również dowodzą, że siła supresji jest zależna od dawki użytego antygeny.

W dalszych eksperymentach ograniczono się wyłącznie do stosowania dawki 100 µg DNP-BSA / mysz.

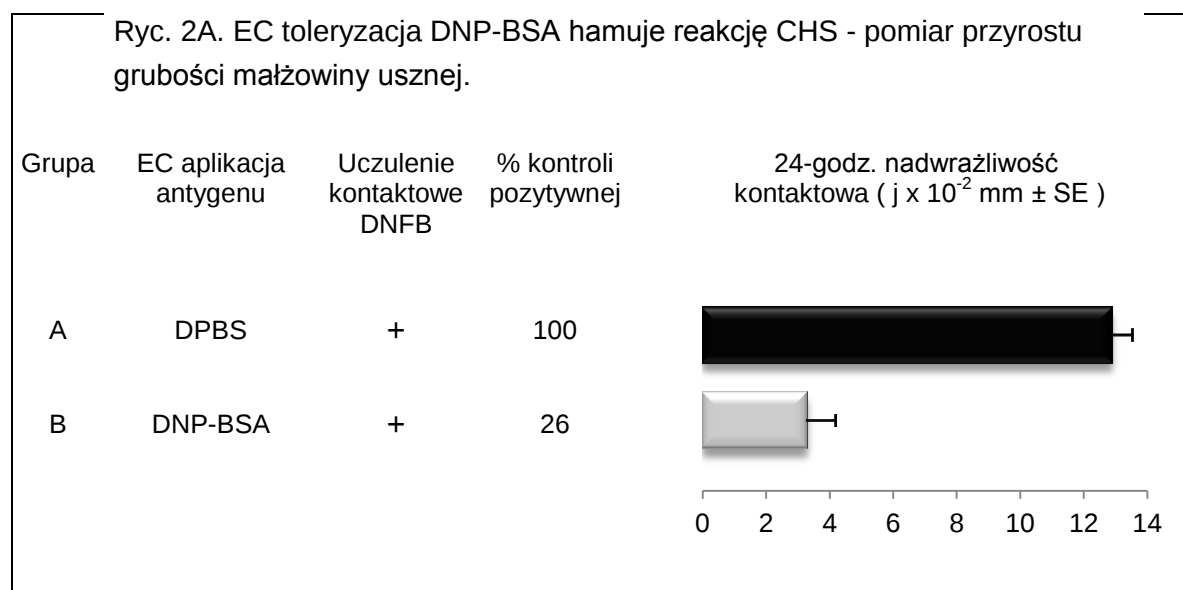
4.2. PRZED WYWOŁANIEM REAKCJI CHS EC APLIKACJA ANTYGENY BIAŁKOWEGO PROWADZI DO ZMNIEJSZENIA INTENSYWNOŚCI REAKCJI ZAPALNEJ W MAŁŻOWINIE USZNEJ.

Powszechnie wiadomo, że obserwowany obrzęk uszu w fazie efektorowej reakcji CHS jest wynikiem zwiększonej przepuszczalności naczyń i w konsekwencji zwiększonego przechodzenia substancji rozpuszczalnych zawartych w surowicy oraz leukocytów do tkanek. Celem kolejnych doświadczeń było sprawdzenie czy stan tolerancji wywołanej EC aplikacją Ag prowadzi do zmniejszenia przepuszczalności naczyń i nacieku komórkowego. W tym celu myszy szczepu BALB/c, po tygodniowym EC traktowaniu antygenem DNP-BSA lub DPBS (kontrola pozytywna), immunizowano 0,5% DNFB, a pięć dni później wywoływano fazę efektorową reakcji CHS. Niniejszy eksperyment przeprowadzono zgodnie ze Schematem 1 opisanym w rozdziale Materiały i Metody.

Ryc. 2A ilustruje przyrost grubości małżowiny usznej mierzony za pomocą śruby mikrometrycznej 24 godziny po wywołaniu reakcji CHS. EC aplikacja DNP-BSA (Grupa B) przed uczuleniem haptenu DNFB prowadzi do znaczącego zahamowania reakcji CHS o 74% w porównaniu do grupy kontrolnej (Grupa A), co jest spowodowane mniejszym obrzękiem tkanek w miejscu aplikacji haptenu. Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A, $p < 0,001$.

W celu potwierdzenia testu makroskopowego, a ponadto uzyskania informacji o procesach zachodzących w miejscu toczącej się reakcji zapalnej, w kolejnych doświadczeniach, po upływie 24 godzin od wywołania reakcji CHS pobierano z każdego

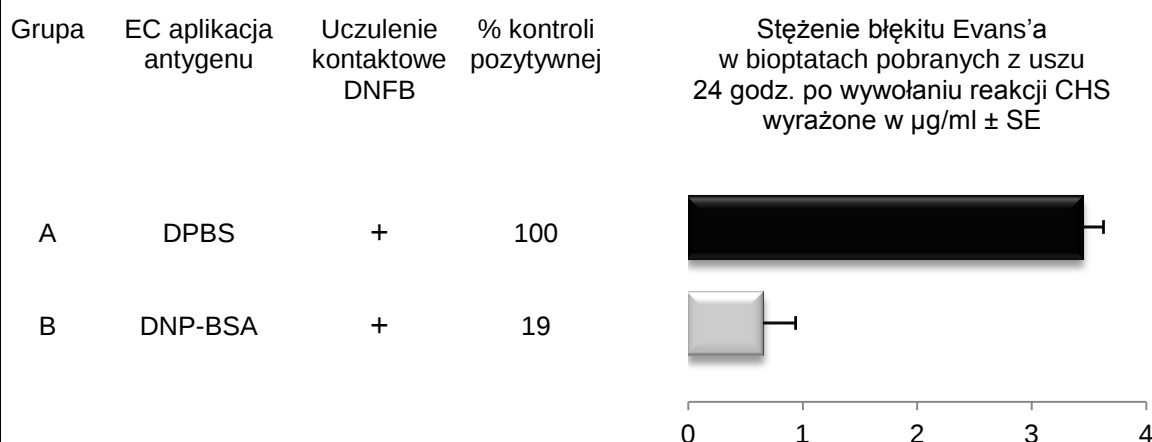
ucha biopłat, aby dokonać pomiaru przepuszczalności naczyń, ciężaru, aktywności enzymatycznej mieloperoksydazy (MPO) oraz oznaczenia poziomu IFN- γ .



W celu sprawdzenia czy EC indukowana supresja wpływa na przepuszczalność naczyń, w doświadczeniu mierzono przenikanie błękitu Evans'a przez naczynia włosowate w małżowinach usznych u zwierząt, które wcześniej EC traktowano DNP-BSA i / lub wywołano u nich reakcję CHS. Po 24 godzinach od aplikacji haptenu na uszy pobierano wycinek małżowiny usznej celem pomiaru stężenia barwnika, które jest proporcjonalne do przepuszczalności naczyń (procedura opisana w punkcie 3.2.3.). Wyniki przedstawione na Ryc. 2B wykazują, że w grupie myszy toleryzowanych przed wywołaniem reakcji CHS (Grupa B) przepuszczalność naczyń włosowatych była o ponad 80% niższa niż w grupie kontroli pozytywnej (Grupa A).

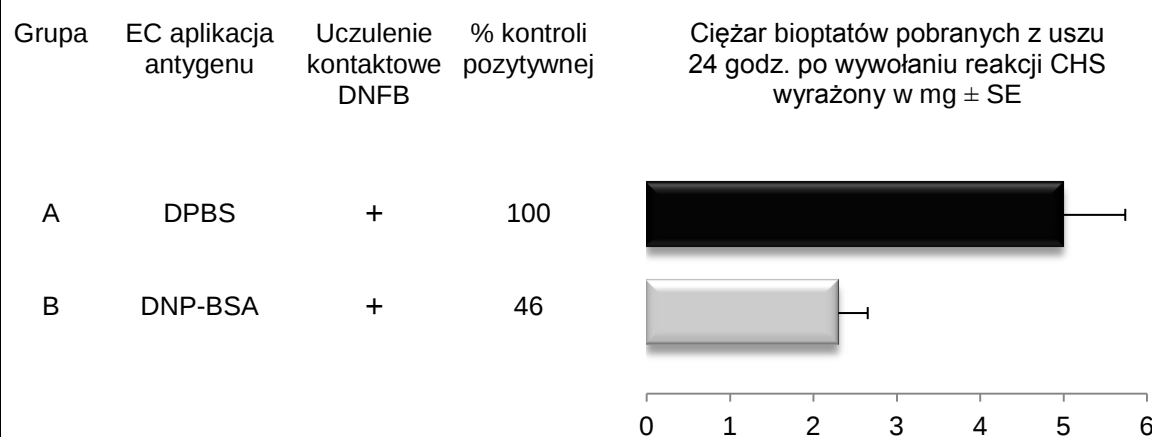
Średnią wartość stężenia barwnika w kontroli negatywnej, która wyniosła $0,31 \mu\text{g} / \text{ml}$, odjęto od wartości stężenia w grupach badanych. Wyniki wyrażono w $\mu\text{g} / \text{ml} \pm \text{SE}$. W celu sprawdzenia przepuszczalności barwnika przez naczynia włosowate u myszy naiwnych, dołączono grupę, która otrzymała wyłącznie błękit Evans'a *i.v.*, a po godzinie pobrano w tej grupie biopłaty uszne (wyniki nie zamieszczone na wykresie). Wartość kontroli wyniosła $0,30 \mu\text{g} / \text{ml}$ (stężenie na poziomie kontroli negatywnej). Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A, $p < 0,001$.

Ryc. 2B. EC toleryzacja DNP-BSA hamuje reakcję CHS – test przepuszczalności błękitu Evans’a.



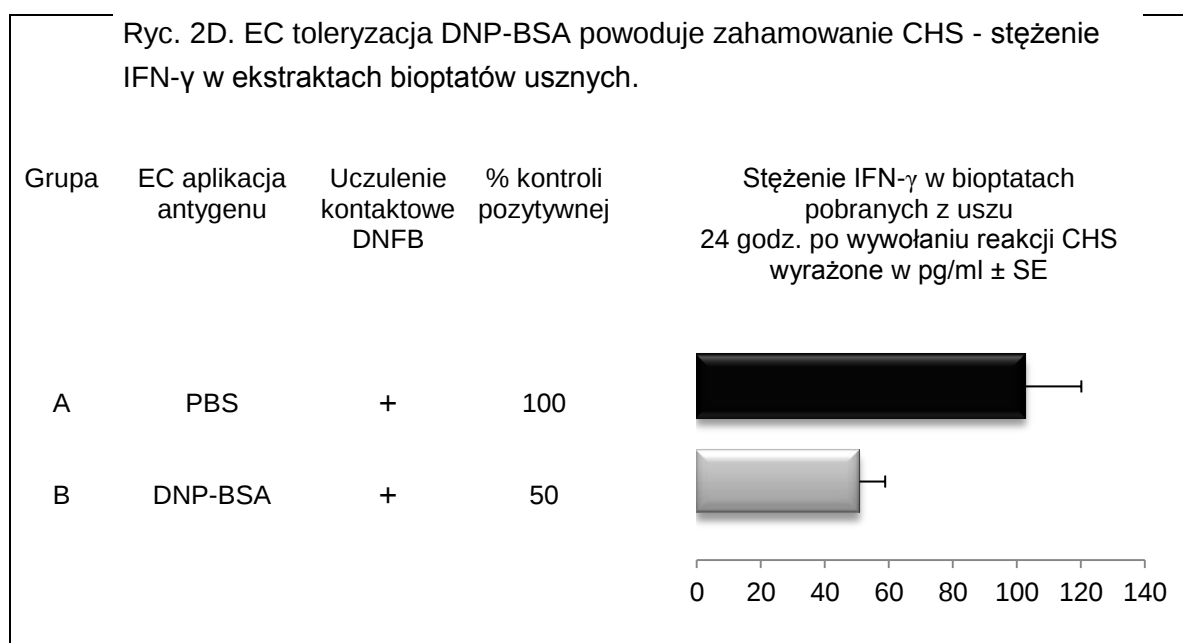
Wyniki uzyskane w teście pomiaru obrzęku małżowin usznych potwierdzono także pomiarem wagi biopsatów pobranych z uszu, który odzwierciedlał stopień reakcji zapalnej (obrzęk oraz naciek komórkowy). Ryc. 2C pokazuje, że masa pobranych wycinków koreluje z pomiarem grubości małżowiny usznej, tj. EC podanie DNP-BSA (Grupa B) przed uczuleniem haptenu DNFB prowadzi do spadku masy pobranych wycinków (procedura 3.2.4.). Średnią wartość wagi biopsatów usznych kontroli negatywnej, która wyniosła 7,5 mg odjęto od średniej wartości biopsatów w grupach badanych. Wyniki wyrażono w $\text{mg} \pm \text{SE}$. Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A, $p < 0,01$.

Ryc. 2C. EC toleryzacja DNP-BSA hamuje reakcję CHS - pomiar ciężaru biopsatów pobranych z uszu.



Ponieważ w miejscu aplikacji haptenu na uszy pojawia się miejscowy naciek komórek zapalnych, postanowiono sprawdzić poziom cytokin prozapalnych. Typową

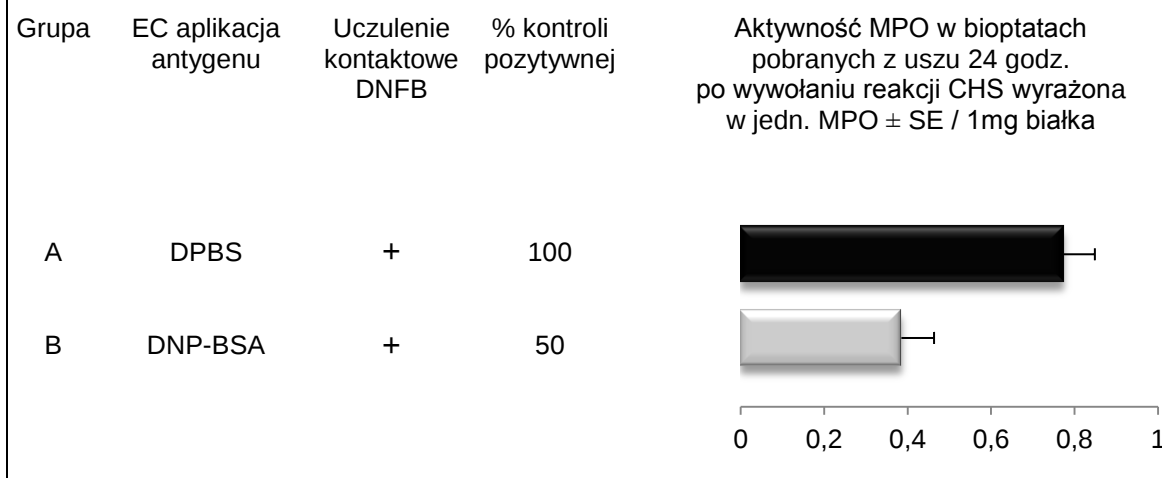
cytokiną uwalnianą w czasie reakcji nadwrażliwości kontaktowej Tc1 CD8⁺ zależnej jest IFN- γ [138, 139]. Ryc. 2D ilustruje doświadczenie, w którym zbadano poziom IFN- γ w ekstraktach bioptatów pobranych z małżowin usznych 24 godziny po wywołaniu reakcji CHS (procedura 3.2.5.). Naskórna aplikacja DNP-BSA przed immunizacją DNFB spowodowała 50% spadek stężenia IFN- γ (Grupa B) w porównaniu do grupy gdzie wyłącznie wywoływano reakcję CHS (Grupa A). Średni poziom IFN- γ w grupie kontroli negatywnej wyniósł 82,6 pg / ml, wartość tą odjęto od średniej wartości w grupach badanych. Wyniki wyrażono w pg / ml $\pm$ SE. Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A, $p < 0,05$.



Mieloperoksydaza jest markerem nacieku neutrofilowego w miejscu zapalenia, dlatego w kolejnym eksperymencie zmierzono aktywność enzymatyczną MPO w ekstraktach bioptatów pobranych z małżowin usznych. Wyniki przedstawione na Ryc. 2E dowodzą, że EC aplikacja antygeny DNP-BSA przed wywołaniem reakcji CHS (Grupa B) powoduje zahamowanie nacieku neutrofilów w miejscu ekspozycji na hapten. Oznaczenia dokonano metodą kolorymetryczną, a stężenie wyrażono w jednostkach MPO na 1 mg białka $\pm$ SE (procedura 3.2.6.). Średni poziom aktywności MPO w grupie kontroli negatywnej wyniósł 0,045 j / 1 mg białka, wartość tą odjęto od średniej wartości w grupach badanych. Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A, $p < 0,01$.

Przedstawione powyżej wyniki dowodzą, że EC aplikacja antygeny białkowego DNP-BSA hamuje reakcję CHS, powodując powstanie stanu tolerancji immunologicznej. W dalszym etapie badań nad EC indukowaną supresją, jako główny test stosowano pomiar przyrostu grubości małżowiny usznej za pomocą śruby mikrometrycznej.

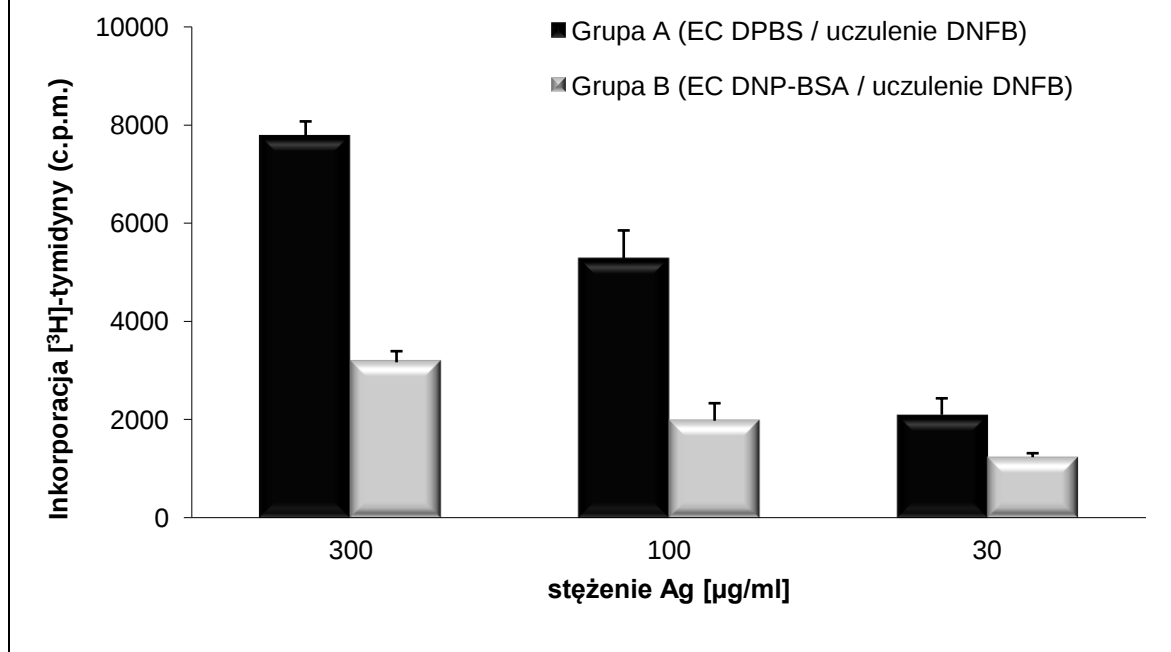
Ryc. 2E. EC toleryzacja DNP-BSA hamuje reakcję CHS - pomiar aktywności enzymatycznej MPO w bioptatach pobranych z uszu.



4.3. EC APLIKACJA ANTYGENU BIAŁKOWEGO HAMUJE PROLIFERACJĘ KOMÓREK TEF *IN VITRO*.

Aby potwierdzić wyniki badań uzyskanych w modelu reakcji CHS *in vivo*, w kolejnym eksperymencie zbadano wpływ EC aplikacji DNP-BSA na proliferację komórek Tef *in vitro*. W tym celu myszom szczepu C57BL/6 aplikowano EC na ogoloną skórę grzbietu DPBS – kontrola pozytywna, Rycina 3 (Grupa A) lub DNP-BSA (Grupa B) w ilości 100 μ g / mysz (procedura 3.2.1). W dniu „+7” zwierzęta aktywnie immunizowano 0,5% DNFB (procedura 3.2.2.). Pięć dni po uczuleniu, pobierano węzły chłonne pachowe i pachwinowe, a uzyskane z nich zawiesiny komórek były hodowane w obecności malejących dawek antygeny DNP-BSA przez 48 godzin. Stężenie DNP-BSA w poszczególnych rozcieńczeniach wyniosło: 300 μ g / ml, 100 μ g / ml, 30 μ g / ml. Następnie po dodaniu [3 H]-tymidyny i hodowli przez 18 godz. oceniono inkorporację radioaktywnej tymidyny. Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.9. Wyniki przedstawione na Ryc. 3 pokazują, że EC toleryzacja antygenem DNP-BSA (Grupa B) powoduje znaczne zahamowanie proliferacji komórek Tef LNC w porównaniu do komórek Tef myszy traktowanych DPBS na skórę (Grupa A) dla stężenia 300 μ g / ml Ag na dołek ($p < 0,001$) i dla stężenia 100 μ g / ml Ag na dołek ($p < 0,02$), natomiast nieznacznie hamuje proliferację przy stężeniu 30 μ g / ml Ag na dołek ($p = ns$). Przy niższych stężeniach Ag nie obserwowano proliferacji komórek (dane nie pokazane na wykresie).

Ryc.3. EC toleryzacja antygenem białkowym hamuje proliferację komórek Tef *in vitro*.

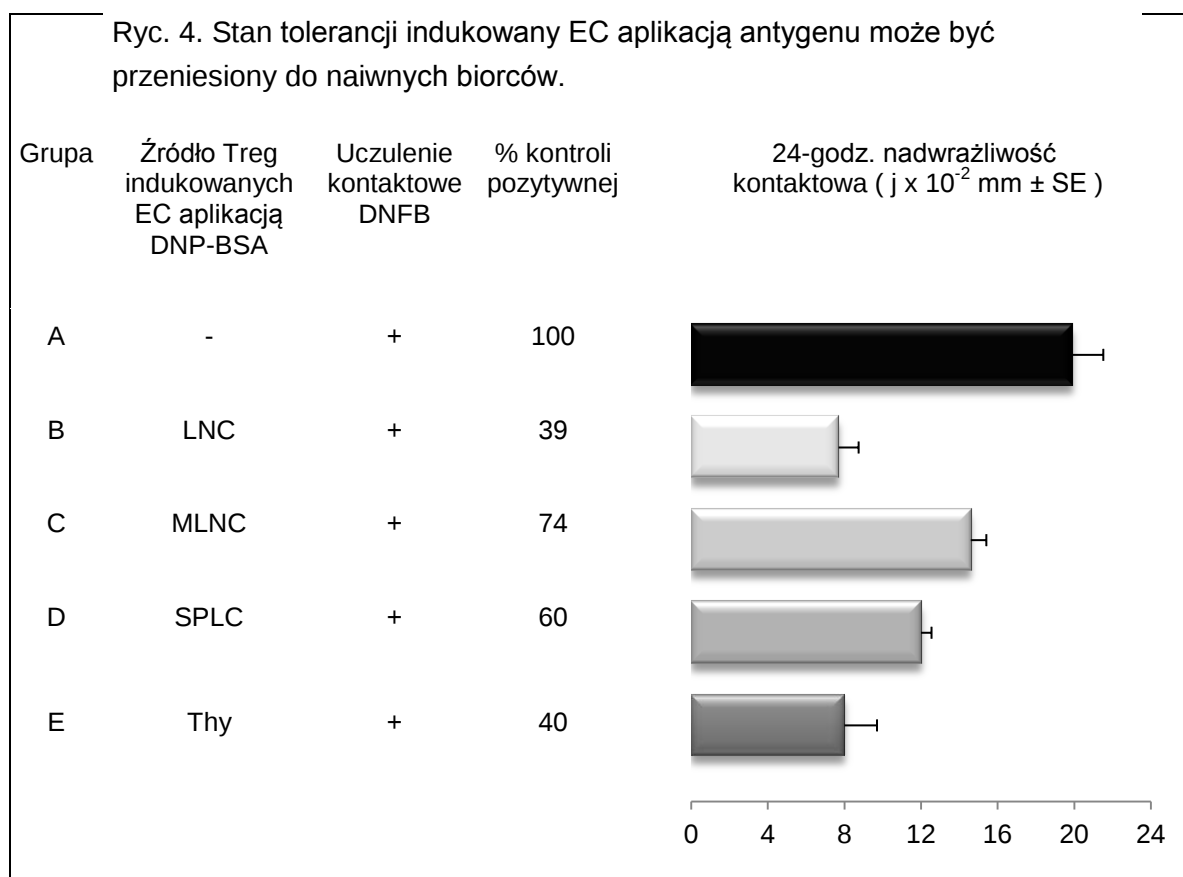


4.4. STAN TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ INDUKOWANY EC APLIKACJĄ ANTYGENU MOŻNA PRZENIEŚĆ DO NAIWNYCH BIORCÓW PRZY UŻYCIU KOMÓREK UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO.

W kolejnym eksperymencie postanowiono sprawdzić, czy stan tolerancji immunologicznej wywołany poprzez EC aplikację antygeny może być przeniesiony do naiwnych (niczym wcześniej nie traktowanych) biorców oraz za pomocą których narządów immunologicznych jest to możliwe. W tym celu indukowano komórki regulacyjne Treg u myszy szczepu BALB/c poprzez EC aplikację DNP-BSA. Po siedmiu dniach pobierano węzły chłonne pachowe i pachwinowe (LN), węzły chłonne krezkowe (MLN), śledziony (SPL) oraz grasice (Thy). W kolejnym etapie naiwnym, syngenicznym biorcom podawano *i.v.* zawiesinę komórek Treg w ilości 5×10^7 komórek / mysz. Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą 3.2.7. opisaną w Materiałach i Metodach. Dwie godziny później myszy uczulano DNFB. Myszy w kontroli pozytywnej (Ryc. 4, Grupa A) nie otrzymały mieszaniny komórek Treg, lecz były wyłącznie traktowane haptenem w celu indukcji CHS.

Wyniki przedstawione na Ryc. 4 pokazują, że stan supresji immunologicznej indukowany naskórnym podaniem DNP-BSA może być przeniesiony do naiwnych zwierząt, oraz że komórki Treg zdolne do hamowania reakcji CHS są zlokalizowane

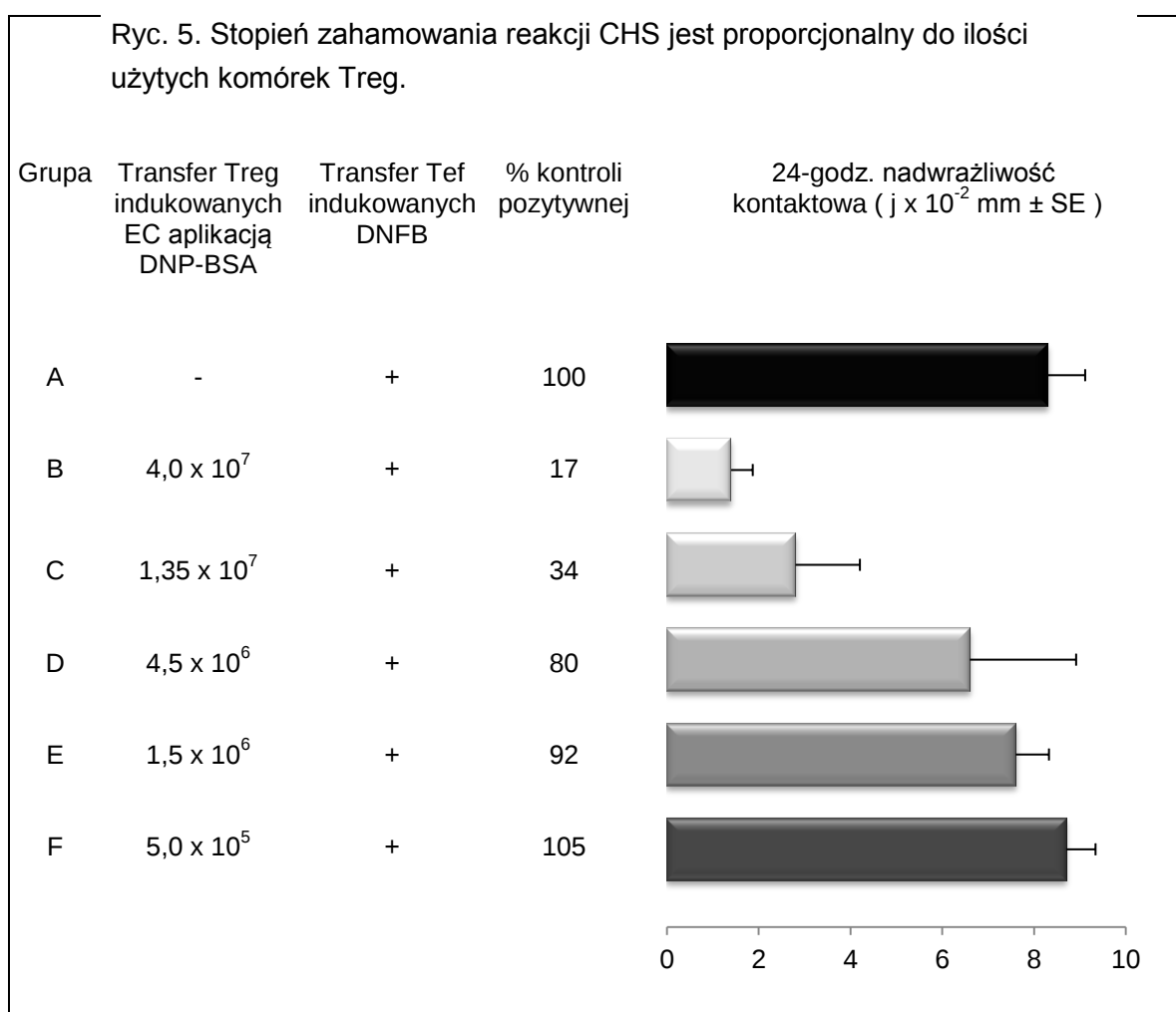
w węzłach chłonnych pachowych i pachwinowych (Grupa B), śledzionie (Grupa D) oraz grasicy (Grupa E), natomiast są nieobecne w węzłach chłonnych krezkowych (Grupa C). Dlatego w kolejnych eksperymentach, w których wywoływano supresję, pobierano i przenoszono wyłącznie LNC i SPLC jako reprezentatywne narządy zawierające komórki Treg, podając je w stosunki 1:1, w ilości 5×10^7 kom / biorcę. Istotność statystyczna: Grupy B, D, E vs Grupa A, $p < 0,05$; Grupa C vs Grupa A, $p = ns$.



4.5. STOPIEŃ ZAHAMOWANIA REAKCJI CHS ZALEŻY OD ILOŚCI PRZENIESIONYCH KOMÓREK TREG.

Posługując się modelem „transferu in” wykazano, że zjawisko tolerancji immunologicznej wywołanej przez EC aplikację antygeny można przenieść na naiwnych biorców za pomocą komórek węzłów chłonnych, śledziony i grasicy. Aby sprawdzić potencjał działania komórek regulacyjnych indukowanych EC podaniem antygeny, 7×10^7 komórek Tef inkubowano z malejącymi ilościami komórek Treg (Ryc. 5): Grupa B – $4,0 \times 10^7$ kom / mysz, Grupa C – $1,35 \times 10^7$ kom / mysz, Grupa D – $4,5 \times 10^6$ kom / mysz, Grupa E – $1,5 \times 10^6$ kom / mysz i Grupa F – $5,0 \times 10^5$ kom / mysz, przed adoptywnym przeniesieniem do naiwnych syngenicznych biorców szczepu BALB/c (procedura

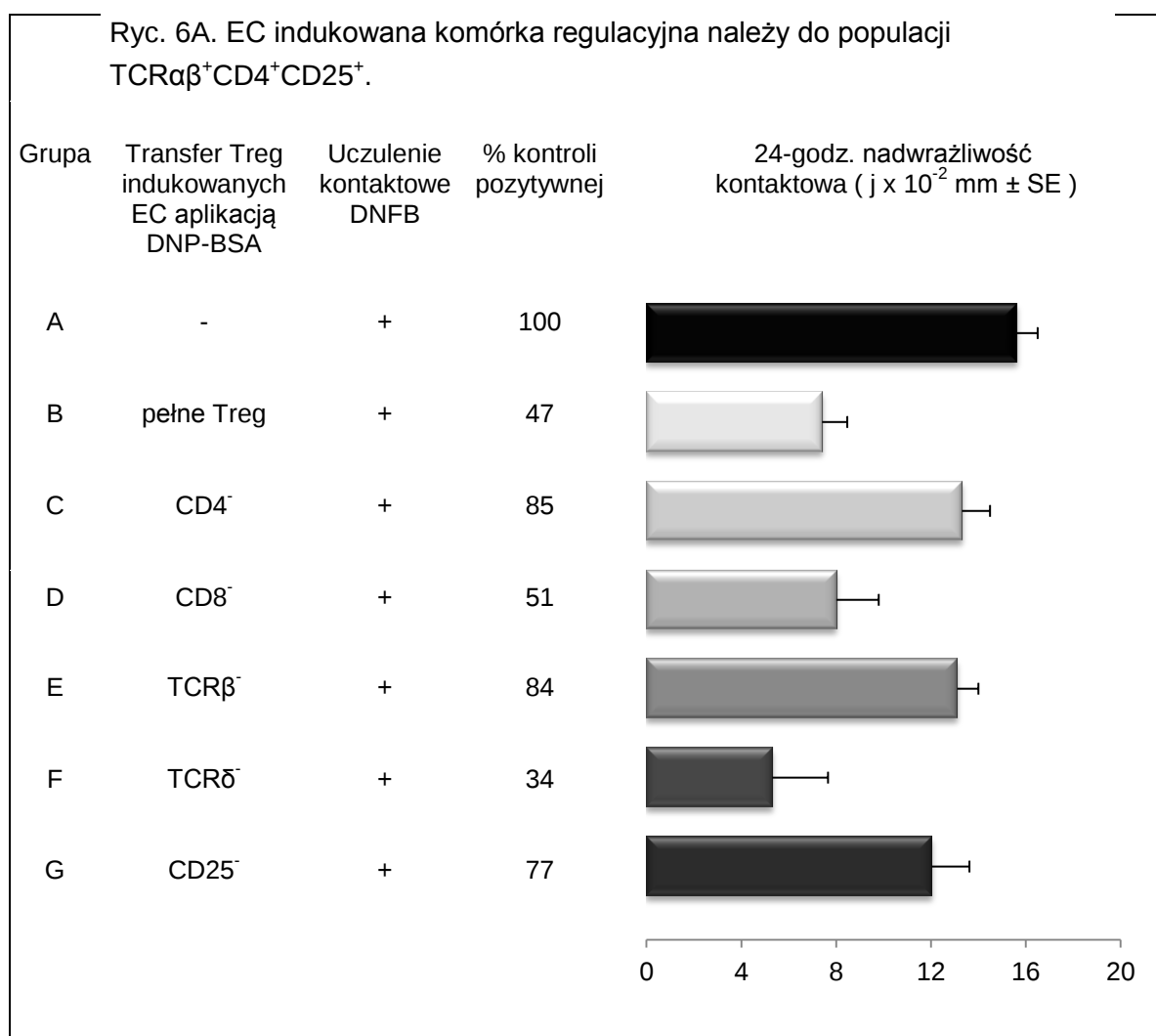
opisana w punkcie 3.2.8.). Wszystkie grupy myszy godzinę po przeniesieniu komórek zostały poddane procedurze wywołania fazy efektorowej CHS oraz przeprowadzono u nich test CHS. Wyniki przedstawione na Ryc. 5 wskazują iż, minimalna ilość komórek Treg potrzebnych do zahamowania działania 7×10^7 komórek Tef wynosi $1,35 \times 10^7$ (Grupa C). Istotność statystyczna: Grupy B i C vs Grupa A, $p < 0,02$; Grupy D, E, F vs Grupa A, $p = ns$.



4.6. NASKÓRNICIE INDUKOWANE KOMÓRKI TREG NALEŻĄ DO POPULACJI LIMFOCYTÓW $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+$.

W badaniach nad regulacją odpowiedzi immunologicznej istotne zagadnienie stanowi scharakteryzowanie komórki odpowiedzialnej za obserwowane zjawisko supresji. W celu ustalenia fenotypu komórki supresyjnej *in vivo*, w pierwszym etapie badań posłużono się metodą selekcji negatywnej, w której transferowano LNC pozbawione różnych populacji limfocytów przy użyciu odpowiednich mAb i dopełniacza. W tym celu

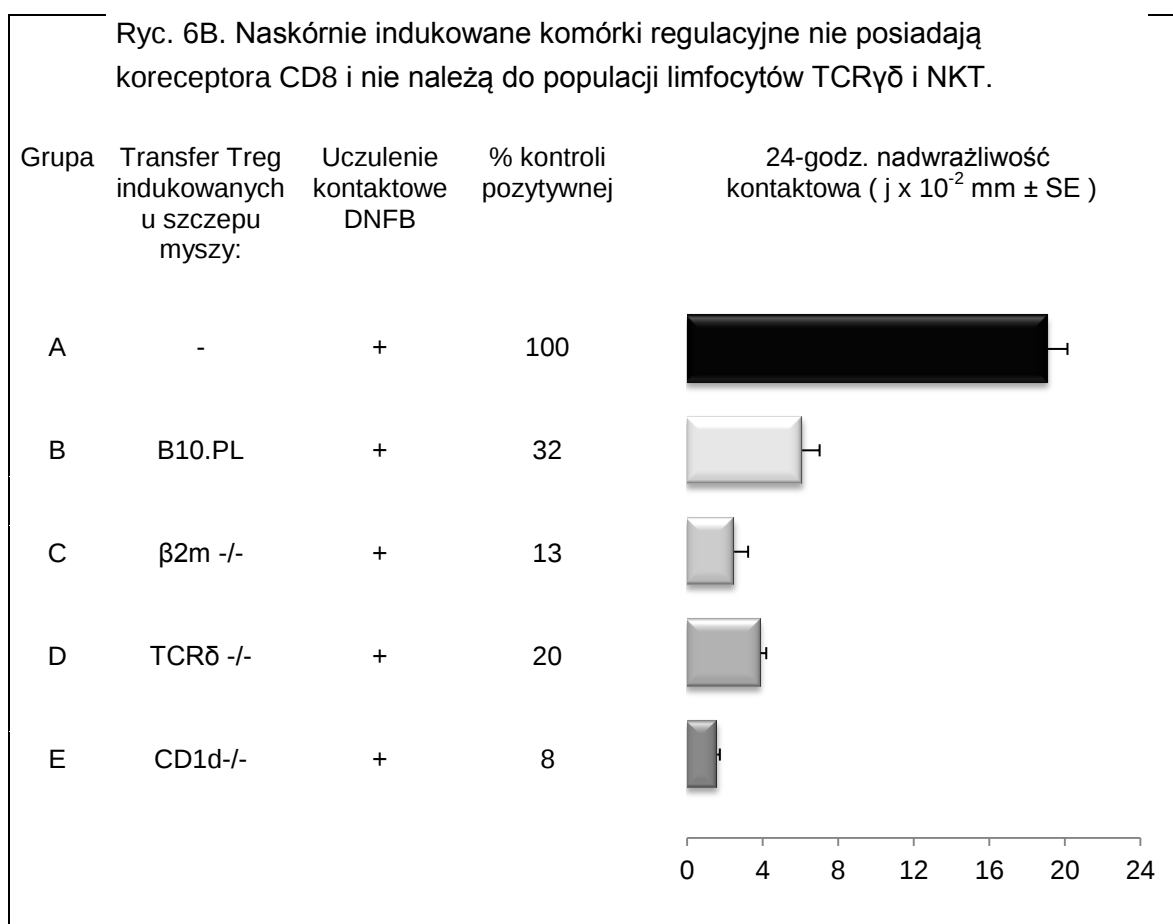
LNC pozyskane od myszy BALB/c EC traktowanych DNP-BSA inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi (mAb): anti-CD4 (Ryc. 6a, Grupa C), anti-CD8 (Grupa D), anti-TCR β (Grupa E), anti-TCR δ (Grupa F), anti-CD25 (Grupa G) wraz z dopełniaczem króliczym (RC). W kontroli supresji komórki traktowano samym RC (Grupa B). Eksperyment opisano w rozdziale Materiały i Metody w punkcie 3.2.10. Po odpłukaniu komórek, podawano je *i.v.* syngenicznym biorcom BALB/c. Dwie godziny później indukowano u myszy reakcję CHS aplikując na skórę brzucha hapten (0,5% DNFB), a pięć dni później traktowano zwierzęta 0,1% DNFB na uszy w celu wywołania reakcji CHS. Przyrost grubości małżowiny usznej mierzono po 24 godzinach od podania haptenu na uszy. Kontrolę pozytywną stanowiły myszy, u których wyłącznie wywoływano reakcję CHS (Grupa A).



Wyniki przedstawione na Ryc. 6A pokazują, że usunięcie komórek CD4, TCR $\alpha\beta$ oraz CD25 (Grupy C, E i G) znosi stan tolerancji immunologicznej, podczas gdy deplecja komórek CD8 albo TCR $\gamma\delta$ (Grupy D i F) indukowana EC podaniem DNP-BSA nie eliminuje

supresji. Z niniejszego doświadczenia wynika, że komórka Treg należy do populacji limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$. Istotność statystyczna: Grupy B, D, F vs Grupa A, $p<0,01$; Grupy C, E, G vs Grupa A, $p=\text{ns}$.

Wyniki uzyskane metodą selekcji negatywnej zostały potwierdzone poprzez indukcję komórek regulacyjnych u defektywnych szczepów myszy: $\text{TCR}\delta^-/-$ (myszy nie posiadające limfocytów T z receptorem $\text{TCR}\gamma\delta$), $\text{CD1d}^-/-$ (myszy nie posiadające limfocytów NKT CD1d zależnych), oraz $\beta_2\text{m}^-/-$ (myszy, u których brak limfocytów T CD8). W kontroli supresji, komórki regulacyjne były indukowane u myszy szczepu kontrolnego B10.PL. Komórki wyizolowane z węzłów chłonnych i śledzion w/w szczepów myszy zostały podane dożylnie naiwnym biorcom szczepu B10.PL, u których indukowano reakcję CHS, którą testowano 5 dni później. Pozytywna kontrola stanowiła grupę zwierząt, u których wyłącznie wywoływano CHS. Eksperyment przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną na Schemacie 2, opisaną w punkcie 3.2.7.



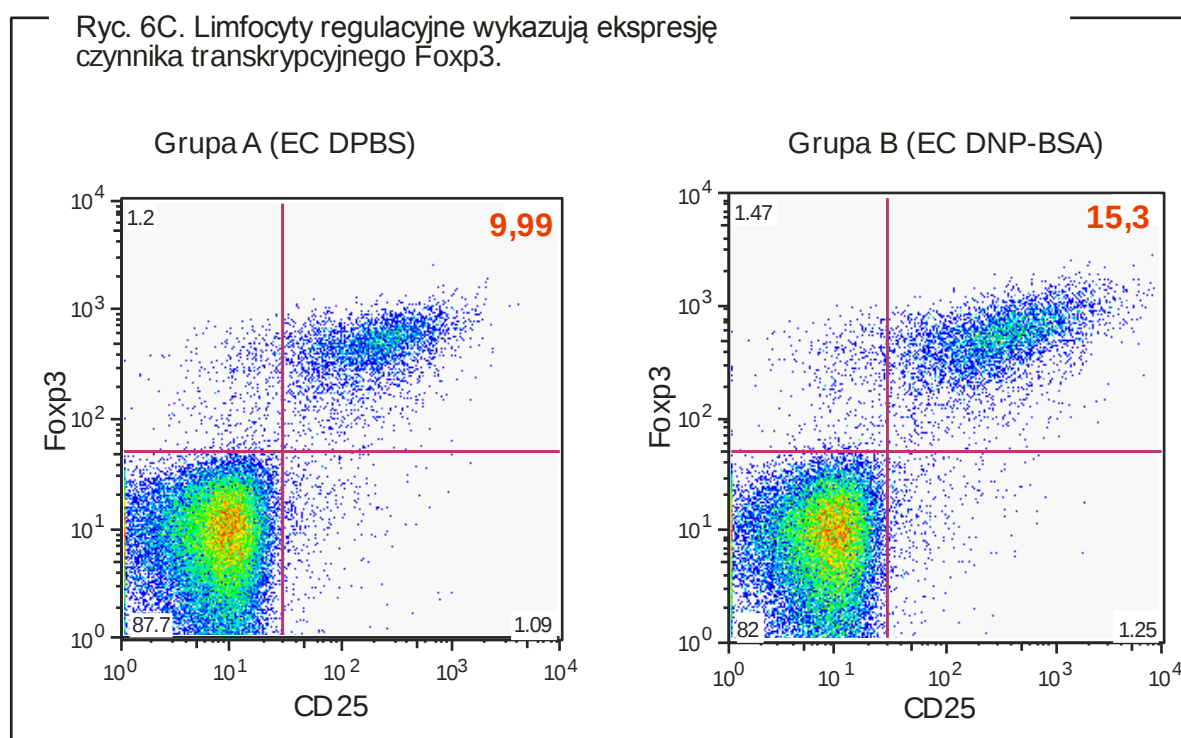
Wyniki przedstawione na Ryc. 6B pokazują, że możliwe jest, że indukowanie komórek Treg u myszy nie posiadających limfocytów T CD8 (Grupa C), nie posiadających limfocytów T z receptorem $\text{TCR}\gamma\delta$ (Grupa D) oraz takich u których brak jest limfocytów NKT (Grupa E). Świadczy to, że komórki Treg nie zależą do populacji limfocytów $\text{TCR}\gamma\delta^+$,

nie posiadają na swojej powierzchni koreceptora CD8 oraz nie są komórkami NKT (odpowiednio Grupy D, C i E). Istotność statystyczna: Grupy B - E vs Grupa A, $p < 0,001$.

Kolejny test, który przeprowadzono miał na celu zbadanie czy EC toleryzacja antygenem DNP-BSA powoduje powstanie komórek regulacyjnych, które posiadają czynnik transkrypcyjny Foxp3.

W tym celu indukowano komórki Treg u myszy szczepu C57BL/6 poprzez tygodniowe EC podanie DNP-BSA (Ryc. 6C, Grupa B) lub traktowanie DPBS (Grupa A). W analizie cytofluorymetrycznej w zawiesinie komórek LNC wyodrębniono populację limfocytów na podstawie wielkości i ziarnistości komórek (FSC vs SSC), a następnie wybrano populację limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+$, którą oceniano na obecność molekuly powierzchniowej CD25 oraz czynnika transkrypcyjnego Foxp3. Do doświadczenia dołączono kontrole izotypowe dla wszystkich używanych przeciwciał. Stosowną procedurę opisano w Materiałach i Metodach w punkcie 3.2.11. Wyniki przedstawione na Ryc. 6C pokazują, EC aplikacja DNP-BSA indukuje przyrost odsetka limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$. Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A, $p < 0,01$. EC aplikacja DNP-BSA prowadzi także do wzrostu całkowitej liczby komórek Treg w węzłach chłonnych ($1,6 \times 10^6 \pm 0,14$ – DNP-BSA vs $0,18 \times 10^6 \pm 0,22$ DPBS).

Podobne obserwacje poczyniono u myszy szczepu BALB/c oraz NOD – nieotyłe myszy cukrzycowe (wyniki nie prezentowane w pracy).



Podsumowując komórki Treg indukowane EC aplikacją antygeny białkowego DNP-BSA należą do populacji limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$. Natomiast limfocyty $\text{TCR}\gamma\delta^+$, CD8^+ oraz NKT wydają się nie odgrywać istotnej roli w opisywanym fenomeń supresji.

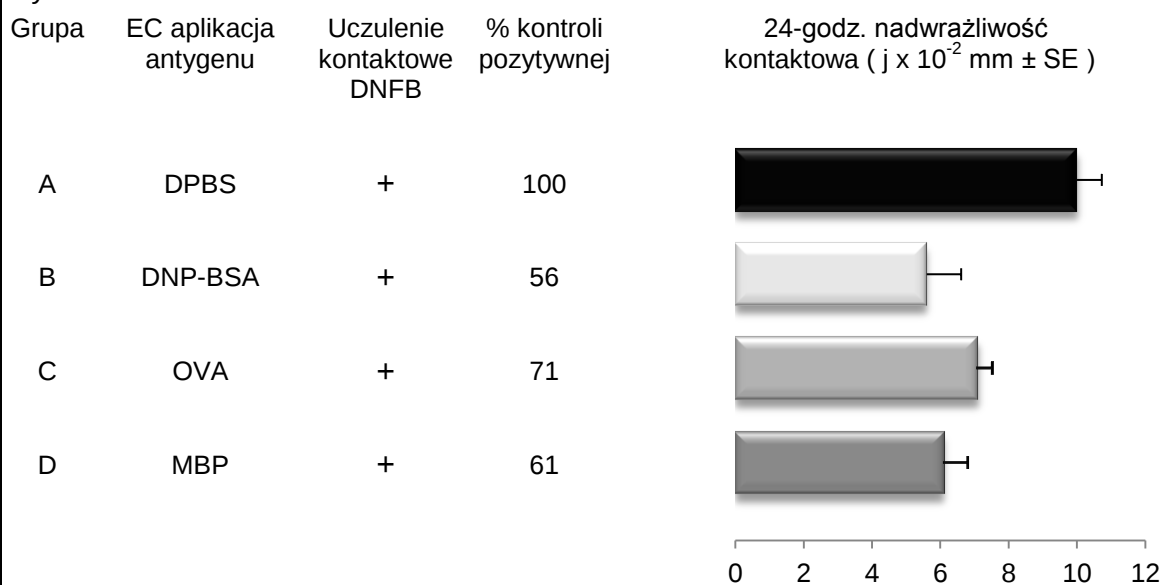
4.7. STAN TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ INDUKOWANY EC APLIKACJĄ ANTYGENU BIAŁKOWEGO JEST ANTYGENOWO NIESWOISTY.

Kolejnym krokiem w badaniach nad EC indukowaną supresją było sprawdzenie czy wykazuje ona swoistość antygenową. W tym celu użyto trzech modeli doświadczalnych. W modelu aktywnej toleryzacji myszy szczepu BALB/c eksponowano na nie reagujące ze sobą krzyżowo antygeny: DNP-BSA, OVA (owalbumina), MBP (zasadowe białko mieliny) oraz OX-Ig (immunoglobuliny mysie skoniugowane z oksazolonem). Po tygodniowej EC toleryzacji w/w antygenami, zwierzęta aktywnie immunizowano 0,5% DNFB, a po upływie pięciu dni wywoływano fazę efektorową reakcji CHS (procedura zgodna ze Schematem 1 opisanym w rozdziale Materiały i Metody). Wyniki przedstawione na Ryc. 7A pokazują, że EC aplikacja DNP-BSA (Ryc. 7A.1 i 7A.2, Grupy B) oraz antygenów nie reagujących krzyżowo z DNP, takich jak OVA, MBP (Ryc. 7A.1, Grupy C i D) oraz OX-Ig (Ryc. 7A.2, Grupa C) znamienne hamują odpowiedź CHS. Wynik ten wskazuje na brak swoistości antygenowej obserwowanego zjawiska tolerancji immunologicznej. Istotność statystyczna: Ryc. 7A.1.: Grupy B - D vs Grupa A, $p<0,02$; Ryc. 7A.2.: Grupy B, C vs Grupa A, $p<0,001$.

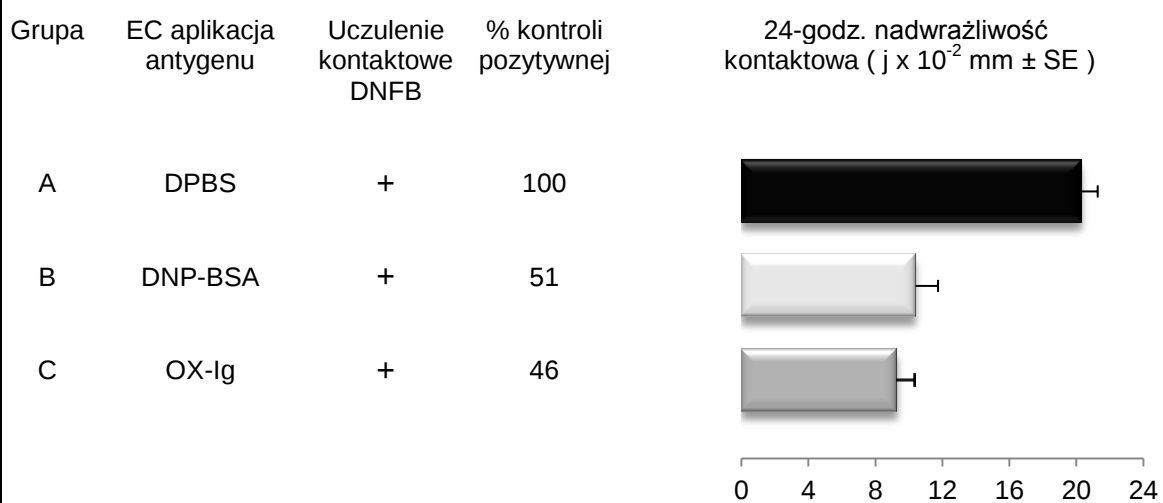
Wynik tego doświadczenia został potwierdzony w modelu adoptywnego „transferu in”, gdzie komórki regulacyjne indukowano EC podaniem: DNP-BSA, MBP i OX-Ig. Komórek Treg podawano *i.v* naiwnym, syngenicznym biorcom szczepu BALB/c, w ilości 5×10^7 kom / biorcę (procedura 3.2.7.). Dwie godziny później myszy uczulano, a następnie testowano na odpowiedź kontaktową. Wyniki przedstawione na Ryc. 7B potwierdzają rezultaty uzyskane w modelu aktywnej toleryzacji, dowodząc brak swoistości antygenowej badanego fenomenu supresji. Istotność statystyczna: Ryc. 7B.1.: Grupy B i C vs Grupa A, $p<0,05$; Ryc. 7B.2: Grupy B, C vs Grupa A, $p<0,01$.

Ryc. 7A. EC aplikacja antygenu białkowego przed uczuleniem DNFB wywołuje stan antygenowo nieswoistej tolerancji.

Ryc. 7A.1.

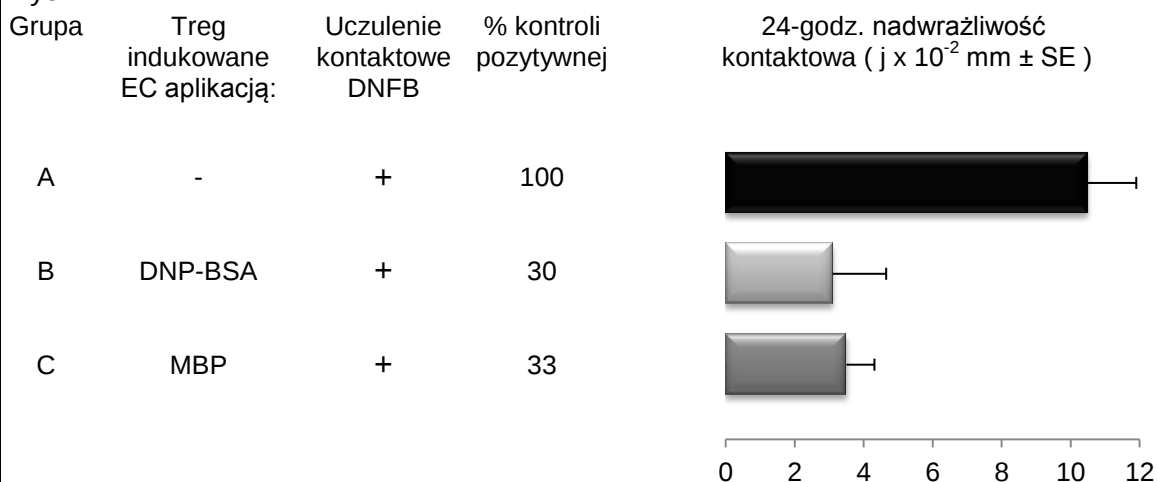


Ryc. 7A.2.

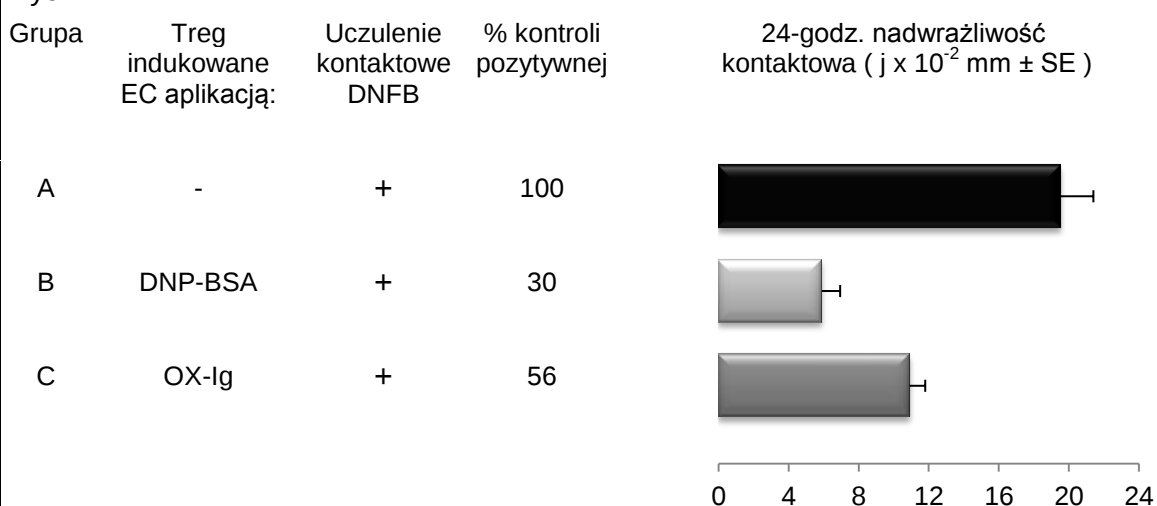


Ryc. 7B. EC aplikacja antygenu białkowego przed uczuleniem DNFB wywołuje stan antygenowo nieswoistej tolerancji – model „transfer in”.

Ryc. 7B.1.



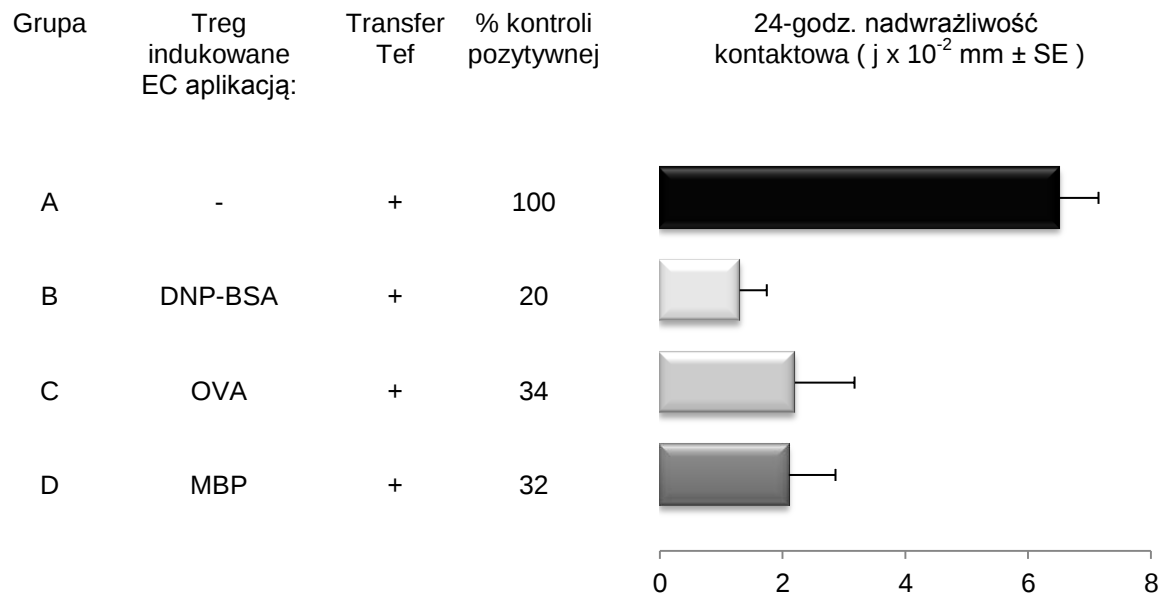
Ryc. 7B.2.



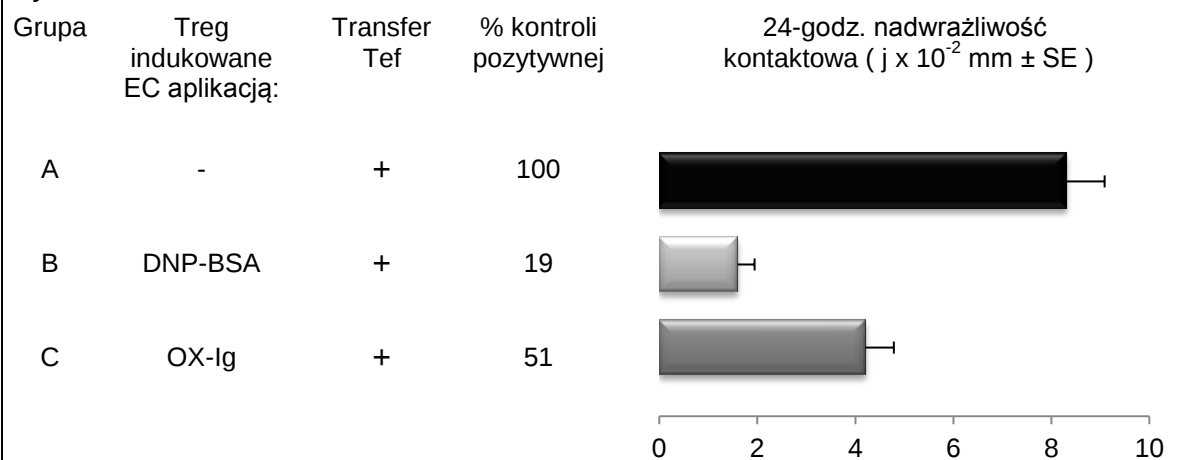
W kolejnym modelu tzw. „transfer out” komórki efektorowe CHS swoiste dla DNFB były inkubowane z komórkami regulacyjnymi indukowanymi EC podaniem DNP-BSA, OVA, MPB lub OX-Ig. Do indukcji komórek Tef i Treg oraz jako biorców użyto myszy szczepu BALB/c. Komórki Tef w ilości 7x10⁷ / biorcę (LNC + SPLC w stosunku 1:1) inkubowano z komórkami Treg w ilości 5x10⁷ / biorcę (LNC + SPLC w stosunku 1:1), a następnie przenoszono do naiwnych biorców, u których dwie godziny później wywoływano reakcję CHS. W kontroli pozytywnej zwierzętom podano wyłącznie komórki Tef. Doświadczenie przeprowadzono zgodnie ze Schematem 3 opisanym w punkcie 3.2.8. w rozdziale Materiały i Metody, a wyniki przedstawiono na Ryc. 7C. Istotność statystyczna: Ryc. 7C.1.: Grupy B-D vs Grupa A, p<0,02; Ryc. 7C.2.: Grupy B, C vs Grupa A, p<0,01.

Ryc. 7C. EC aplikacja antygenu białkowego przed uczuleniem DNFB
wywołuje stan antygenowo nieswoistej tolerancji – model „transfer out”.

Ryc. 7C.1.

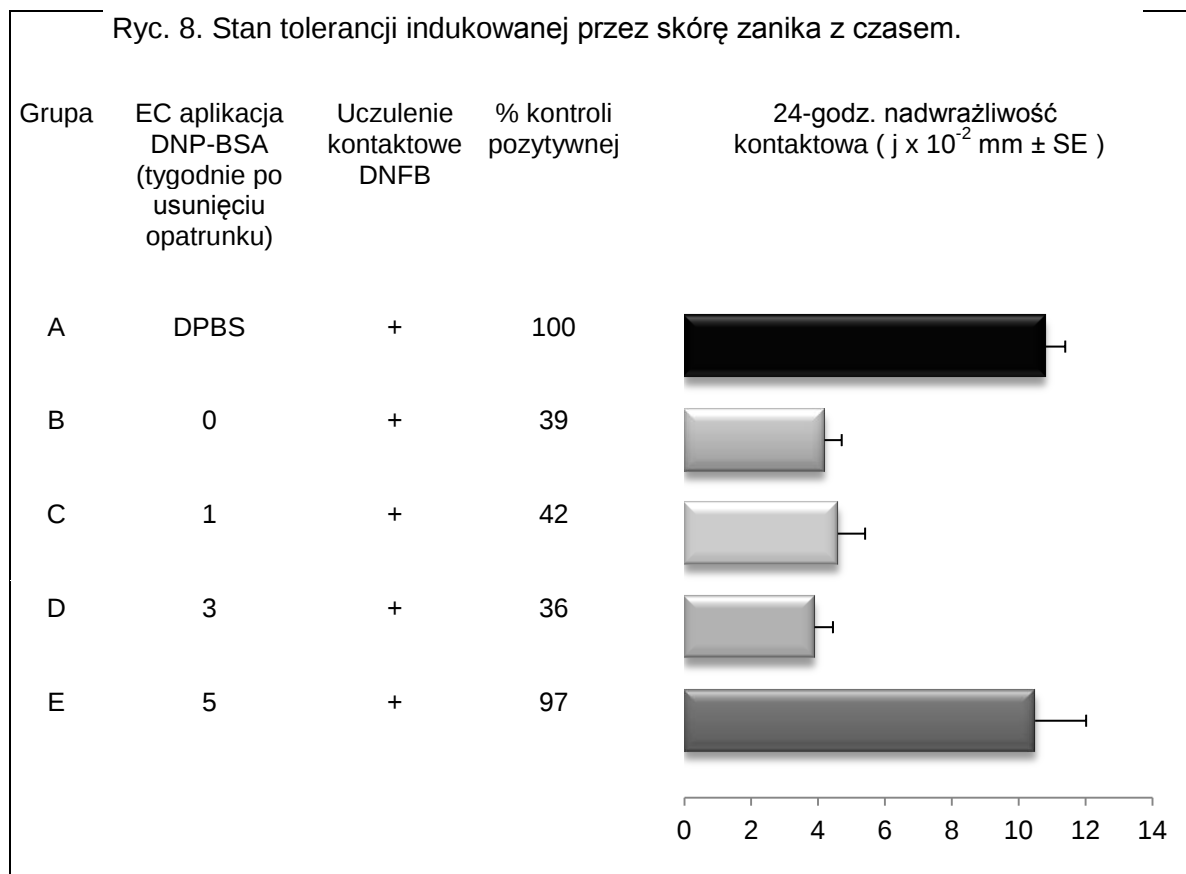


Ryc. 7C.2.



4.8. STAN TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ INDUKOWANY EC APLIKACJĄ ANTYGENU BIAŁKOWEGO ZANIKA Z CZASEM.

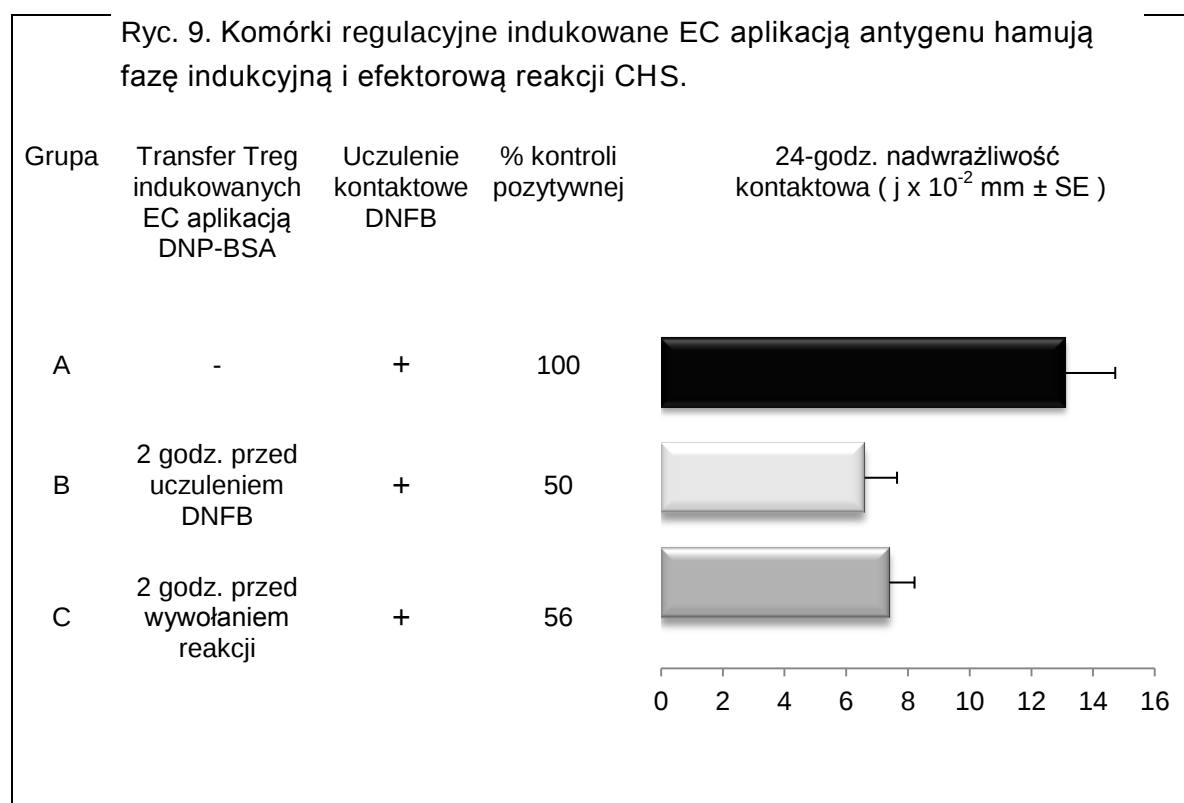
Aby określić jak długo utrzymuje się stan supresji, myszy szczepu BALB/c EC traktowano 100 µg DNP-BSA, zgodnie z procedurą na Schemacie 1. Następnie gaziki z Ag zostały usunięte i zwierzęta immunizowano 0,5% DNFB: natychmiast po zdjęciu opatrunków albo jeden tydzień, trzy tygodnie bądź pięć tygodni później (Ryc. 8, Grupy B-E). Kontrola pozytywna, której podano DPBS na skórę (Grupa A) została natychmiast aktywnie uczulona DNFB po usunięciu gazików. Pięć dni po uczuleniu u wszystkich grup myszy wywołano fazę efektorową i badano w teście CHS. Wykazano, że stan areaktywności immunologicznej utrzymuje się około trzech tygodni od jego indukcji, a całkowicie zanika po pięciu tygodniach. Istotność statystyczna: Grupy B, C, D vs Grupa A, $p < 0,001$; Grupa E vs Grupa A, $p = ns$.



4.9. KOMÓRKI REGULACYJNE INDUKOWANE NASKÓRNĄ APLIKACJĄ ANTYGENU HAMUJĄ FAZĘ INDUKCYJNĄ I EFEKTOROWĄ REAKCJI CHS.

Dotychczas przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na wykazanie, że tygodniowa EC toleryzacja DNP-BSA prowadzi do powstania komórek Treg hamujących reakcję CHS. W kolejnym doświadczeniu postanowiono sprawdzić, czy komórki regulacyjne hamują indukcję komórek Tef czy też blokują ich działanie w fazie wykonawczej. Aby rozstrzygnąć niniejszy problem, 5×10^5 komórek Treg (LNC, SPLC) podawano naiwnym syngenicznym zwierzętom (szczep BALB/c) dwie godziny przed uczuleniem DNFB lub dwie godziny przed wywołaniem reakcji CHS. Pozytywną kontrolę (Ryc. 9, Grupa A) wyłącznie immunizowano 0,5% DNFB. Wszystkie grupy zwierząt badano w teście CHS.

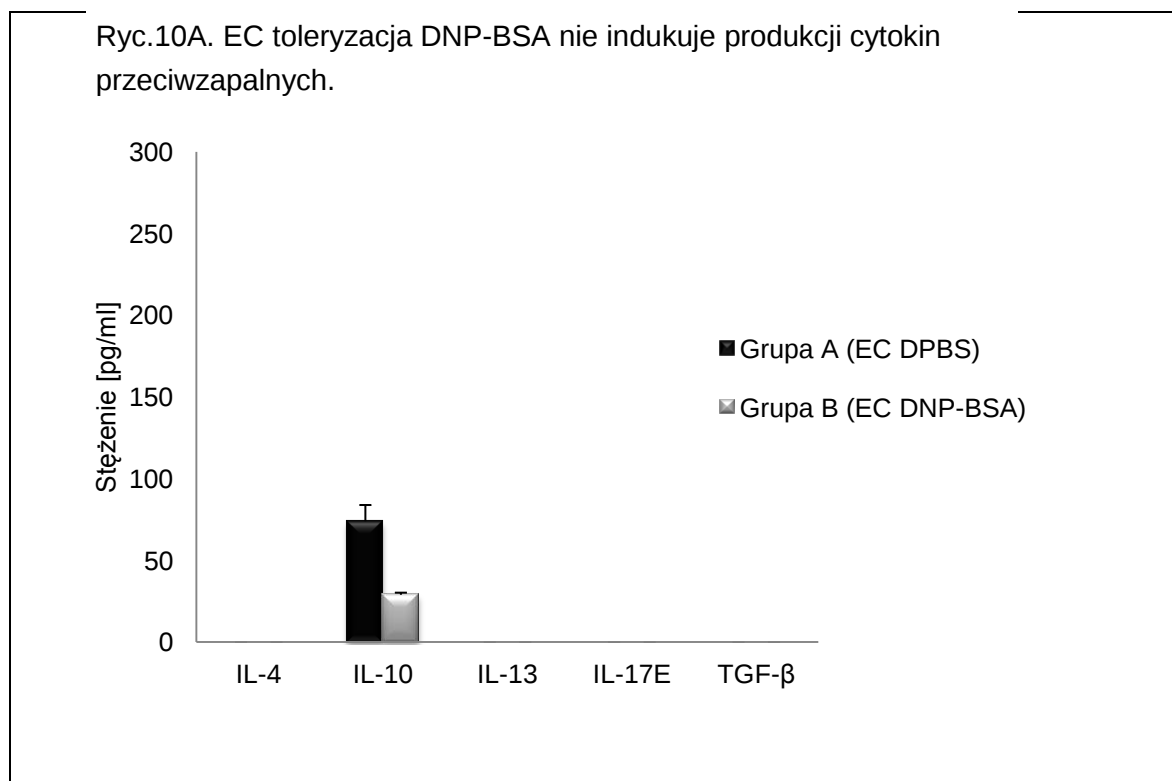
W niniejszym doświadczeniu ustalono, że komórki Treg podane zarówno przed indukcją reakcji CHS jak również podane przed wywołaniem reakcji powodują znaczne zahamowanie reakcji CHS o około 50% względem pozytywnej kontroli. Istotność statystyczna: Grupy B i C vs Grupa A, $p < 0,05$.



4.10. CYTOKINY NIE BIORĄ UDZIAŁU W NASKÓRNIIE INDUKOWANEJ SUPRESJI.

W niniejszym eksperymencie postanowiono sprawdzić, czy cytokiny przeciwzapalne są odpowiedzialne za supresję wywołaną EC podaniem antygeny białkowego. W tym celu, myszy szczepu BALB/c traktowano przez okres tygodnia DPBS (Rycina 10A, Grupa A) lub DNP-BSA (Ryc. 10A, Grupa B). W dniu „+7” izolowano LNC, które następnie hodowano z antygenem DNP-BSA przez 48 godzin. W uzyskanych supernatantach oznaczono poziom następujących cytokin przeciwzapalnych: IL-4, IL-10, IL-13, IL-17E, TGF- β . Doświadczenie przeprowadzono według procedury opisanej w punkcie 3.2.12.

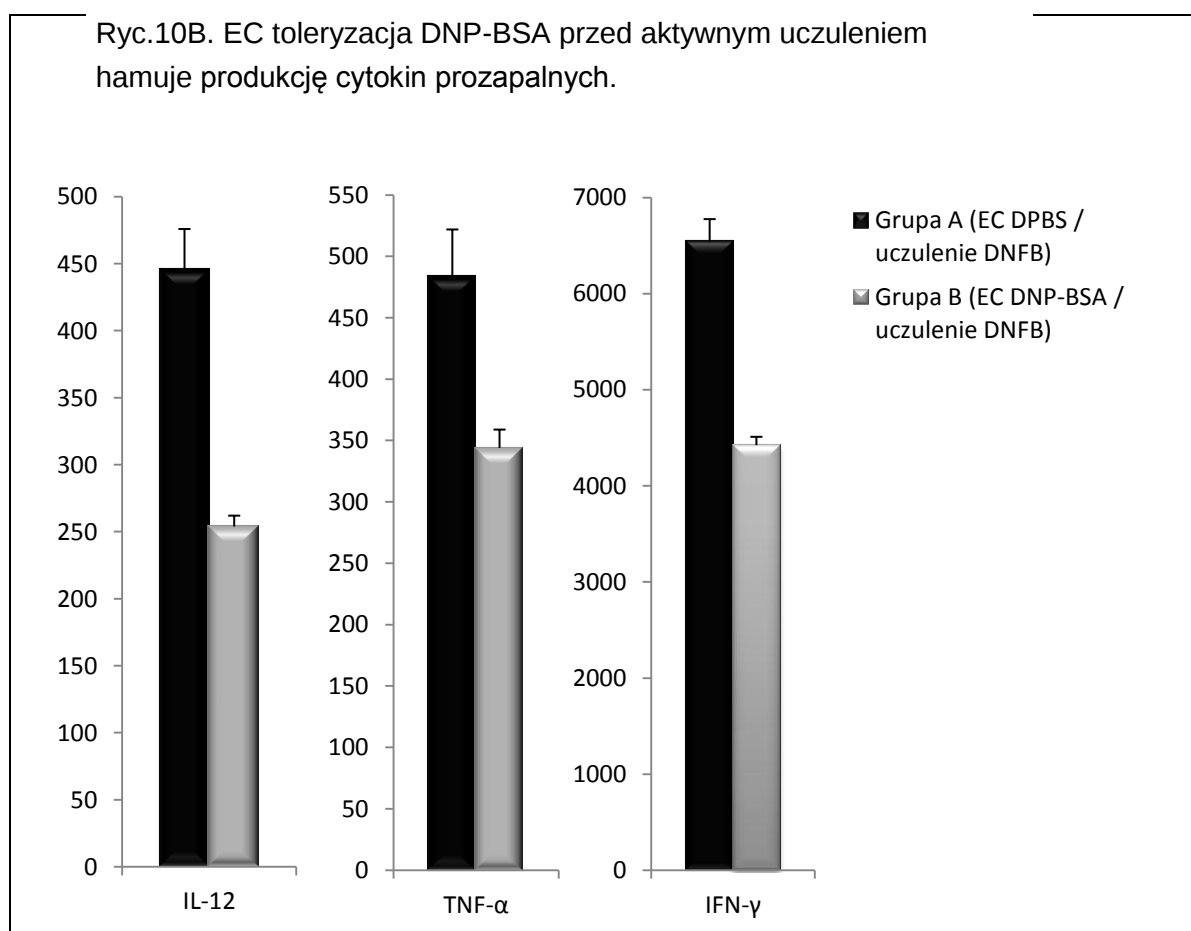
Wyniki przedstawione na Ryc. 10A dowodzą, że EC aplikacja DNP-BSA (Grupa B) nie indukuje produkcji cytokin przeciwzapalnych. Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A dla IL-4, IL-10, IL-13, IL-17E i TGF- β , $p=ns$.



Powszechnie wiadomo, że reakcji zapalnej w tym również reakcji CHS towarzyszy produkcja cytokin prozapalnych. W związku z powyższym w kolejnym eksperymencie sprawdzono, czy EC ekspozycja na DNP-BSA przed aktywnym uczuleniem DNFB zmniejszy produkcję cytokin prozapalnych. W tym celu myszy BALB/c EC traktowano DNP-BSA (Ryc. 10b, Grupa B) lub DPBS (Grupa A) przez tydzień, a następnie uczulano 0,5% DNFB. Po upływie 5 dni od immunizacji została

założona hodowla z LNC w obecności antygeny. Supernatanty zebrane z hodowli były testowane na zawartość: IL-12, TNF- α i IFN- γ . Wyniki na Ryc. 10B pokazują, że poziom wszystkich testowanych cytokin prozapalnych uległ obniżeniu po aplikacji DNP-BSA na skórę, gdy porównano go z poziomem cytokin u myszy traktowanych czystym DPBS. Istotność statystyczna: grupa B vs Grupy A dla IL-12, TNF- α i IFN- γ , $p < 0,01$.

Podsumowując, cytokiny przeciwzapalne nie biorą udziału w EC indukowanej supresji. Manewr EC immunizacji DNP-BSA przed aktywnym uczuleniem DNFB hamuje produkcję cytokin prozapalnych.



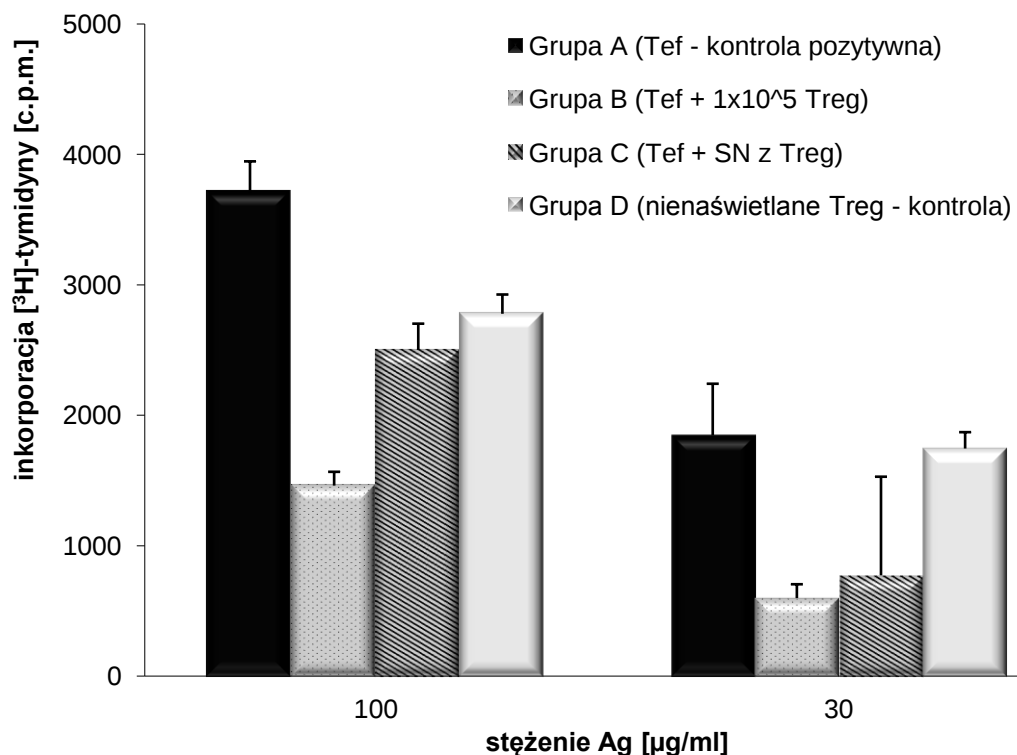
4.11. SUBSTANCJE ROZPUSTCZALNE NIE BIORĄ UDZIAŁU W NASKÓRNICIE INDUKOWANEJ SUPRESJI.

W niniejszym eksperymencie postanowiono sprawdzić, czy substancje rozpuszczalne, inne niż dotychczas przetestowane cytokiny biorą udział w EC indukowanej supresji. W tym celu 3×10^5 komórek Tef hodowano z dodatkiem supernatantu (SN) zebranego z hodowli LNC wyizolowanych od myszy C57BL/6

uprzednio traktowanych DNP-BSA. Całość hodowano w obecności DNP-BSA, w dwóch różnych stężeniach 100 µg / ml i 30 µg / ml. W kontroli pozytywnej komórki Tef hodowano z samym Ag (Ryc. 11, Grupa A), a w kontroli supresji hodowano komórki Tef wraz z komórkami Treg (w stosunku 1:1), w obecności Ag (Grupa B). Aby ocenić wyłącznie proliferację komórek Tef, przed hodowlą komórki Treg były naświetlane promieniami γ, by zahamować ich zdolność do podziału. Dodatkowo dołączono grupę kontrolną, gdzie hodowano same nienaświetlane komórki Treg z Ag (Grupa D). Test proliferacji przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.9.

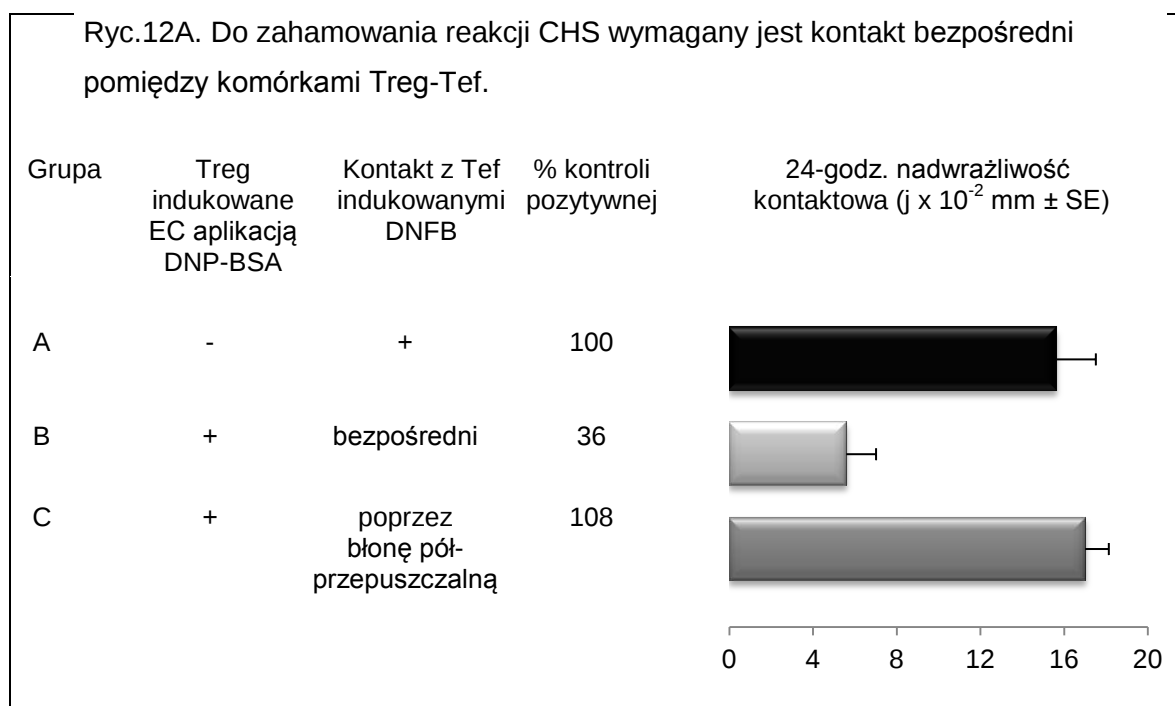
Wyniki przedstawione na Ryc.11 wykazują, że komórki Treg hamują proliferację komórek Tef (Grupa B). Efektu takiego nie obserwowano w sytuacji hodowli komórek Tef z SN (Grupa C). Dodatkowo wykazano, że komórki Treg (nienaświetlane) mają zdolność do proliferacji w obecności antygeny (Grupa D). Istotność statystyczna: dla stężenia Ag 100 µg / ml: Grupa B vs A, $p < 0,01$; Grupy C i D vs A, $p = ns$; dla stężenia 30 µg / ml: Grupa B vs A, $p < 0,05$; Grupy C i D vs A, $p = ns$.

Ryc.11. Substancje rozpuszczalne nie biorą udziału w EC indukowanej supresji.



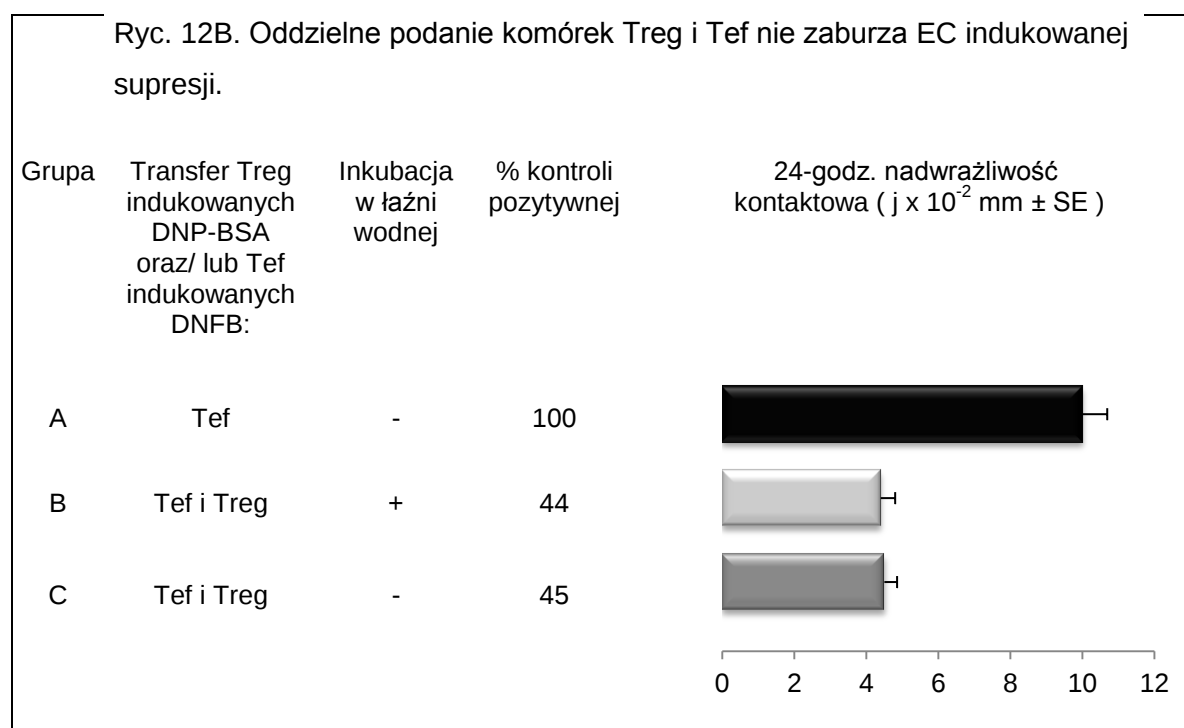
4.12. NASKÓRNIIE INDUKOWANA SUPRESJA WYMAGA BEZPOŚREDNIEGO KONTAKTU POMIĘDZY KOMÓRKAMI TREG I TEF.

W poprzednich doświadczeniach wykazano, że w hamowaniu reakcji CHS cytokiny przeciwzapalne nie odgrywają roli. Warto jednak pamiętać, że komórki o aktywności regulacyjnej mogą hamować działanie komórek efektorowych nie tylko przez substancje rozpuszczalne lecz również poprzez kontakt bezpośredni pomiędzy komórkami Treg-Tef [140, 141]. W związku z powyższym przeprowadzono eksperyment, w którym myszom szczepu BALB/c podano *i.v.* komórki Tef które podczas wcześniejszej inkubacji były oddzielone od komórek Treg błoną półprzepuszczalną (system trans-well chambers), która pozwala na przeniknięcie czynników rozpuszczalnych np. cytokin lecz nie pozwala na bezpośredni kontakt komórek (Ryc. 12A, Grupa C). W grupie kontroli supresji podano komórki Tef, które podczas inkubacji znajdowały się w bezpośrednim kontakcie z komórkami Treg (Grupa B), natomiast grupa kontroli pozytywnej otrzymała wyłącznie komórki Tef (Grupa A). Komórki Treg i Tef były pozyskane od myszy szczepu BALB/c zgodnie z procedurą 3.2.7. oraz 3.2.8., natomiast inkubację komórek przeprowadzono na podstawie procedury 3.2.13. Dwie godziny po dożylnym podaniu komórek, wywołano reakcję CHS poprzez aplikację haptenu 0,1% DNFB na uszy i myszy badano w teście CHS, 24 godziny później.



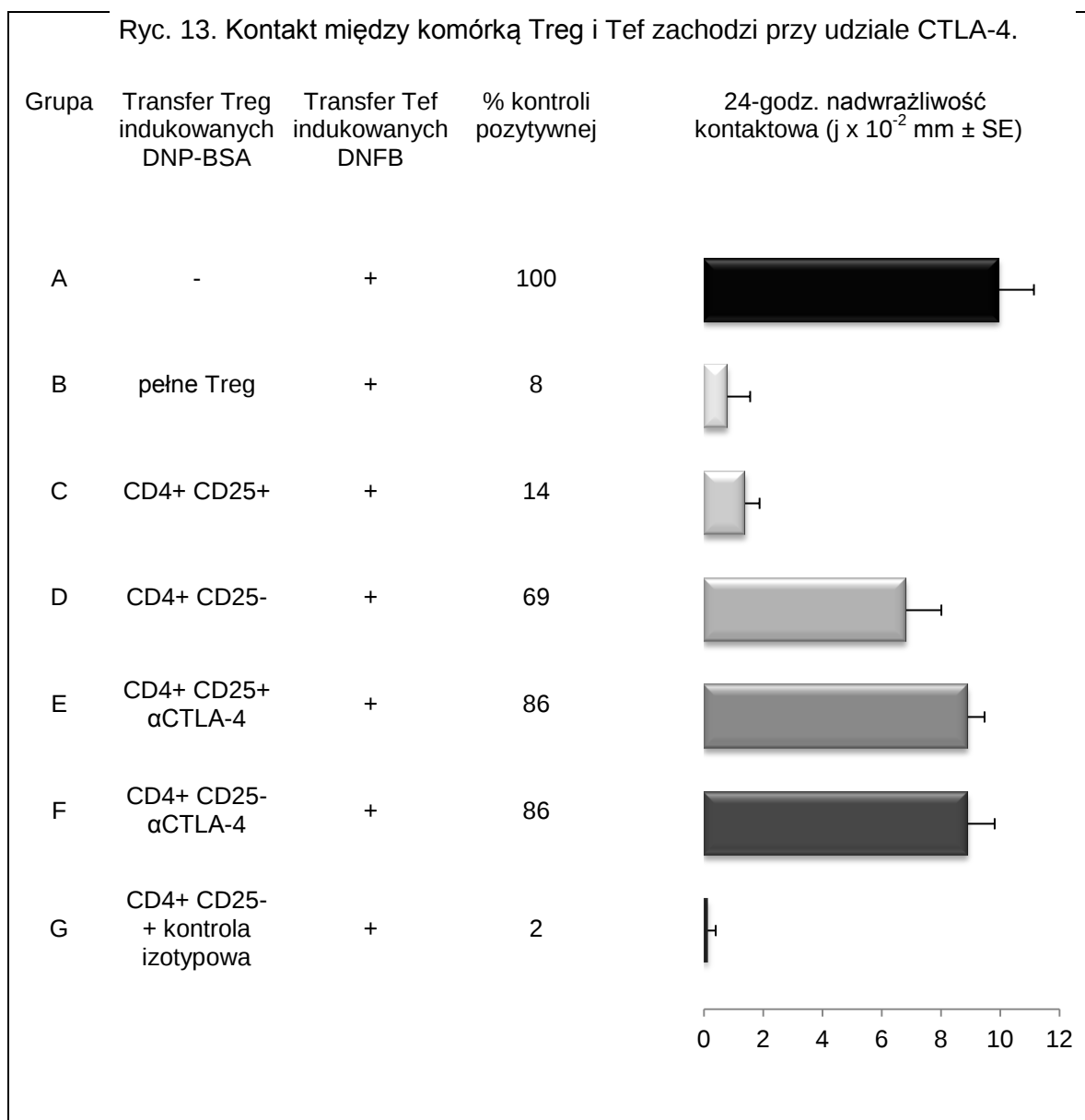
Wyniki zaprezentowane na Ryc. 12A wskazują, że komórki Treg zmieszane z komórkami Tef (Grupa B) hamują reakcję CHS o 64% w porównaniu do grupy kontroli pozytywnej. Zahamowania odpowiedzi nie obserwowano przy rozdzieleniu komórek Treg i Tef podczas inkubacji (Grupa C). Przedstawione wyniki wskazują, że u podstaw EC indukowanej supresji leży bezpośredni kontakt pomiędzy komórkami Treg i Tef. Istotność statystyczna: Grupa B vs Grupa A, $p < 0,01$; Grupa C vs A, $p = ns$.

W poprzednim doświadczeniu wykazano, że w mechanizmie supresji potrzebny jest bezpośredni kontakt między komórką efektorową i regulacyjną. Dlatego w kolejnym doświadczeniu testowano czy oddzielne dożylne podanie komórek Treg i Tef wpływa na supresję. W związku z powyższym przeprowadzono eksperyment, w którym naiwne myszy szczepu BALB/c dostawały *i.v.* komórki Treg (w ilości 5×10^7) i Tef (w ilości 7×10^7) pochodzące od syngenicznych dawców. Zwierzęta w Grupie B (Ryc. 12B) dostały mieszaninę komórek Treg i Tef poddanych wcześniejszej inkubacji *in vitro*, natomiast zwierzęta w Grupie C otrzymały *i.v.* komórki Treg i Tef bez uprzedniej inkubacji *in vitro*, w odstępie 5 minut (procedurę opisano w punkcie 3.2.8.). Grupę kontrolną stanowiły myszy, którym podano wyłącznie komórki Tef (Grupa A). Następnie wszystkie grupy zwierząt poddano testowi CHS. Wyniki przedstawione na Ryc. 12B wskazują, że oddzielne podanie komórek Treg i Tef nie zaburza supresji. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że w/w komórki kontaktują się ze sobą w narządach chłonnych i tam dochodzi do interakcji pomiędzy nimi. Istotność statystyczna: Grupy B i C vs Grupa A, $p < 0,001$.



4.13. MOLEKUŁA CTLA-4 ODGRYWA KLUCZOWĄ ROLĘ W EC INDUKOWANEJ SUPRESJI.

W poprzednich doświadczeniach wykazano, że opisywana supresja wymaga bezpośredniego kontaktu komórek Treg i Tef. Wiadomo, że w supresji odbywającej się na drodze bezpośredniego kontaktu kluczową rolę odgrywa molekuła CTLA-4 (CD152).



W celu sprawdzenia roli CTLA-4 w EC indukowanej supresji przeprowadzono niniejsze doświadczenie, w którym izolowano komórki Treg przy użyciu drobin magnetycznych. Dawców komórek regulacyjnych EC toleryzowano DNP-BSA i po upływie tygodnia pobierano od nich LN, z których następnie izolowano populację komórek CD4⁺CD25⁺ oraz CD4⁺CD25⁻. Limfocyty CD4⁺CD25⁺ inkubowano z limfocytami Tef po uprzednim traktowaniu mAb anti-CD152 (Ryc. 13, Grupa E). W grupach kontrolnych

komórki Tef inkubowano z limfocytami $CD4^+CD25^-$, które uprzednio traktowano (Grupa F) lub nie traktowano (Grupa D) mAb anty-CD152. Dodatkowo dołączono grupy, gdzie komórki Tef inkubowano z limfocytami $CD4^+CD25^+$ traktowanymi przeciwciałami kontrolnymi (kontrola izotopowa, Grupa G) lub samym medium (Grupa C). Kontrolę supresji stanowiły komórki Tef inkubowane z nieseparowanymi limfocytami regulacyjnymi (Grupa B), podczas gdy w kontroli pozytywnej przenoszono jedynie komórki efektorowe (Grupa A). Tak przygotowane komórki podawano naiwnym syngenicznym biorcom szczepu BALB/c, u których dwie godziny później wywoływano reakcję CHS i oceniano ją 24 godziny później. Doświadczenie opisano w Materiałach i Metodach w punkcie 3.2.14.

Wyniki przedstawione na Ryc. 13 wykazują, że limfocyty $CD4^+CD25^+$ są odpowiedzialne za EC indukowaną supresję (Grupa C), a mechanizm ich działania zależy od molekuly CTLA-4 (Grupa E). Istotność statystyczna: Grupy B, C, G vs Grupa A, $p < 0,001$; Grupy D, E, F vs Grupa A, $p = ns$.

Organizm człowieka stale narażony jest na działanie licznych czynników patogennych, dlatego też niezbędne jest istnienie mechanizmów umożliwiających szybkie rozpoznanie i reagowanie na substancje zagrażające zdrowiu i życiu ustroju. Prawidłowe funkcjonowanie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej swoistej (nabytej) podlega precyzyjnej regulacji, w której kluczową rolę odgrywają limfocyty T regulacyjne (Treg). Komórki Treg są odpowiedzialne za niedopuszczenie do odpowiedzi na autoantygeny, jak również regulują nasilenie i czas trwania odpowiedzi na antygeny obce. Zaburzenia w działaniu mechanizmów regulacyjnych mogą prowadzić do rozwoju schorzeń autoimmunologicznych oraz do odpowiedzi na antygeny obojętne, w wyniku czego dochodzi do rozwoju alergii [142, 143].

Ustrój człowieka kontaktuje się z otoczeniem poprzez dwie bariery anatomiczne tj. skórę oraz błony śluzowe. Powszechnie wiadomo, że podanie antygeny na błony śluzowe poza wywołaniem lokalnej odpowiedzi immunologicznej na śluzówkach prowadzi jednocześnie do powstania stanu tolerancji na obwodzie [109, 144]. Zjawisko to leży u podstaw tolerancji śluzówkowej (np. tolerancja pokarmowa). Z kolei skórę przez szereg lat traktowano jako miejsce, w którym stosunkowo łatwo można indukować silną odpowiedź komórkową, której klasycznym przykładem jest reakcja nadwrażliwości kontaktowej podczas gdy skórę jako miejsce, w którym można indukować tolerancję nie poświęcano większej uwagi [145].

Ze względu na znaczne podobieństwo funkcjonalne obu barier anatomicznych, można przypuszczać, że podobnie jak ma to miejsce w przypadku śluzówek podanie antygeny na skórę poza indukcją odpowiedzi immunologicznej, przy spełnieniu odpowiednich warunków pozwoli także na wywołanie stanu tolerancji immunologicznej.

Wang i wsp. zaobserwowali, że naskórne podanie owoalbuminy indukuje atopowe zapalenie skóry, któremu towarzyszy wydzielanie IL-4 przez limfocyty Th2 z jednoczesną syntezą przeciwciał IgE oraz IgG1 [146, 147]. Następnie Herrick i wsp. wykazali, że EC aplikacja OVA wywołuje model zwierzęcy astmy u myszy [148]. Powszechnie wiadome jest, że cytokiny uwalniane przez komórki Th2 mogą hamować odpowiedź zależną od limfocytów Th1 [149]. W oparciu o powyższe obserwacje wysunięto hipotezę, że przy spełnieniu odpowiednich warunków, EC immunizacja antygenem białkowym przed indukcją odpowiedzi Th1 zależnej może powodować jej zahamowanie.

Badania prowadzone od wielu lat w Katedrze Biologii Medycznej UJ CM wykazały, że EC aplikacja antygeny białkowego, w postaci opatrunku z gazy prowadzi do opóźnienia wystąpienia objawów chorobowych oraz hamuje proces zapalny towarzyszący schorzeniom autoimmunizacyjnym u myszy, spośród których znajdują się eksperymentalne zapalenie rdzenia kręgowego i mózgu [123, 124, 125, 126] oraz kolagenowe zapalenie stawów [127]. Ponadto zaobserwowano, że manewr EC immunizacji antygenem białkowym spowalnia proces odrzucania allogenicznego przeszczepu skóry [150]. Dalsze badania wykazały, że EC aplikacja antygeny białkowego wywołuje stan tolerancji, prowadzący do zahamowania odpowiedzi komórkowej na TNP w modelu reakcji CHS $CD4^+$ Th1 zależnej. Supresja CHS wywołana EC podaniem antygeny białkowego nie wykazuje swoistości antygenowej i jest wynikiem działania limfocytów $TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^+$ wywierających swoje działanie regulacyjne za pośrednictwem uwalnianego $TGF-\beta$ [118, 120, 121, 151]. Z kolei badania kliniczne przeprowadzone w grupie pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane potwierdziły skuteczność tej metody w terapii u ludzi [130]. We wszystkich dotychczas testowanych modelach doświadczalnych badano skuteczność EC indukowanej tolerancji w negatywnej regulacji reakcji $CD4^+$ Th1 zależnej. Natomiast do chwili obecnej nie było wiadomo, czy niniejsza metoda jest również skuteczna w hamowaniu reakcji $CD8^+$ zależnej. W związku z tym w niniejszej pracy postanowiono sprawdzić, czy EC aplikacja antygeny białkowego w postaci opatrunku z gazy jest w stanie negatywnie regulować odpowiedź komórkową zależną od limfocytów $CD8^+$. Jako model doświadczalny wykorzystano reakcję CHS $CD8^+$ Tc1 zależną.

W pierwszym etapie badań pokazano, że faktycznie EC aplikacja antygeny białkowego DNP-BSA przed aktywnym uczuleniem 0,5% DNFB prowadzi do znamienego zahamowania reakcji CHS, a proces ten jest zależny od dawki antygeny, która mieści się w przedziale pomiędzy 100 a 3 μg / mysz (Ryc. 1). Obserwowany stan supresji odpowiedzi kontaktowej został zbadany za pomocą pomiaru przyrostu grubości małżowiny usznej, zmiany przepuszczalności naczyń włosowatych w miejscu aplikacji haptenu, zmiany przyrostu „wagi uszu”, zmiany stężenia IFN- γ oraz aktywności MPO w homogenatach bioptatów usznych (Ryc. 2A – E). Powyższe wyniki potwierdzono w teście *in vitro*, wykazując że EC aplikacja antygeny białkowego hamuje proliferację komórek Tef reakcji CHS (Ryc. 3). Powszechnie wiadomo, że reakcji zapalnej, w tym również reakcji CHS towarzyszy produkcja cytokin prozapalnych. W związku z powyższym sprawdzono, czy EC ekspozycja na DNP-BSA przed aktywnym uczuleniem DNFB zmniejszy produkcję tych cytokin. Przeprowadzone badania wykazały, że manewr EC toleryzacji faktycznie hamuje produkcję cytokin prozapalnych takich jak IL-12, IFN- γ oraz TNF- α (Ryc. 10B). Można więc przypuszczać, że mechanizm EC indukowanej tolerancji jest następstwem

między innymi hamowania wydzielania cytokin prozapalnych przez komórki Tef oraz komórki APC.

Postępując się modelem „transferu in” reakcji CHS wykazano, że badany stan tolerancji można przenieść do naiwnych biorców za pomocą komórek węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych, śledziony oraz grasicy myszy. Opisywaną populację komórek zdolnych do przeniesienia supresji nazwano komórkami T regulatorowymi (Treg) (Ryc. 4).

W celu określenia fenotypu populacji komórek Treg posłużono się techniką „negatywnej selekcji”, gdzie przy pomocy odpowiednich przeciwciał mAb i dopełniacza usuwano określone populacje limfocytów T przed procedurą „transferu in” (Ryc. 6A). Wyniki te były potwierdzone w kolejnym eksperymencie, gdzie do indukcji komórek regulacyjnych wykorzystano defektywne szczepy myszy pozbawione określonych populacji limfocytów T takich jak: TCR δ ^{-/-} (myszy nie posiadające limfocytów T z receptorem TCR $\gamma\delta$), CD1d^{-/-} (myszy nie posiadające limfocytów NKT CD1d zależnych), oraz β_2m ^{-/-} (myszy, u których brak limfocytów CD8⁺) (Ryc. 6B). Ponadto do określenia fenotypu komórki regulacyjnej wykorzystano metodę separacji magnetycznej, gdzie przy użyciu przeciwciał mAb sprzężonych z drobinami magnetycznymi izolowano komórki, które następnie podawano naiwnym zwierzętom i badano ich aktywność regulacyjną w teście CHS (Ryc. 13). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że komórką zdolną do zahamowania reakcji CHS w badanym układzie jest limfocyt T o fenotypie TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD25⁺. Populacje limfocytów TCR $\gamma\delta$ oraz limfocytów NKT CD1d zależnych wydają się nie być zaangażowane w EC indukowanej supresji. Uzyskane wyniki różnią się od rezultatów otrzymanych dotychczas w modelu reakcji CHS wywołanej TNP-Cl, gdzie wykazano, że EC aplikacja antygeny TNP-Ig powoduje powstanie komórek o fenotypie TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁺, gdzie zarówno populacja limfocytów CD25⁺ jak i CD25⁻ jest zdolna do hamowania odpowiedzi [122]. Trudno wyjaśnić taką rozbieżność. Prawdopodobnie wynika ona z różnych mechanizmów regulujących odpowiedź Th1 i Tc1 zależną [152]. Inne doniesienia mówią o tym, że zarówno immunizacja haptenem, jak również podanie haptenu drogą pokarmową indukuje komórki Treg CD4⁺CD25⁺ [88, 153]. W literaturze o zasięgu międzynarodowym można także znaleźć informacje o tym, że komórki Treg zaangażowane w negatywną regulację reakcji CHS wykazują ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3⁺ [96, 154, 155]. W celu sprawdzenia, czy EC toleryzacja antygenem białkowym powoduje powstanie komórek Treg wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3⁺, myszy EC traktowano DNP-BSA lub wyłącznie DPBS, a siedem dni później oznaczano markery powierzchniowe (TCR $\alpha\beta$, CD4 oraz CD25) na komórkach Treg pobranych z LN, a następnie komórki testowano na obecność czynnika transkrypcyjnego Foxp3. Przy użyciu cytometrii przepływowej zaobserwowano znamienne wzrost populacji komórek TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ po aplikacji DNP-BSA w porównaniu

do kontroli, traktowanej wyłącznie DPBS (Ryc. 6C). Na uwagę zasługuje fakt, że manewr EC immunizacji DNP-BSA prowadził do wzrostu odsetka komórek $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Treg u trzech różnych szczepów myszy: BALB/c, C57BL/6 oraz NOD [132]. Niniejsza obserwacja wskazuje, że opisywane zjawisko nie jest ograniczone do jednego szczepu myszy i ma charakter uniwersalny. Warto zaznaczyć, że EC immunizacja DNP-BSA poza zwiększeniem odsetka komórek Treg prowadzi także do wzrostu ich całkowitej liczby w węzłach chłonnych (manuskrypt wysłany do druku). Podsumowując, wykorzystanie negatywnej oraz pozytywnej selekcji, użycie defektywnych szczepów myszy oraz analiza cytofluorymetryczna wykazały, że EC aplikacja antygeny DNP-BSA powoduje powstanie komórek Treg o fenotypie $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$, które hamują odpowiedź CHS Tc1 zależną.

Z kolei posługując się modelem adoptywnego transferu reakcji CHS zauważono, że $1,35 \times 10^7$ nieseparowanych komórek pochodzących z LC (Ryc. 5) i zaledwie 2×10^6 oczyszczonych komórek $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ izolowanych od myszy EC traktowanych DNP-BSA (Ryc. 13) jest w stanie zahamować działanie 7×10^7 komórek Tef reakcji CHS. Wynik taki jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami poczynionymi w tutejszej Katedrze, że aktywność 7×10^7 komórek efektorowych jest hamowane przez 2×10^3 komórek supresyjnych w modelu CHS Th1 zależnej oraz w modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego [122, 123].

Kolejne badania wykorzystujące komórki Treg indukowane w różnych punktach czasowych wykazały, że obserwowany fenomen supresji utrzymuje się przez okres około trzech tygodni od momentu jego indukcji, a następnie stopniowo zanika (Ryc. 8). W chwili obecnej nie jest jasne, dlaczego dochodzi do zaniku aktywności komórek regulacyjnych z upływem czasu. Jedną w przyczyn takiego stanu może być stopniowe obumieranie komórek Treg spowodowane nieobecnością antygeny. Powyższy wynik potwierdza doniesienia światowe, że komórki Treg należą do populacji komórek krótko żyjących [156].

Dotychczas przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na wykazanie, że EC aplikacja DNP-BSA prowadzi do powstania komórek regulacyjnych hamujących reakcję CHS, natomiast nie odpowiadają na pytanie, czy komórki Treg interferują z powstaniem komórek Tef CHS, czy też nie blokują powstania komórek Tef, natomiast hamują reakcję w fazie efektorowej. Aby rozstrzygnąć niniejszy problem komórki Treg podawano myszom 2 godz. przed immunizacją DNFB lub 2 godz. przed wywołaniem reakcji CHS (Ryc. 9). W niniejszym doświadczeniu wykazano, że komórki Treg podane zarówno przed indukcją reakcji CHS jak również podane tuż przed wywołaniem reakcji powodują jej znamienne zahamowanie. Najświeższe wyniki badań nad EC indukowaną supresją wykazały, że podanie komórek nawet 4 godz. po wywołaniu reakcji CHS znamienne hamuje reakcję zapalną w uszach [132]. Wyniki te mogą świadczyć, iż metoda EC tolerancji może znaleźć

zastosowanie w terapii już toczącego się procesu zapalnego skóry. Obserwacja ta jest zgodna z badaniami prowadzonymi w modelu zwierzęcym EAE, gdzie wykazano, że EC podanie MBP w chwili pojawienia się pierwszych symptomów choroby prowadziło do jej zahamowania [125]. Podobne obserwacje poczyniono także w modelu CIA u myszy [157, manuskrypt wysłany do druku]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania kliniczne przeprowadzone w grupie chorych na stwardnienie rozsiane potwierdziły skuteczność opisywanej metody w terapii schorzeń autoimmunizacyjnych [130].

Wyniki badań Ring i wsp. prowadzone nad regulacją reakcji CHS wykazały, że komórki Treg hamują zarówno fazę indukcyjną oraz efektorową reakcji CHS [97]. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki nie wykluczają możliwości, że komórki Treg przenoszone w dniu immunizacji DNFB, nie blokują powstania komórek Tef lecz utrzymują się w organizmie biorców do momentu wywołania reakcji CHS, hamując jedynie fazę efektorową.

Istotnym zagadnieniem w badaniach nad regulacją odpowiedzi immunologicznej jest swoistość antygenowa obserwowanego zjawiska. W niniejszej pracy posługując się trzema modelami doświadczalnymi: aktywnym uczuleniem DNFB, modelem „transfer in” oraz „transfer out” testując cztery nie reagujące ze sobą krzyżowo antygeny DNP-BSA, OVA, MBP i OX-Ig wykazano, że EC indukowana supresja jest antygenowo nieswoista (Ryc. 7A-C). Potwierdza to doniesienia z innego ośrodka naukowego, gdzie zauważono, że w modelu reakcji CHS Tc1 zależnej powstają komórki Treg o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, które są antygenowo nieswoiste i wywierają swoje działania regulujące za pośrednictwem molekuly FasL [93]. W klasycznym zjawisku supresji, w którym biorą udział limfocyty T efektorowe oraz komórki Treg, obydwie populacje komórek są swoiste dla tego samego antygeny [95, 158, 159, 160, 161]. Efekt braku swoistości EC indukowanej supresji, może być spowodowany wydzielaniem przez komórkę Treg antygenowo nieswoistych czynników np. cytokin, które hamują odpowiedź immunologiczną mediowaną przez komórki Tef o innej swoistości. Zjawisko takie nosi nazwę efektu „przygodnego widza” (bystander suppression) [162]. W badaniach nad mechanizmami tolerancji pokarmowej zaobserwowano, że podanie antygeny *per os* generuje powstanie komórek Treg, które wydzielają cytokiny przeciwzapalne takie jak TGF- β , IL-4 oraz IL-10 [163]. Podobne obserwacje poczyniono w innych modelach doświadczalnych np. reakcji CHS Th1 zależnej oraz EAE, gdzie wydzielany TGF- β powoduje zahamowanie objawów choroby [122, 125]. W badaniach *in vivo* oraz *in vitro* wykazano, że doustne podanie antygeny prowadzi do powstania komórek Treg antygenowo nieswoistych, które w fazie efektorowej hamują odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem antygenowo nieswoistych cytokin przeciwzapalnych [156].

W celu ustalenia mechanizmu EC indukowanej supresji posłużono się czterema modelami eksperymentalnymi. Pierwszy z nich polegał na ocenie produkcji cytokin *in vitro* przez LNC wyizolowane od myszy EC immunizowanych DNP-BSA. Wcześniejsze badania nad EC indukowaną supresją odpowiedzi Th1 zależnej wykazały, że komórki Treg hamują reakcję zapalną w modelu reakcji CHS oraz EAE poprzez wydzielany TGF- β [122, 123]. W badanym obecnie modelu reakcji CHS Tc1 zależnej, wykazano, że LNC izolowane od zwierząt EC traktowanych DNP-BSA nie wydzielają cytokin przeciwzapalnych takich jak: IL-4, IL-10, IL-13, IL-17E oraz TGF- β , co sugeruje że w/w cytokiny nie są zaangażowane w proces supresji (Ryc. 10A). Wyniki te, nie wykluczają jednak możliwości, że w badanej supresji mogą być zaangażowane inne czynniki rozpuszczalne aniżeli przetestowane cytokiny. W związku z powyższym wykonano test proliferacji *in vitro* gdzie komórki efektorowe reakcji CHS były hodowane z naświetlonymi komórkami Treg lub supernatantem z hodowli LNC pochodzących od myszy EC immunizowanych DNP-BSA (Ryc. 11). Wyniki tego eksperymentu wykazały, że substancje rozpuszczalne, inne niż cytokiny, nie biorą udziału w EC indukowanej tolerancji. Wyniki te mogą sugerować, że badana supresja wymaga bezpośredniego kontaktu między komórką Tef i Treg [140, 164]. Aby sprawdzić niniejszą hipotezę, użyto systemu błon półprzepuszczalnych pozwalających na wymianę czynników rozpuszczalnych pomiędzy komórkami Treg i Tef, a tym samym niedopuszczających do bezpośredniego kontaktu komórek [165]. Niniejsze doświadczenie wykazało, że rozdzielenie komórek Tef i Treg znosi supresję reakcji CHS. Wykonany później adoptywny transfer pokazał, że separacja EC indukowanych komórek Treg od limfocytów Tef podczas inkubacji *in vitro*, znosi efekt supresji (Ryc. 12A). Dane te sugerują, że musi nastąpić bezpośredni kontakt między komórką efektorową, a regulacyjną aby doszło do zahamowania reakcji CHS. Taki rodzaj supresji może być osiągnięty za pomocą kilku mechanizmów: zabijania komórek Tef albo komórek prezentujących antygen lub poprzez upośledzenie funkcji komórek APC albo aktywowanych limfocytów T [166, 167, 168, 169].

W niniejszej pracy wykazano, że toleryzacja DNP-BSA prowadzi do powstania komórek Treg CD25⁺Foxp3⁺. Czynnikiem transkrypcyjnym Foxp3+ reguluje powstawanie i funkcję limfocytów Treg, jak również wzmacnia ekspresję molekuł CD25 i CTLA-4, z których CTLA-4 uczestniczy w jednym z mechanizmów supresji mediowanej przez komórki Treg [170, 171]. Aby sprawdzić, czy molekula CTLA-4 jest zaangażowana w EC tolerancję, postanowiono ją zablokować przeciwciałem mAb podczas inkubacji komórek CD4⁺CD25⁺ Treg, która poprzedzała inkubację komórek Treg z komórkami Tef. Wyniki przedstawione na Ryc. 13 wyraźnie pokazują, że molekula CTLA-4 jest zaangażowana w supresję. Interakcja między częścią CTLA-4 na limfocycie Treg z receptorem CD80 i CD86 na komórce DC jest ważnym szlakiem, dzięki któremu komórki Treg mogą osiągnąć swoją

funkcję hamującą. W światowej literaturze można znaleźć wiele doniesień, w których mowa o tym, że komórki Treg obniżają ekspresję molekuł kostymulujących, zarówno na mysich jak i ludzkich komórkach DC *in vitro* oraz obniżają produkcję cytokin prozapalnych [172, 173]. Podsumowując, EC aplikacja antygeny białkowego DNP-BSA indukuje powstanie komórek $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$, które znamienne hamują reakcję CHS zależną od limfocytów Tc1. Naskórną indukowaną supresję wymaga bezpośredniego kontaktu komórek z udziałem receptora CTLA-4. Można przypuszczać, że jednym z mechanizmów supresji może być zahamowanie ekspresji molekuł CD80 i CD86 na komórkach APC ograniczające możliwość komórek DC do stymulacji naiwnych limfocytów T poprzez receptor CD28. W niniejszej pracy wykazano, że transfer komórek Treg hamuje reakcję CHS zarówno w fazie indukcji jak i efektorowej.

Mechanizm wykorzystujący zdolność molekuly CTLA-4 do interferowania z działaniem komórek DC może tłumaczyć hamowanie reakcji CHS po dożylnym podaniu limfocytów Treg przed aktywnym uczuleniem DNFB, co może być wynikiem obserwowanego zahamowania produkcji $\text{TNF-}\alpha$ oraz IL-12. Natomiast zmniejszenie odpowiedzi w fazie efektorowej, po wstrzyknięciu limfocytów Treg przed wywołaniem reakcji CHS nie może być tłumaczony wyżej opisanym mechanizmem. Jest jednak możliwe, że receptor CTLA-4 na komórkach Treg wiąże się z receptorem CD80 i CD86 na aktywowanych komórkach T Foxp3^+ i w sposób nie do końca jasny obniża funkcję efektorową komórek Tef [174].

Podsumowując, przedstawiona w niniejszej pracy metoda indukcji stanu tolerancji poprzez aplikację antygeny białkowego na skórę dzięki skuteczności i prostocie, braku inwazyjności oraz braku widocznych efektów niepożądanych sugeruje potencjalną możliwość jej zastosowania w terapii schorzeń alergicznych oraz innych chorób u podstaw, których leży przewlekły proces zapalny.

1. Wyniki badań przeprowadzonych na myszach BALB/c w modelu Tc1 CD8⁺ zależnej reakcji nadwrażliwości kontaktowej wykazały, że EC aplikacja antygeny DNP-BSA przed aktywnym uczuleniem 0,5% DNFB hamuje reakcję CHS *in vivo*. Wyniki potwierdzono w modelu *in vitro*, wykazując że EC aplikacja antygeny białkowego hamuje proliferację komórek Tef. Dodatkowo EC aplikacja DNP-BSA przed uczuleniem DNFB hamuje produkcję IFN- γ , IL-12 oraz TNF- α .
2. Zjawisko EC indukowanej supresji poprzez aplikację antygeny białkowego DNP-BSA na skórę jest zależne od dawki antygeny, która mieści się w przedziale pomiędzy 100 a 3 μ g / mysz. Opisany stan tolerancji utrzymuje się przez trzy tygodnie.
3. Badania w modelu aktywnego uczulenia, „transferu in” oraz „transferu out” reakcji CHS z wykorzystaniem czterech niereagujących ze sobą krzyżowo antygenów: DNP-BSA, MBP, OVA oraz OX-Ig wykazały brak swoistości antygenowej naskórną indukowanej tolerancji.
4. Stosując model „transferu in” oraz model „transferu out” reakcji CHS wykazano, że naskórne podanie antygeny białkowego prowadzi do powstania komórek regulacyjnych w węzłach chłonnych pachowych i pachwinowych, śledzionach oraz grasicy. Minimalna ilość komórek regulacyjnych potrzebnych do zahamowania CHS wynosi $1,35 \times 10^7$. Dalsze badania wykazały, że indukowane komórki regulacyjne hamują reakcję CHS w fazie indukcyjnej i efektorowej.
5. Na drodze „negatywnej selekcji”, analizy cytofluorymetrycznej oraz przy wykorzystaniu defektywnych szczepów myszy TCR $\delta^{-/-}$ (myszy nie posiadające limfocytów T z receptorem TCR $\gamma\delta$), CD1d $^{-/-}$ (myszy nie posiadające limfocytów NKT CD1d zależnych), oraz $\beta_2m^{-/-}$ (myszy, u których brak limfocytów CD8) wykazano, że komórką odpowiedzialną za opisywany fenomen supresji jest limfocyt Treg o fenotypie TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

6. Mechanizm EC indukowanej supresji wykazano przy użyciu czterech różnych modeli doświadczalnych: ocena produkcji cytokin, test proliferacji komórek Tef nadwrażliwości kontaktowej w obecności supernatantu z hodowli komórek regulacyjnych, „transfer out” po inkubacji komórek Treg i Tef z zastosowaniem błon półprzepuszczalnych oraz blokowanie interakcji komórek Treg - Tef przez zablokowanie molekuly CTLA-4. Badania te wykazały, że w opisywanej supresji niezbędny jest bezpośredni kontakt pomiędzy komórką Treg - Tef i hamowanie odpowiedzi odbywa się przy udziale molekuly CTLA-4. Czynniki rozpuszczalne takie jak cytokiny przeciwzapalne: IL-4, IL-10, IL-17E oraz TGF- β nie są zaangażowane w opisywany mechanizm supresji.

1. ASKENASE PW, SZCZEPANIK M, ITAKURA A, KIENER C, CAMPOS RA: Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by V α 14⁺ NKT cells and B-1 B cells. *Trends Immunol* 2004; 25: 441-449.
2. KRASTEVA M, KEHREN J, DUCLUZEAU MT, SAYAG M, DUPUIS M, KANITAKIS J, NICOLAS JF: Contact dermatitis II. Clinical aspects and diagnosis. *Eur J Dermatol* 1999; 9: 144-160.
3. MOSMANN TR, COFFMAN RL: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
4. KRASTEVA M, KEHREN J, DUCLUZEAU MT, SAYAG M, CACCIAPUOTI M, AKIBA H, DESCOTES J, NICOLAS JF: Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur J Dermatol* 1999; 9: 65-77.
5. O'LEARY JG, GOODZARZI M, DRAYTON DL, VON ANDRIAN UH: T-cell and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; 7: 507-516.
6. DIEPGEN TL, WEISSHAAR E: Contact dermatitis: epidemiology and frequent sensitizers to cosmetics. *J Eur Dermatol Venereol* 2007; 21: (Suppl 2): 9-13.
7. MARTIN SF: T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 186-198.
8. HERTL M, H BOHLEN H, JUGERT F, BOECKER C, KNAUP R, MERK HF: Predominance of epidermal CD8⁺ T lymphocytes in bullous cutaneous reaction caused by β -lactam antibiotics. *J invest Dermatol* 1993; 101: 794-799.

9. TAKEYOSHI M, LIDA K, SUZUKI K, YAMAZAKI S: Skin sensitization potency of isoeugenol and its dimers evaluated by a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay and guinea pig maximization test. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 530-534.
10. NAKAMURA K, AIZAWA M: Studies on the genetic control of picryl chloride contact hypersensitivity reaction in inbred rats. *Transplant Proc* 1981; 13:1400-1403.
11. ASHERSON GL, PTAK W: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. Active sensitization and passive transfer. *Immunol* 1968; 15: 405-416.
12. HAUSER C: Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 436-440.
13. BOULOC A, CAVANI A, KATZ SI: Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 44-49.
14. MARTIN S, LAPPIN MB, KOHLER J, DELATTRE V, LEICHT C, PRECKEL T, SIMON JC, WELTZIEN HU: Peptide immunization indicates that CD8⁺ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 260-266.
15. BOUR H, PEYRON E, GAUCHERAND M, GARRIGUE JL, DESVIGNES C, KAISERLIAN D, REVILLARD JP, NICOLAS JF: Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3006-3010.
16. KEHREN J, DESVIGNES C, KRASTEVA M, DUCLUZEAU MT, ASSOSSOU O, HORAND F, HAHNE M, KAGI D, KAISERLIAN D, NICOLAS JF: Cytotoxicity is mandatory for CD8⁺ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1999; 189: 779-786.
17. DESVIGNES C, ETCHART N, KEHREN J, AKIBA I, NICOLAS JF, KAISERLIAN D: Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8⁺ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2000; 164: 2515-2522.

18. GOCINSKI BL, TIGELAAR RE: Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol* 1990; 144: 4121-4128.
19. XU H, BANERJEE A, DILULIO NA, FAIRCHILD RL: Development of effector CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1997; 158: 4721-4728.
20. SAINT-MEZARD P, BERARD F, DUBOIS B, KAISERLIAN D, NICOLAS JF: The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004; 14: 131-138.
21. WANG B, FUJISAWA H, ZHUANG L, FREED I, HOWELL BG, SHAHID S, SHIVJI GM, MAK TW, SAUDER DN: CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol* 2000; 165: 6783-6790.
22. CAMPOS RA, SZCZEPANIK M, IKATURA A, LISBONNE M, DEY N, LEITE-DE-MORAES MC, ASKENASE PW: Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptative contact sensitivity. *Immunology* 2006; 117: 536-547.
23. CAMPOS RA, SZCZEPANIK M, ITAKURA A, AKAHIRA-AZUMA M, SIDOBRE S, KRONENBERG M, ASKENASE PW: Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Vα14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med* 2003; 198: 1785-1796.
24. HERZOG WR, MILLET I, FERRERI NR, RAMABHADHAN R, SCHREURS J, ASKENASE PW: An antigen-specific DTH-initiating cell clone: Functional, phenotypical and partial molecular characterization. *J Immunol* 1990; 144: 3667-3676.
25. TSUJI RF, SZCZEPANIK M, KAWIKOVA I, PALIWAL V, CAMPOS RA, ITAKURA A, AKAHIRA-AZUMA M, BAUMGARTH N, HERZENBERG LA, ASKENASE PW: B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. *J Exp Med* 2002; 196: 1277-1290.
26. ITAKURA A, SZCZEPANIK M, CAMPOS RA, PALIWAL V, MAJEWSKA M, MATSUDA H, TAKATSU K, ASKENASE PW: An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to

migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J Immunol* 2005; 175: 7170-7178.

27. ISHII N, TAKAHASHI K, NAKAJIMA H, TANAKA S, ASKENASE PW: DNFB contact sensitivity (CS) in BALB/c and H3H/He mice: requirement for early-occur, early-acting, antigen-specific, CS-initiating cells with an unusual phenotype (Thy-1⁺, CD5⁺, CD3⁻, CD4⁻, CD8⁻, slg⁻, B220⁺, MHC class II⁻, CD23⁺, IL-2R⁻, IL-3R⁺, Mel-14⁻, Pgp-1⁺, J11d⁺, MAC-1⁺, LFA-1⁺, and FcγRII⁺). *J Invest Dermatol* 1994; 102: 321-327.
28. ASKENASE, PW, MAJEWSKA-SZCZEPANIK M, KERFOOT S, SZCZEPANIK M: Participation of iNKT cells in the early and late components of Tc1 mediated DNFB contact sensitivity: cooperative role of αβ, γδ-T cells. *Scand J Immunol* 2011; 73: 465-477.
29. BERARD F, MARTY JP, NICOLAS JF: Allergen penetration through the skin. *Eur J Dermatol* 2003; 13: 324-330.
30. LEPOITTEVIN JP, LEBLOND I: Hapten-peptide-T cell receptor interactions: molecular basis for the recognition of haptens by T lymphocytes. *Eur J Dermatol* 1997; 7: 151-154.
31. ANDERSON C, HEHR A, ROBBINS R, HASAN R, ATHAR M, MUKHTAR H, ELMETS CA: Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbon. *J Immunol* 1995; 155: 3530-3537.
32. BASKETTER D, DOOMS-GOOSSENS A, KARLBERG AT, LEPOITTEVIN JP: The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis* 1995; 32: 65-73.
33. SALOGA J, KNOP J, KOLDE G: Ultrastructural cytochemical visualization of chromium in the skin of sensitized guinea pigs. *Arch Dermatol Res* 1988; 280: 214-219.
34. KALISH RS, WOOD JA, LAPORTE A: Processing of urushiol (poison ivy) hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells in vitro. *J Clin Invest* 1994; 93: 2039-2047.
35. ROCK KL: A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 1996; 17: 131-137.

36. WELTZIEN HU, MOULON C, MARTIN S, PADOVAN E, HARTMANN U, KOHLER J: T cell immune response to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology* 1996; 107: 141-151.
37. SINIGAGLIA F: The molecular basis of metal recognition by T cells. *Invest Dermatol* 1994; 102: 398-401.
38. MOULON C, WILD D, DORMOY A, WELTZIEN HU: MHC-dependent and -independent activation of human nickel-specific CD8⁺ cytotoxic T cells from allergic donors. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 360-366.
39. CAVANI A, MEI D, GUERRA E, CORINTI S, GIANI M, PIRROTTA L, PUDDU P, GIROLOMONI G: Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell response. Evidence for the presence of effector CD8⁺ and regulatory CD4⁺ T cells. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 621-628.
40. GAMERDINGER K, MOULON C, KARP DR, VAN BERGEN J, KONING F, WILD D, PFLUGFELDER U, WELTZIEN HU: A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J Exp Med* 2003; 197: 1345-1353.
41. SAINT-MEZARD P, KRASTEVA M, CHAVAGNAC C, BOSSET S, AKIBA H, KEHREN J, KANITAKIS J, KAISERLIAN D, NICOLAS JF, BERARD F: Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 641-647.
42. KIMBER I, BASKETTER DA, GERBERICK GF, DERAMAN RJ: Allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 201-211.
43. CHOMICZEWSKA D, TRZNADEL-BUDŹKO E, KACZOROWSKA A, ROTSZTEJN H: Znaczenie komórek Langerhansa w układzie immunologicznym skóry. *Pol Merk Lek* 2009; 26: 173-177.
44. KOLESARIC A, STINGL G, ELBE-BÜRGER A: MHC class I⁺ / II⁺ dendritic cells induce hapten-specific immune response in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 580-585.

45. KRASTEVA M, KEHREN J, HORAND F, AKIBA H, CHOQUET G, DUCLUZEAU MT, TÉDONE R, GARRIGUE JL, KAISERLIAN D, NICOLAS JF: Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* 1998; 160: 1181-1190.
46. KRIPKE ML, MUNN CG, JEEVAN A, TANG JM, BUCANA C: Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 1990; 145: 2833-2838.
47. ENK AH, KATZ SI: Early events in the induction phase of contact sensitivity. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 39-41.
48. CUMBERBATCH M, DEARMAN RJ, KIMBER I: Langerhans cells require signals from both tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for migration. *Immunology* 1997; 92:388-395.
49. WANG B, FUJISAWA H, ZHUANG L, KONDO S, SHIVJI GM, KIM CS, MAK TW, SAUDER DN: Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J Immunol* 1997; 159: 6148-6155.
50. ENK AH, KATZ SI: Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1398-1402.
51. GRIFFITHS CEM, DEARMAN RJ, CUMBERBATCH M, KIMBER I: Cytokines and Langerhans cell mobilization in mouse and man. *Cytokine* 2005; 32: 67-70.
52. CUMBERBATCH M, DEARMAN RJ, GRIFFITHS CEM, KIMBER I: Epidermal Langerhans cell migration and sensitization to chemical allergens. *APMIS* 2003; 111: 797-804.
53. ANTONOPOULOS C, CUMBERBATCH M, MEE JB, DEARMAN R, WEI XQ, LIEW FY, KIMBER I, GROVES RW: IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 361-367.
54. KABAYASHI Y, MATSUMOTO M, KOTANI M, MAKINO T: Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation. *J Immunol* 1999; 163: 5989-5993.

55. STOITZNER P, PFALLER K, STÖSSEL H, ROMANI N: A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 117-125.
56. WANG B, ESCHE C, MAMELAK A, FREED I, WATANABE H, SAUDER DN: Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 381-389.
57. KALISH RS, ASKENASE PW: Molecular mechanisms of CD8⁺ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103: 192-199.
58. LAPPIN MB, KIMBER I, NORVAL M: The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 109-121.
59. CELLA M, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendrite cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 10-16.
60. ADEMA GJ, HARTGERS F, VERSTRATEN R, DE VRIES E, MARLAND G, MENON S, FOSTER J, XU Y, NOOYEN P, MCCLANAHAN T, BACON KB, FIGDOR CG: A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naïve T cells. *Nature* 1997; 387: 713-717.
61. SAINT-MEZARD P, ROSIERES A, KRASTEVA M, BERARD F, DUBOIS B, KAISERLIAN D, NICOLAS JF: Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004; 14: 284-295.
62. CAMPBELL JJ, HARALDSEN G, PAN J, ROTTMAN J, QIN S, PONATH P, ANDREW DP, WARNKE R, RUFFING N, KASSAM N, WU L, BUTCHER EC: The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999; 400: 776-780.
63. SALLUSTO F, LENIG D, FÖRSTER R, LIPP M, LANZAVECCHIA A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector function. *Nature* 1999; 401: 659-660.
64. VAN LOVEREN H, ASKENASE PW: Delayed-type hypersensitivity is mediated by a sequence of two different T cell activities. *J Immunol* 1984; 133: 2397-2401.
65. TSUJI RF, KIKUCHI M, ASKENASE PW: Possible involvement of C5/C5a in the efferent and elicitation phases of contact sensitivity. *J Immunol* 1996; 156: 4444-4450.

66. TSUJI RF, GEBA GP, WANG Y, KAWAMOTO K, MATIS LA, ASKENASE PW: Required early complement activation in contact sensitivity with generation of local C5-dependent chemotactic activity and late T cell interferon γ : a possible initiating role of B cell. *J Exp Med* 1997; 186: 1015-1026.
67. TSUJI RF, KAWIKOVA I, RAMABHADHAN R, AKAHIRA-AZUMA M, TAUB D, HUGLI TE, GERARD C, ASKENASE PW: Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J Immunol* 2000; 165: 1588-1598.
68. GEBA GP, PTAK W, ANDERSON GM, PALIWAL V, RATZLAFF RE, LEVIN J, ASKENASE PW: Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice. Dependence on platelets for expression of contact sensitivity. *J Immunol* 1996; 157: 557-565.
69. MCHALE JF, HARARI OA, MARSHALL D, HASKARD DO: Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF- α . *J Immunol* 1999; 162: 1648-1655.
70. ASKENASE PW: Yes T cells, but three different T cells ($\alpha\beta$, $\gamma\delta$ and NKT cells) and also B-1 cells mediate contact sensitivity. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 345-350.
71. PTAK W, ASKENASE PW: $\gamma\delta$ cells assist $\alpha\beta$ T cells in adoptive transfer of contact sensitivity. *J Immunol* 1992; 149: 3503-3508.
72. BIEDERMANN T, KNEILLING M, MAILHAMMER R, MAIER K, SANDER CA, KOLLIAS G, KUNKEL SL, HÜLTNER L, RÖCKEN M: Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* 2000; 192: 1441-1451.
73. TRIAL J: Adoptive transfer of early and late delayed-type hypersensitivity reactions mediated by human T cells. *Reg Immunol* 1989; 2: 14-21.
74. TRIAL J: Cooperation between early acting delayed-type hypersensitivity T-cells and cultured effector cells in tumor rejection. *Cancer Res* 1988; 48: 5922-5926.
75. ROBERT C, KUPPER TS: Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 1999; 341: 1817-1828.

76. WATANABE H, UNGER M, TUVEL B, WANG B, SAUDER DN: Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 407-412.
77. XU H, DILULIO NA, FAIRCHILD RL: T cell populations primed by hapten sensitization on contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon- γ -producing (Tc1) effector CD8⁺ T cells and interleukin (IL) 4/IL-10–producing (Th2) negative regulatory CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1996; 183: 1001-1012.
78. GRABBE S, SCHWARZ T: Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* 1998; 19: 37-44.
79. CAVANI A, ALBANESI C, TRAILD C, SEBASTIANI S, GIROLOMONI G: Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends Immunol* 2001; 22: 118-120.
80. ENGEMAN T, GORBACHEV AV, KISH DD, FAIRCHILD RL: The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 941-949.
81. VAN BEELEN AJ, TEUNISSEN MBM, KAPSENBERG ML, JONG EC: Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 374-381.
82. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H: IL-17 and IFN- γ mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *J Immunol* 2009; 183: 1463-1470.
83. TRAUTMANN A, AKDIS M, KLEEMANN D, ALTZNAUER F, SIMON HU, GRAEVE T, NOLL M, BRÖCKER EB, BLASER K, AKDIS CA: T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 25-35.
84. KIMBER I, DEARMAN RJ: Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis* 2002; 46: 1-5.
85. AKIBA H, KEHREN J, DUCLUZEAU MT, KRASTEVA M, HORAND F, KAISERLIAN D, KANEKO F, NICOLAS JF: Skin inflammatory during contact hypersensitivity is mediated by early

recruitment of CD8⁺ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* 2002; 168: 3079-3087.

86. WAGNER L, YANG OO, GARCIA-ZEPEDA EA, GE Y, KALAMS SA, WALKER BD, PASTERNAK MS, LUSTER AD: Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 1998; 391: 908-911.
87. ABE M, KONDO T, XU H, FAIRCHILD RL: Interferon- γ inducible protein (IP-10) expression is mediated by CD8⁺ T cells and is regulated by CD4⁺ T cells during the elicitation of contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 360-366.
88. KISH DD, GORBACHEV AV, FAIRCHILD RL: Regulatory function of CD4⁺CD25⁺ T cells from class II MHC-deficient mice in contact hypersensitivity responses. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 85-92.
89. DUBOIS B, CHAPAT L, GOUBIER A, KAISERLIAN D: CD4⁺CD25⁺ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol* 2003; 13: 111-116.
90. RING S, SCHÄFER SC, MAHNKE K, LEHR HA, ENK AH: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2981-2992.
91. KISH DD, GORBACHEV AV, FAIRCHILD RL: CD8⁺ cells produce IL-2, which is required for CD4⁺CD25⁺ T cell regulation of effector CD8⁺ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 725-735.
92. SAINT-MEZARD P, CHAVAGNAC C, VOCANSON M, KEHREN J, ROZIÈRES A, BOSSET S, IONESCU M, DUBOIS B, KAISERLIAN D, NOCOLAS JF, BERARD F: Deficient contact hypersensitivity reaction in CD4^{-/-} mice is because of impaired hapten-specific CD8⁺ T cell functions. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 562-569.
93. GORBACHEV AV, FAIRCHILD RL: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells utilize FasL as mechanism to restrict dendritic cell priming functions in cutaneous immune responses. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2006-2015.

94. GORBACHEV AV, FAIRCHILD RL: CD4⁺ T cells regulate CD8⁺ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* 2004; 172: 2286-2295.
95. GORBACHEV AV, FAIRCHILD RL: Regulatory role of CD4⁺ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol Res* 2001; 24: 69-77.
96. VOCANSON M, ROZIERES A, HENNINO A, POYET G, GAILLARD V, RENAUDINEAU S, ACHACHI A, BENETIERE J, KAISERLIAN D, DUBOIS B, NICOLAS JF: Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sparing features of Th17 / Th1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 280-288.
97. RING S, KARAKHANOVA S, JOHNSON T, ENK AH, MAHNKE K: Gap junction between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 237-246.
98. GORBACHEV AV, HEEGER PS, FAIRCHILD RL: CD4⁺ and CD8⁺ T cell priming for contact hypersensitivity occurs independently of CD40-CD154 interactions. *J Immunol* 2001; 166: 3232-3232.
99. RING S, OLIVER SJ, CRONSTEIN BN, ENK AH, MAHNKE K: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reaction through a CD39, adenosine- dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1287-1296.
100. FOUSSAT A, COTTREZ F, BRUN V, FOURNIER N, BREITTMAYER JP, GROUX H: A comparative study between T regulatory type 1 and CD4⁺CD25⁺ T cells in the control of inflammation. *J Immunol* 2003; 171: 5018-5026.
101. CAVANI A, NASORRI F, PREZZI C, SEBASTIANI S, ALBANESI C, GIROLOMONI G: Human CD4⁺ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and Nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 2000; 14: 295-302.
102. FERGUSON TA, DUBE P, GRIFFITH TS: Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *J Exp Med* 1994; 179: 1597-1604.
103. RIEMANN H, SCHWARZ A, GRABBE S, ARAGANE Y, LUGER TA, WYSOCKA M, KUBIN M, TRINCHIERI G, SCHWARZ T: Neutralization of IL-12 in vivo prevents induction of contact

- hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance. *J Immunol* 1996; 156: 1799-1803.
104. GORBACHEV AV, DILULIO NA, FAIRCHILD RL: IL-12 augments CD8⁺ T cell development for contact hypersensitivity responses and circumvents anti-CD154 antibody-mediated inhibition. *J Immunol* 2001; 167: 156-162.
105. FARIA AMC, WEINER HL: Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005; 206: 232-259.
106. KRAUSE I., BLANK M., SHOENFELD Y.: Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. *Crit. Rev. Immunol.* 2000; 20: 1-16.
107. VAN HOOOSTRATEN IM, BODEN D, VON BLOMBERG ME, KRAAL G, SCHEPER RJ: Persistent immune tolerance to nickel and chromium by oral administration prior to cutaneous sensitization. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 608-616.
108. VAN HOOOSTRATEN IM, BOOS C, BODEN D, VON BLOMBERG ME, SCHEPER RJ: Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 26-31.
109. WEINER HL, FRIEDMAN A, MILLER A, KHOURY SJ, AL-SABBAGH A, SANTOS L, SAYEGH M, NUSSENBLATT RB, TRENTAM DE, HAFER DA: Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 809-837.
110. WEINER HL: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- β -secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001; 3: 947-954.
111. XIAO BG, LINK H: Mucosal tolerance: a two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 119-128.
112. WEINER HL: Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J Clin Invest* 2000; 106: 935-937.
113. MIN SY, PARK KS, CHO ML, KANG JW, CHO YG, HWANG SY, PARK MJ, YOON CH, MIN JK, LEE SH, PARK SH, KIM HY: Antigen-induced, tolerogenic CD11c⁺, Cd11b⁺ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II

- collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 887-898.
114. STAINES NA, DERRY CJ, MARINOVA-MUTAFCHIEVA L, ALI N, DAVIES DH, MURPHY JJ: Constraints on the efficacy of mucosal tolerance in treatment of human and animal arthritis diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 250-259.
115. TOUSSIROT EA: Oral tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 45-52.
116. WANG LF, WU JT, SUN CC: Local but not systemic administration of IFN-gamma during the sensitization phase of protein antigen immunization suppress Th2 development in a murine model of atopic dermatitis. *Cytokine* 2002; 19: 147-152.
117. HERRICK CA, MACLEOD H, GLUSAC E, TIGELAAR R E, BOTTOMLY K.: Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 765-775.
118. SZCZEPANIK M: Regulation of contact hypersensitivity responses by different populations of T suppressor cells. Skin induced tolerance and its clinical implications. *Recent Res Devel Immunol* 2002; 4: 641-667.
119. SZCZEPANIK M: Skin-induced tolerance and its reversal by Toll-like receptor ligands. *Arch Immunol Ther Exp* 2007; 55: 161-172.
120. PTAK W, SZCZEPANIK M, BRYNIARSKI K, TUTAJ M, PTAK M: Epicutaneous application of protein antigens incorporated into cosmetic cream induces antigen-nonspecific unresponsiveness in mice and affects the cell-mediated immune responses. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 8-14.
121. SZCZEPANIK M: Skin induces tolerance and it's clinical implications. *Mod Asp Immunobiol* 2002; 2: 265-268.
122. SZCZEPANIK M, BRYNIARSKI K, TUTAJ M, PTAK M, SKRZECZYNSKA J, ASKENASE PW, PTAK W: Epicutaneous immunization induces $\alpha\beta$ T-cell receptor CD4 CD8 double-positive non-specific suppressor T cells that inhibit contact sensitivity via transforming growth factor-beta. *Immunology* 2005, 115: 42-54.

123. TUTAJ M, SZCZEPANIK M: Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein (MBP) induces TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺ CD8⁺ double positive suppressor cells that protect from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* 2007; 28: 208-215.
124. MAJEWSKA M, ZAJĄC K, SREBRO Z, SURA P, KSIĄŻEK L, ZEMELKA M, SZCZEPANIK M: Epicutaneous immunization with myelin basic protein protects from the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 74-79.
125. SZCZEPANIK M, TUTAJ M, BRYNIARSKI K, DITTEL BN: Epicutaneously induced TGF- β -dependent tolerance inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005; 164: 105-114.
126. MAJEWSKA M, ZAJĄC K, SREBRO Z, SURA P, KSIĄŻEK L, ZEMELKA M, SZCZEPANIK M: Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein (MBP) protects from the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2008; 33 (Suppl.1): 2.98.
127. LOBO F, ZAJĄC K, MAJEWSKA M, ZEMELKA M, SZCZEPANIK M: Epicutaneous immunization with protein antigen protects from collagen induced arthritis. *J Immunol* 2006; 176: 115.13.
128. ZAJĄC K, STOCHMAL E, SZCZEPANIK M: Epicutaneous immunization with collagen protects from the development of collagen induced arthritis (CIA). *Eur J Immunol* 2008; 33 (Suppl.1): 2.82.
129. MAJEWSKA M, ZAJĄC K, M, BRYNIARSKI K, PTAK M, BASTA-KAIM A, KSIĄŻEK L, PTAK W, LASOŃ W, SZCZEPANIK M: Effects of ovalbumin on survival of H-Y incompatible skin graft in C57BL/6 mice. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 439-442.
130. JURYŃCZYK M, WALCZAK A, JUREWICZ A, JESIONEK-KUPNICKA D, SZCZEPANIK M, SELMAJ K: Immune regulation of multiple sclerosis by transdermally applied myelin peptides. *Ann Neurol* 2010; 68: 593-601.
131. ZEMELKA M, SZCZEPANIK M: Epicutaneous (ec) immunization with DNP-coupled protein antigen suppresses Tc1 CD8⁺ mediated contact sensitivity in mice. *Eur J Immunol* 2008; 33 (Suppl.1): 6.96.

132. MAJEWSKA-SZCZEPANIK M, ZEMELKA-WIĄCEK M, PTAK W, WEN L, SZCZEPANIK M.: Epicutaneous immunization with DNP-BSA induces CD4(+) CD25(+) Treg cells that inhibit Tc1-mediated CS. *Immunol Cell Biol* 2012, (w druku).
133. MC KINNEY M, PARKINSON A: A simple non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J Immunol Methods* 1987; 96: 271-278.
134. LITTLE JR, EISEN HN: Preparation and characterization of antibodies specific for the 2, 4, 6-trinitrophenyl group. *Biochemistry* 1966; 5: 3385-3395.
135. FORSGREN A, SJÖQUIST J: "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol* 1966; 97: 822-827.
136. ASKENASE PW, ASHERSON GL: Contact sensitivity to oxazolone in the mouse. VIII. Demonstration of several classes of antibody in the sera of contact sensitized and unimmunized mice by a simplified antiglobulin assay. *Immunology* 1972; 23: 289-298.
137. CAMPOS R, SZCZEPANIK M, AKAHIRA-AZUMA M, KRONENBERG M, ASKENASE PW: Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med* 2003; 198: 1785-1796.
138. SZCZEPANIK M, ANDERSON LR, USHIO H, PTAK W, OWEN MJ, HAYDAY AC, ASKENASE PW: $\gamma\delta$ T cells from tolerized $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells *in vivo*, and their interferon- γ production *in vitro*. *J Exp Med* 1996; 184: 2129-2139.
139. SAULNIER M, HUANG S, AGUET M, RYFFEL B: Role of interferon- γ in contact hypersensitivity assessed in interferon- γ receptor-deficient mice. *Toxicology* 1995; 102: 301-312.
140. SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M: Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008; 133: 775-787.
141. SOJKA DK, HUANG YH, FOWELL DJ: Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008; 124: 13-22.

142. JANEWAY CA JR, MEDZHITOV R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 197-216.
143. ROMAGNANI S: Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* 2006, 61: 3-14.
144. LLOYD CM, MURDOCH JR: Tolerizing allergic responses in the lung. *Mucosal Immunol* 2010; 3: 334-344.
145. KAPLAN DH: *In vivo* function of Langerhans and dermal dendritic cells. *Trends Immunol* 2010; 31: 446-451.
146. WANG LF, LIN JY, HSIEH KH, LIN RH: Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice. *J Immunol* 1996; 156: 4079-4082.
147. WANG LF, WU JT, SUN CC: Local but not systemic administration of IFN- γ during the sensitization phase of protein antigen immunization suppress Th2 development in a murine model of atopic dermatitis. *Cytokine* 2002; 19:147-152.
148. CONSTANT SL, BROGDON JL, PIGGOTT DA, HERRICK CA, VISINTIN I, RUDDLE NH, BOTTOMLY K: Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. *J Clin Invest* 2002; 110: 1441-1448.
149. MITCHISON NA, SCHUHBAUER D, MÜLLER B: Natural and induced regulation of Th1/Th2 balance. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 199-210.
150. MAJEWSKA M, ZAJĄC K, KUBERA M, BRYNIARSKI K, PTAK M, BASTA-KAIM A, KSIĄŻEK L, PTAK W, LASOŃ W, SZCZEPANIK M: Effects of ovalbumin on the survival of an H-Y incompatible skin graft in C57BL/6 mice. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 439-442.
151. PTAK W, MAJEWSKA M, BRYNIARSKI K, PTAK M, LOBO FM, ZAJĄC K, ASKENASE PW, SZCZEPANIK M: Epicutaneous immunization with protein antigen in the presence of TLR4 ligand induces TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ T contrasuppressor cells that reverse skin-induced suppression of Th1-mediated contact sensitivity. *J Immunol* 2009; 182: 837-850.

152. CAVANI A: Immune regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis and contact sensitization. *Chem Immunol Allergy* 2008; 94: 93-100.
153. DUBOIS B, JOUBERT G, GOMEZ DE AGÜERO M, GOUANVIC M, GOUBIER A, KAISERLIAN D: Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* 2009; 137: 1019-1028.
154. HACINI-RACHINEL F, GHEIT H, LE LUDUEC JB, DIF F, NANCEY S, KAISERLIAN D: Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells. *PLoS One* 2009; 4: e4903.
155. ATARASHI K, MORI T, YOSHIKI R, KABASHIMA K, KUMA H, TOKURA Y: Skin application of ketoprofen systemically suppresses contact hypersensitivity by inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Dermatol Sci* 2009; 53: 216-221.
156. MABARRACK NHE, TURNER NL, MAYRHOFFER G: Recent thymic origin, differentiation, and turnover of regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1287-1297.
157. MARCIŃSKA K, SZCZEPANIK M: Mechanisms involved in the regulation of immune response in animal model of rheumatoid arthritis in mice (CIA). *Postepy Hig Med Dosw* 2010; 4: 372-385.
158. SAKAGUCHI S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
159. SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N: Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 2005; 24: 211-26
160. TRAN GT, HODGKINSON SJ, CARTER NM, VERMA ND, PLAIN KM, BOYD R, ROBINSON CM, NOMURA M, KILLINGSWORTH M, HALL BM: Interleukin-5 (IL-5) promotes induction of antigen specific CD4⁺CD25⁺T regulatory cells that suppress autoimmunity. *Blood* 2012; 6: (w druku).
161. FAN H, WANG J, ZHOU X, LIU Z, ZHENG SG: Induction of antigen-specific immune tolerance by TGF-beta-induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Int J Clin Exp Med* 2009; 25: 212-20.

162. FARIA AMC, WEINER HL: Oral Tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. Clin Dev Immunol 2006; 13: 143-157.
163. WEINER HL: Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β - secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev 2001; 182: 207-214.
164. SHEVACH EM: Mechanisms of FoxP3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity 2009; 30: 636-645.
165. SZCZEPANIK M, NOWAK B, ASKENASE PW, PTAK W: Cross-talk between $\gamma\delta$ T lymphocytes and immune cells in humoral response. Immunology 1998; 95: 612-617.
166. GONDEK DC, LU LF, QUEZADA SA, SAKAGUCHI S, NOELLE RJ: Contact-mediated suppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. J Immunol 2005; 174: 1783-1786.
167. ZHAO DM, THORNTON AM, DiPAOLO RJ, SHEVACH EM: Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. Blood 2006; 107: 3925-3932.
168. ONISHI Y, FEHERVARI Z, YAMAGUCHI T, SAKAGUCHI S: Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells *in vitro* and actively inhibit their maturation. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 10113-10118.
169. CORTHAY A: How do regulatory T cells work? Scand J Immunol 2009; 70: 326-336.
170. ONO M, YAGUCHI H, OHKURA N, KITABAYASHI I, NAGAMURA Y, NOMURA T, MIYACHI Y, TSUKADA T, SAKAGUCHI S: Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. Nature 2007; 446: 685-689.
171. RUDD CE: CTLA-4 co-receptor impacts on the function of Treg and CD8⁺ T-cell subsets. Eur J Immunol 2009; 39: 687-690.
172. MISRA N, BAYRY J, LACROIX-DESMAZES S, KAZATCHKINE MD, KAVERI SV: Human CD4⁺ CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. J Immunol 2004; 172: 4676-4680.

173. SERRA P, AMRANI A, YAMANOUCHI J, HAN B, THIESSEN S, UTSUGI T, VERDAGUER J, SANTAMARIA P: CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Immunity* 2003; 19: 877-889.
174. PAUST S, CANTOR H: Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005; 204: 195-207.

Powszechnie wiadomo, że podanie antygeny na błony śluzowe poza wywołaniem lokalnej odpowiedzi immunologicznej na śluzówkach prowadzi jednocześnie do powstania stanu tolerancji na obwodzie. Zjawisko to leży u podstaw tolerancji śluzówkowej (np. tolerancja pokarmowa). Z kolei skórę przez szereg lat traktowano jako miejsce, w którym stosunkowo łatwo można indukować silną odpowiedź komórkową, której klasycznym przykładem jest reakcja nadwrażliwości kontaktowej (CHS) podczas gdy skórze jako miejscu, w którym można indukować tolerancję nie poświęcano większej uwagi.

Badania prowadzone od wielu lat w Instytucie Pielęgniarstwa i Położnictwa, w Katedrze Biologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum wykazały, że naskórna (EC) aplikacja antygeny białkowego wywołuje stan tolerancji, prowadzący do zahamowania odpowiedzi komórkowej na hapten TNP w zwierzęcym modelu CHS $CD4^+$ Th1 zależnej. Supresja reakcji CHS wywołana EC podaniem antygeny białkowego nie wykazuje swoistości antygenowej i jest wynikiem działania limfocytów $TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^+$ wywierających swoje działanie regulacyjne za pośrednictwem uwalnianego TGF- β . Dalsze badania wykazały, że EC aplikacja antygeny białkowego prowadzi do złagodzenia objawów chorobowych towarzyszących schorzeniom autoimmunizacyjnym u myszy, wśród których znajdują się eksperymentalne zapalenie rdzenia kręgowego i mózgu (EAE) oraz kolagenowe zapalenie stawów (CIA). Co więcej indukowana supresja przez skórę okazała się efektywna w hamowaniu reakcji odrzucania przeszczepu allogenicznego u myszy.

W chwili obecnej dobrze są poznane mechanizmy efektorowe oraz regulacyjne leżące u podłoża reakcji CHS mediowanej przez limfocyty Th1 $CD4^+$, co może się przyczynić do opracowania nowych metod terapii kontaktowego zapalenia skóry.

W prezentowanej pracy posługując się modelem reakcji CHS zależnej od limfocytów Tc1 $CD8^+$ opisano mechanizm supresji wywołanej podaniem antygeny białkowego na skórę. W badaniach przeprowadzonych na myszach szczepu BALB/c posługując się modelem reakcji CHS wykazano, że EC aplikacja antygeny DNP-BSA przed aktywnym uczuleniem 0,5% DNFB hamuje reakcję CHS *in vivo*. Obserwowane zmniejszenie obrzęku uszu korelowało z obniżoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych, spadkiem przyrostu „wagi uszu” oraz spadkiem stężenia IFN- γ oraz

aktywności MPO w homogenatach bioptatów usznych. Wyniki te potwierdzono w teście *in vitro*, wykazując że EC aplikacja antygeny białkowego hamuje proliferację komórek T efektorowych (Tef) CHS. Dodatkowo EC aplikacja DNP-BSA przed uczuleniem DNFB hamuje produkcję IFN- γ , IL-12 oraz TNF- α .

Zjawisko EC indukowanej supresji poprzez aplikację antygeny białkowego DNP-BSA na skórę jest zależne od dawki, która mieści się w przedziale pomiędzy 100 a 3 μ g antygeny / mysz. Opisany stan tolerancji utrzymuje się przez trzy tygodnie.

Z kolei w modelu aktywnego uczulenia, „transferu in” oraz adoptywnego „transferu out” reakcji CHS z wykorzystaniem czterech niereagujących ze sobą krzyżowo antygenów: DNP-BSA, MBP, OVA oraz OX-Ig wykazano brak swoistości antygenowej naskórnio indukowanej tolerancji.

W kolejnym etapie badań stosując model „transferu in” oraz model „transferu out” reakcji CHS wykazano, że EC podanie antygeny białkowego prowadzi do powstania komórek T regulacyjnych (Treg) w węzłach chłonnych pachowych i pachwinowych, śledzionie oraz grasicy. Minimalna ilość komórek Treg potrzebna do zahamowania 7×10^7 komórek Tef wynosi $1,35 \times 10^7$ wszystkich komórek LNC i zaledwie 2×10^6 oczyszczonych komórek Treg. Dalsze badania wykazały, że podanie komórek regulacyjnych zarówno przed indukcją reakcji CHS jak również przed jej wywołaniem prowadzi do zahamowania odpowiedzi kontaktowej.

Na drodze „negatywnej selekcji”, analizy cytofluorymetrycznej oraz przy wykorzystaniu defektywnych szczepów myszy TCR $\delta^{-/-}$ (myszy nie posiadające limfocytów T z receptorem TCR $\gamma\delta$), CD1d $^{-/-}$ (myszy nie posiadające limfocytów NKT CD1d zależnych), oraz $\beta_2m^{-/-}$ (myszy, u których brak limfocytów CD8) wykazano, że komórką odpowiedzialną za opisywany fenomen supresji jest limfocyt Treg o fenotypie TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ Foxp3 $^+$.

Mechanizm EC indukowanej supresji wykazano przy użyciu czterech różnych modeli doświadczalnych: ocena produkcji cytokin, test proliferacji komórek Tef nadwrażliwości kontaktowej w obecności supernatantu z hodowli komórek regulacyjnych, „transfer out” po inkubacji komórek Treg i Tef z zastosowaniem błon półprzepuszczalnych oraz blokowanie interakcji komórek Treg - Tef przez zablokowanie molekuly CTLA-4. Badania te wykazały, że w opisywanej supresji niezbędny jest bezpośredni kontakt pomiędzy komórką Treg - Tef i hamowanie odpowiedzi odbywa się przy udziale molekuly CTLA-4. Czynniki rozpuszczalne takie jak cytokiny przeciwzapalne: IL-4, IL-10, IL-17E oraz TGF- β nie są zaangażowane w opisywany mechanizm supresji.

Przedstawiona w niniejszej pracy metoda wywołania stanu tolerancji poprzez EC aplikację antygeny DNP-BSA dzięki skuteczności i prostocie użycia oraz braku inwazyjności stwarza nowe możliwości hamowania odpowiedzi immunologicznej, co może

być przydatne w opracowaniu nowych metod leczenia reakcji nadwrażliwości kontaktowej z udziałem limfocytów Tc1 CD8⁺.

It is well known that immunization via the digestive tract or nasal mucosa may induce a strong local response and simultaneously leads to a state of profound immunosuppression in the periphery. For many years, the skin was considered to be an organ where immune responses such as contact hypersensitivity (CHS) were easily induced. However, skin as a site for the induction of tolerance has received very little attention.

Experiments performed at the Department of Medical Biology at Jagiellonian University School of Medicine showed that, indeed, epicutaneous (EC) application of protein antigens resulted in the induction of T regulatory cells (Treg) which were able to inhibit murine Th1 CD4⁺-mediated contact sensitivity to a TNP-coupled protein. EC immunization with a protein antigen prior to active contact sensitization was shown to be mediated by TCRαβ⁺ CD4⁺ CD8⁺, in an antigen non-specific manner. The mechanism of skin-induced suppression relies on the action of the anti-inflammatory cytokine TGF-β. Recently it was shown that EC application of a protein antigen reduced inflammatory responses and decreased disease incidence in two different experimental models: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and collagen induced arthritis (CIA). Further work employing allogeneic skin grafts showed that EC immunization with a protein antigen delayed graft rejection in mice.

The effector and regulating mechanisms of CHS mediated by Th1 CD4⁺ lymphocytes are well known, which may contribute to the development of new methods of contact skin inflammation treatment.

In this dissertation, it was investigated whether the EC immunization with a DNP-coupled protein antigen can suppress Tc1 CD8⁺-mediated contact hypersensitivity in BALB/c mice. We have found that EC immunization with DNP-conjugated bovine serum albumin (DNP-BSA) prior to sensitization with 0.5% dinitrofluorobenzene (DNFB) did indeed suppress Tc1 CD8⁺-mediated CHS *in vivo* when compared with positive control. The observed reduction of ear swelling was correlating with the depression of vascular permeability, ear weight, IFN-γ concentration and MPO activity in ear homogenates. These results were confirmed by an *in vitro* model, where EC deposition of a protein antigen suppressed proliferation of Tef cells. It was also shown that DNP-BSA application prior to sensitization with DNFB significantly inhibited production of pro-inflammatory IFN-γ, IL-12 and TNF-α.

In a further experiment it was determined that the optimal dose of EC-applied DNP-BSA which could suppress CHS ranges between 100 and 3 µg of antigen / mouse and that the state of unresponsiveness declined with time and lasted for around three weeks.

Experiments in a model of an active immunization, “transfer in” and adoptive cell transfer of CHS employing four non-cross-reacting antigens - DNP-BSA, MBP, OVA or OX-Ig - showed that suppression induced via EC immunization with an antigen is antigen non-specific.

Further experiments, in a model of “transfer in” and adoptive cell transfer of CHS, demonstrated that suppressive activity could be transferred by cells isolated from the axillary and inguinal lymph node cells, spleen and thymus of EC-immunized mice. The lowest number of EC-induced Treg cells which could effectively inhibit Tc1 CD8⁺-dependent CHS was 1.35×10^7 unseparated LNC and only 2×10^6 of purified Treg cells. Finally we showed that transfer of EC-induced Treg cells either at the time of immunization or challenge significantly suppressed CHS response.

The phenotype of the Treg lymphocyte was found using the negative selection experiment with monoclonal antibodies and rabbit complement, FACS sorting and TCRδ^{-/-} (mice lacking T lymphocytes with the TCRγδ receptor), CD1d^{-/-} (mice lacking NKT lymphocytes DC1d dependent) and β₂m^{-/-} (mice lacking CD8 lymphocytes) mice. These data suggested that EC immunization with DNP-BSA induced a population of Treg cells with a TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ phenotype.

In the final section of this dissertation, the mechanism of suppression induced via EC application of DNP-BSA was discussed. Four different approaches were used: the expression of cytokine production by lymph nodes, the influence of DNP-BSA-induced Treg cells on the *in vitro* proliferation of Tef CHS cells, adoptive transfer of CHS after the incubation of Treg and Tef cells with application of the trans-well chambers, and inhibition of interaction between Treg and Tef cells through blockage of the CTLA-4 molecule. These experiments showed that the mechanism of suppression requires direct contact between Treg and Tef cells and that the participation of the CTLA-4 molecule is necessary. Moreover, immunization with DNP-BSA does not affect production of anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10, IL-17E or TGF-β.

In summary, this dissertation describes a novel method of evoking immune tolerance via EC immunization of DNP-BSA. Because of its effectiveness, ease of induction and non-invasive protein antigen application, this immunization route may be effective for a new method of Tc1 CD8⁺-dependent contact hypersensitivity reaction therapy.