

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Marian Szczepanik

**Funkcja immunoregulacyjna
limfocytów $\gamma\delta^+$ w reakcji
nadwrażliwości kontaktowej u myszy.**

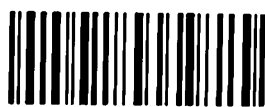
praca doktorska

Promotór: Prof.dr hab.med. Włodzimierz Ptak

**praca została wykonana
w Katedrze Immunologii
Collegium Medicum UJ**

Kraków 1994

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095544

Podziękowanie

Składam serdeczne podziękowanie Panu Profesorowi Włodzimierzowi Ptakowi za cenne wskazówki i rady w czasie wykonywania tej pracy.

Dziękuję także Profesorowi P.W. Askenase z Yale University za umożliwienie przeprowadzenia wielu doświadczeń w Jego zakładzie.

SPIS TREŚCI

Słowniczek skrótów.....str.	4
Wstęp.....str.	6
Cel pracy.....str.	15
Materiały i metody.....str.	16
Wyniki.....str.	24
Dyskusja.....str.	30
Podsumowanie.....str.	39
Wnioski.....str.	41
Ryciny.....str.	42
Piśmiennictwo.....str.	47

SŁOWNICZEK SKRÓTÓW

1. B220 antygen z grupy CD45 typowy dla limfocytów B
2. CD3, CD4, CD5, CD8 antygeny powierzchniowe limfocytów T (CD, cluster of differentiation) określają ich przynależność do odpowiedniej subpopulacji
3. DMEM podłoże (Dulbeco minimal essential medium)
4. FCS płodowa surowica cielęca (Fetal calf serum)
5. GM-CSF czynnik stymulujący kolonie granulocytów i monocytów (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
6. HSP białko szoku termicznego (Heat shock protein)
7. IFN- γ interferon gamma
8. Ib obszar obejmujący geny Qa, T1 oraz CD1 kodujące molekuły zaangażowane w prezentacji antygeny limfocytom $\gamma\delta$
9. I1-2, 4, 5, 10 interleukiny 2, 4, 5, 10.
10. MHC I, II antygeny zgodności tkankowej klasy I i II (Major histocompatibility complex)
11. MRBC erytrocyty mysie (mouse red blood cells)
12. NTP nadwrażliwość typu późnego
13. OX oksazolon (hapten)

14. PBS	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (Phosphate buffered saline)
15. PCL	chlorek pikrylu (hapten)
16. PPD	tuberkulina (purified protein derivative)
17. SD	odchylenie standardowe (Standard Deviation)
18. TCF	czynnik antygenowo-swoisty uwalniany przez komórkę wczesną NTP (T cell factor).
19. TCR	receptor antygenowy limfocytów T (T cell receptor)
20. TCR α +/-	osobnik heterozygotyczny
21. TCR α -/-	osobnik homozygotyczny pozbawiony limfocytów T $\alpha\beta$ 22.
22. TH1	limfocyt pomocniczy typu pierwszego (T helper 1)
23. TH2	limfocyt pomocniczy typu drugiego (T helper 2)
24. Thy1	antygen powierzchniowy limfocytów T
25. TNBSA	kwas trójnitrobenzenosulfonowy
26. TNP	trójnitrofenyl
27. TNF- β	czynnik nekrotyczny nowotworów β
28. Tcs	limfocyty kontrasupresyjne T
29. Ts aff	aferentne limfocyty supresyjne T
30. Ts eff	eferentne limfocyty supresyjne T

WSTĘP

Nadwrażliwość typu późnego (NTP) jest jedną z form odpowiedzi komórkowej na antygeny drobnoustrojów. Zarówno u myszy jak i ludzi odpowiedź tego typu związana jest z udziałem limfocytów $T_{H}CD4^{+}$ (1,2). W typowej reakcji NTP centralną komórką odpowiedzi immunologicznej są limfocyty pomocnicze typu 1 (TH1) przyciągające do miejsca toczącej się reakcji immunologicznej leukocyty krwi obwodowej (monocyty i neutrofile) (3,4). Istnieją także doniesienia mówiące iż w pewnych sytuacjach limfocyty TH2 zamiast limfocytów TH1 mogą odgrywać kluczową rolę w reakcji NTP (5). W reakcji NTP z udziałem komórek typu TH2 rolę komórek efektorowych pełnią bazofile i eozynofile. Przypuszcza się, że wyżej wspomniany fenomen odgrywa istotną funkcję obronną w przewodzie pokarmowym co stwierdzono w zakażeniach nicieniami (*Trichinella spiralis*) jak również w obrębie błon śluzowych leżących poza przewodem pokarmowym. Limfocyty o fenotypie $CD8^{+}$ natomiast pełnią kluczową rolę w innym typie reakcji NTP tzw. reakcji Jones-Mote (6). Reakcja NTP pełni istotną rolę w alergii, reakcjach z autoagresji, mechanizmach obronnych w zakażeniach bakteriami (*Mycobacterium*), pasożytami oraz w odpowiedzi skierowanej przeciw nowotworom (7,8). O istocie wyżej wspomnianych mechanizmów obronnych (NTP) może świadczyć fakt iż pacjenci chorzy na AIDS pozbawieni komórek $CD4^{+}$ stają się ofiarą szeregu zakażeń oportunistycznych oraz nowotworów.

Jedną z form reakcji NTP jest nadwrażliwość kontaktowa rozwijająca się po miejscowej ekspozycji (skóra, błony śluzowe) na substancje niskocząsteczkowe (hapteny). Związki te mają zdolność do tworzenia połączeń kowalencyjnych z białkami ustroju kreując w ten sposób neoantygeny (9). Reakcja nadwrażliwości kontaktowej budzi coraz większe zainteresowanie ze względu na jej znaczenie kliniczne. Wiadomo bowiem, że szereg związków chemicznych używanych w przemyśle fotograficznym (hydrochinon) lub kosmetycznym (p-fenyldiamina),

leków (penicylina, chinina) jak również jony metali ciężkich (chrom, nikiel, żelazo) mogą prowadzić do uczuleń. Przy powtórnyim kontakcie z homologicznym związkim dochodzi do reakcji immunologicznej (reakcja alergiczna typu IV Gella-Coombsa) manifestującej się najczęściej w skórze.

Reakcja nadwrażliwości kontaktowej u myszy i jej przebieg.

U zwierząt doświadczalnych w tym także u myszy reakcję nadwrażliwości kontaktowej wywołuje się poprzez naskórną aplikację roztworu haptenu w rozpuszczalniku organicznym (chlorek pikrylu - trójnitrochlorobenzen, dwunitrochlorobenzen, dwunitrofluorobenzen oraz oksazolon) na uprzednio ogoloną skórę (10).

Reakcja nadwrażliwości kontaktowej składa się z dwóch występujących kolejno po sobie antygenowo swoistych etapów. W reakcji tej zaangażowane są dwa różne typy limfocytów, komórki tuczne, komórki endotelialne, komórki prezentujące antygen, jak również leukocyty krwi obwodowej (11).

W czasie pierwszego kontaktu z antygenem krążące limfocyty dziewicze o fenotypie $CD4^+$ $TCR\alpha\beta$ rozpoznają antygen na komórkach prezentujących łącznie z antygenami zgodności tkankowej klasy II (MHC II) w lokalnych węzłach chłonnych oraz na obwodzie. W wyniku opisanej powyżej kooperacji komórek dochodzi do powstania limfocytów $CD4^+$ $TCR\alpha\beta$ (TH1) efektorowych fazy późnej oraz komórek pamięci immunologicznej, które następnie opuszczają węzły chłonne i rozpoczynają typową dla siebie wędrówkę między układem chłonnym a krwią. Pojawienie się wspomnianej komórki fazy późnej nadwrażliwości kontaktowej obserwuje się w trzy do cztery dni od immunizacji (12,13). Również podczas pierwszej stymulacji antygenowej ma miejsce indukcja innego typu limfocyta tzw. komórki fazy wczesnej o unikalnym fenotypie $Thy1^+$ $CD4^-$ $CD8^-$ $B220^+$ (13,14). Komórki te wykazują swoistość antygenową przy jednoczesnym braku restrykcji w zakresie układu MHC. Powstałe już w pierwszym dniu od immunizacji komórki fazy wczesnej nadwrażliwości kontaktowej pełnią swą funkcję w miejscu ich

powstania (śledziona, węzły chłonne) za pośrednictwem czynnika antygenowo-swoistego, którego obecność można wykazać na obwodzie (15,16). Przy kolejnym kontakcie z homologicznym antygenem dochodzi do wyzwolenia reakcji nadwrażliwości kontaktowej o jej charakterystycznym dwustopniowym przebiegu. W pierwszym etapie komórki fazy wczesnej wydzielają czynnik antygenowo-swoisty (TCF), którego obecność można wykazać we krwi obwodowej a następnie w przestrzeni pozanaczyniowej i na powierzchni komórek tucznych (17). Przyłączenie antygeny do mastocyta za pośrednictwem czynnika antygenowo-swoistego prowadzi do uwalniania przez te komórki serotoniny (5-HT). Uwolniona serotonina ma dwa punkty działania jeden na komórkach śródbłonna naczyń drugi natomiast na limfocytach TH1. Zwiększona pod wpływem serotoniny przepuszczalność naczyń pozwala na przedostanie się uczulonych limfocytów TH1 do miejsca zdeponowanego antygeny. Limfocyty TH1 po rozpoznaniu antygeny w kontekście MHC klasy II na komórkach prezentujących antygen uwalniają szereg cytokin. Do najważniejszych limfokiny zaangażowanych w reakcji nadwrażliwości kontaktowej należą między innymi interferon gamma (IFN- γ) oraz limfotoksyna (TNF- β) (18). Uwolnione limfokiny prowadzą do mobilizacji leukocytów krwi obwodowej (monocyty i granulocyty) do miejsca toczącego się procesu.

Regulacja reakcji nadwrażliwości kontaktowej.

Reakcja nadwrażliwości kontaktowej znajduje się pod ścisłą kontrolą obwodów regulacyjnych. Negatywne sygnały są mediowane przez antygenowo-swoiste limfocyty T supresyjne (Ts) jak również przez komórki pozbawione swoistości antygenowej (tzw. supresja naturalna). Z drugiej strony nadwrażliwość kontaktowa jest regulowana pozytywnie przez limfocyty T kontrasupresyjne (Tcs) wykazujące swoistość antygenową jak również limfocyty nie wykazujące swoistości antygenowej (tzw. kontrasupresja naturalna).

Pośród mechanizmów regulujących negatywnie reakcję nadwrażliwości kontaktowej można wyróżnić conajmniej kilka układów

supresyjnych. Nadwrażliwość kontaktowa jest negatywnie regulowana w fazie wczesnej jak również w fazie późnej odpowiedzi. Regulacja fazy wczesnej nadwrażliwości kontaktowej odbywa się między innymi za pośrednictwem limfocytów $CD8^+$ indukowanych przez czynnik antygenowo swoisty (TCF). Wytworzony czynnik supresyjny przez limfocyty $CD8^+$ hamuje z kolei produkcję TCF przez komórkę fazy wczesnej (19,20). Opisany mechanizm regulacji określany jest jako izotypowo-podobny (isotype-like regulation). Reakcja nadwrażliwości kontaktowej jest także pod negatywną kontrolą limfocytów supresyjnych aferentnych (Ts_{aff}) o fenotypie $CD8^+$, indukowanych między innymi przez kompleksy antygen-przeciwciało (21). Mechanizm działania limfocytów Ts_{aff} polega na hamowaniu indukcji limfocytów T efektorowych nadwrażliwości kontaktowej.

Kolejny układ supresyjny związany jest z limfocytami $CD8^+$ Ts_{eff} eferentnymi (Ts_{eff}), które można indukować przez podanie drogą dożylną wysokiej dawki antygeny (np. TNBSA, rozpuszczalna w wodzie pochodna TNP) (22,23) jak również znakowanych haptenu izologicznych komórek (24,25,26). Uwalniany czynnik supresyjny przez wyżej wspomniane Ts_{eff} prowadzi do blokowania funkcji komórek efektorowych ($TH1$) produkujących limfokiny ($IFN-\gamma$, $TNF-\beta$, $IL-2$). Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się regulacji odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem cytokin. W licznych laboratoriach wykazano działanie supresyjne limfocytów $TH2$ produkujących $IL-4$ i $IL-10$ na limfocyty efektorowe typu $TH1$ nadwrażliwości kontaktowej (27,28,29). Jednak ze względu na ograniczony związek wspomnianych mechanizmów z tematem pracy nie będą one bliżej charakteryzowane.

Mechanizmem regulującym reakcję nadwrażliwości kontaktowej a wywierającym działanie przeciwne do supresji jest zjawisko kontrasupresji (30,31,32). Istnieją co najmniej dwa poziomy kontrasupresji: jeden określany jako kontrasupresja naturalna drugi natomiast zwany kontrasupresją antygenowo-swoistą(33).

Komórką odpowiedzialną za mechanizm kontrasupresji naturalnej jest limfocyt o fenotypie $CD4^+$ $CD5^+$, który nie wykazuje swoistości

antygenowej. Limfocyt kontrasupresyjny "naturalny" jest niezbędny dla powodzenia adoptywnego transferu do normalnych, immunokompetentnych, syngenicznych biorców. Kontrasupresja naturalna chroni komórki efektorowe nadwrażliwości kontaktowej przed naturalnie występującymi mechanizmami supresji. Transfer nadwrażliwości kontaktowej przy użyciu komórek efektorowych pozbawionych komórek kontrasupresyjnych "naturalnych" możliwy jest jedynie po wyeliminowaniu naturalnie istniejących komórek supresyjnych u biorcy przez ich traktowanie cyklofosfamidem (12,33).

Drugi poziom kontrasupresji związany jest z limfocytom T CD4 CD5, który wykazuje swoistość antygenową. Komórka ta może być indukowana przez dożylnie podane znakowane haptenu komórki dendrytyczne śledziony (34), komórek Langerhansa (35) jak również kompleksów immunologicznych (36,37). Działanie wspomnianego antygenowo-swoistego limfocyta kontrasupresyjnego skoncentrowane jest na limfocycie efektorowym nadwrażliwości kontaktowej (36,38), którą to komórkę chroni przed negatywnym działaniem antygenowo-swoistych limfocytów Ts.

Funkcję regulacyjną w odpowiedzi immunologicznej przypisuje się także stosunkowo niedawno odkrytej populacji limfocytów T $\gamma\delta$. Istnieją doniesienia mówiące o ich pozytywnym (39,40,41,42,) jak również negatywnym (43,44) wpływie na odpowiedź immunologiczną. Z pierwszych w piśmiennictwie światowym badań przeprowadzonych w naszym zakładzie wynika iż limfocyty T $\gamma\delta$ wywierają pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej (45,46). Wykazano między innymi, że limfocyty $\gamma\delta$ o fenotypie $CD3^+CD4^-CD8^+$ są niezbędne dla powodzenia transferu nadwrażliwości kontaktowej do immunokompetentnych, syngenicznych biorców. Wspomniane komórki T $\gamma\delta^+$ nie wykazują swoistości antygenowej jak również nie posiadają restrykcji w zakresie MHC. Limfocytom $CD8^+TCR\gamma\delta^+$ przypisuje się ochronę komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej TH1 przed negatywnymi sygnałami limfocytów T supresyjnych.

Limfocyty T $\gamma\delta$.

Obecnie wiadomo o istnieniu dwóch populacji limfocytów T wykorzystujących odmienne receptory rozpoznające antygen (TCR = T cell receptor). Pierwszą grupę stanowią komórki T posiadające receptor typu $\alpha\beta$ (TCR₂). Drugą natomiast populacją są poznane stosunkowo niedawno limfocyty z receptorem $\gamma\delta$ (TCR₁). Limfocyty $\gamma\delta$ stanowią heterogenną grupę komórek zróżnicowanych między innymi na podstawie ich aktywności biologicznej. Do chwili obecnej nie jest jasne czy pojedyncza komórka $\gamma\delta$ może posiadać kilka różnych funkcji czy też istnieje pewna specjalizacja jak to ma miejsce w przypadku limfocytów T $\alpha\beta$ (CD4 - limfocyty pomocnicze, CD8 - limfocyty cytotoksyczne lub supresyjne). Limfocyty $\gamma\delta$ mają zdolność do produkcji i uwalniania cytokin takich jak Il-2, Il-4, Il-5, IFN- γ oraz GM-CSF (47, 48,49). Komórki z receptorem $\gamma\delta$ wykazują także aktywność cytotoksyczną, która ulega nasileniu w obecności Il-2 (47,50). Obecność limfocytów $\gamma\delta$ stwierdzono u wszystkich dotychczas badanych kręgowców obejmujących między innymi człowieka (51), myszy (52), kury (53), szczura (54) i przżuwaczy (55). Co prawda istnieją znaczne różnice gatunkowe w ilości komórek $\gamma\delta$ w różnych narządach i we krwi obwodowej np. mysz 2%, owca 30% (47). Większość limfocytów $\gamma\delta$ dojrzewa w grasicy. Rearanżacja genów γ oraz δ wyprzedza wspomniany proces dla genów α oraz β (56). Podczas gdy dla łańcuchów α i β istnieje duża ilość segmentów V i J w genomie to dla łańcuchów γ oraz δ liczba ta jest bardzo ograniczona (57,58). Niemniej jednak istnienie innych mechanizmów wpływających na zmienność genetyczną sprawia, że repertuar receptora TCR₁ jest porównywalny a nawet wyższy niż ma to miejsce w przypadku TCR₂. Badania przeprowadzone na defektywnym szczepie myszy pozbawionych grasicy (nude mice) wykazały istnienie limfocytów $\gamma\delta$ w ustroju wspomnianych zwierząt (59) co sugeruje istnienie dodatkowego miejsca dojrzewania limfocytów $\gamma\delta$ zlokalizowanego poza grasicą. Przypuszcza się, że alternatywnym miejscem dojrzewania komórek $\gamma\delta$ jest jelito (52,60,61,62,63). W początkowym okresie życia osobniczego limfocyty $\gamma\delta$ kolonizują różne

tkanki organizmu (np. skórę, śledzionę). Przeprowadzone dotychczas badania świadczą o znacznej predylekcji poszczególnych subpopulacji komórek $\gamma\delta$ (wykorzystujących różne segmenty zmienne łańcucha γ receptora antygenowego - $V\gamma$) do różnych tkanek. Przypuszcza się, że za tą uporządkowaną wędrówkę limfocytów $\gamma\delta$ do określonych narządów odpowiedzialne są swoiste lecz bliżej nie poznane receptory (56,63). I tak w skórze występują komórki $V\gamma 5$ a w jelicie $V\gamma 7$. Region zmienny $V\gamma 6$ jest wykorzystywany przez limfocyty $\gamma\delta$ znajdujące się w macicy, pochwie i języku, natomiast obecność segmentu $V\gamma 1$ można stwierdzić na limfocytach $\gamma\delta$ znajdujących się w śledzionie i wątrobie. Obszar zmienny $V\gamma 4$ jest wykorzystywany przez komórki $\gamma\delta$ krwi obwodowej, śledziony, węzłów chłonnych, płuc oraz gruczołu mlecznego. (43,51). Limfocyty $\gamma\delta$ rozpoznają antygen przy pomocy receptora antygenowego TCR_1 połączonego z molekułą CD3. Jak dotąd sam sposób rozpoznawania antygeny oraz czynniki wymagane do aktywacji wspomnianych komórek są bardzo niejasne. Nadal nierozstrzygniętym problemem pozostaje charakter antygeny, który jest rozpoznawany przez komórki $\gamma\delta$. Wszelkie próby zmierzające do generacji komórek $\gamma\delta$ swoistych dla większości antygenów wirusowych oraz białkowych zakończyły się fiaskiem. Wyjątek stanowią antygeny związane z *Mycobacterium* (*M.tuberculosis*, *M.leprae*, *M.bovis*) oraz sama tuberkulina (PPD). Początkowo przypuszczano iż limfocyty $\gamma\delta$ swoiste dla *Mycobacterium* rozpoznają białka szoku termicznego (HSP 65). Jednak dalsze badania wykazały, że tylko niewielki procent PPD reaktywnych limfocytów $\gamma\delta$ rozpoznaje HSP 65 (64,65). Pfeffer i wsp. wykazali iż niemal cała aktywność stymulująca a pochodząca z ekstraktu *Mycobacterium* skoncentrowana jest w niskocząsteczkowej frakcji (2-10 KD) odpornej na działanie enzymów proteolitycznych i łączącej się z pewnymi lektynami (66,67). Niemniej jednak wielu autorów pozostaje przy opinii iż białka szoku termicznego stanowią ważny antygen dla limfocytów $\gamma\delta$ w reakcjach *in vivo*. Według Janeway'a istnieje też możliwość iż komórki $\gamma\delta$ rozpoznają nie sam antygen lecz wzrost ekspresji błonowego białka MHC klasy I lub Ib , który może być wynikiem działania na komórkę

szeregu czynników np. HSP, peptydów zawartych w Mycobacterium (68). Dość enigmatyczny pozostaje także sposób prezentacji antygenów limfocytom z receptorem $\gamma\delta$. Limfocyty $\alpha\beta$ rozpoznają antygen konwencjonalny w sposób asocjatywny tj. łącznie z antygenami zgodności tkankowej MHC klasy I lub II (69). W przypadku komórek $\gamma\delta$ sytuacja przedstawia się nieco inaczej. Jak dotąd znany jest tylko jeden antygen (toksyna tężcowa), który jest rozpoznawany w kontekście MHC klasy I (57,70,71). Niemniej jednak istnieje szereg doniesień mówiących o istnieniu odrębnej grupy molekuł zaangażowanych w prezentacji antygenów. Jest to tzw. klasa antygenów Ib obejmująca u myszy molekuły Qa, TL oraz CD1 (57,70,72). Według Haasa (1993) limfocyty $\gamma\delta$ rozpoznają peptydy oraz inne substancje niskocząsteczkowe takie jak np. węglowodany w połączeniu z antygenami Ib.

Stosunkowo słabo poznana jest funkcja limfocytów $\gamma\delta$ w ustroju. Komórkom tym przypisuje się między innymi funkcję ochronną w zakażeniach na granicy środowisko zewnętrzne-ustrój (skóra, błony śluzowe). Dowodem na to, że komórki $\gamma\delta$ są zaangażowane w różnego rodzaju infekcjach może świadczyć fakt iż obserwowano zwiększoną ilość wspomnianych limfocytów w tkankach objętych procesem chorobowym. I tak obserwowano wzrost ilości komórek $\gamma\delta$ we krwi obwodowej pacjentów zakażonych Plasmodium falciparum (70). Innym przykładem gdzie obserwowano wzrost liczby limfocytów $\gamma\delta$ stanowią zakażenia wirusowe takie jak AIDS, mononukleozę zakaźną oraz w modelu doświadczalnym zakażenia wirusem grypy (70,72,73,74). Także wielu badaczy obserwowało nacieki komórkowy w skórze obfitujący w limfocyty $\gamma\delta$ w przebiegu zakażenia M.leprae oraz Leishmanią (70,75). Przypuszcza się także, że komórki $\gamma\delta$ pełnią funkcję nadzoru immunologicznego nad dynamicznie proliferującymi komórkami nabłonka eliminując w razie potrzeby komórki transformowane nowotworowo. Te czysto teoretyczne przypuszczenia na temat udziału komórek $\gamma\delta$ w procesach nowotworowych znalazły potwierdzenie w trakcie wielu badań klinicznych. I tak między innymi w wątrobie pacjentów z nowotworami

żołądka, jelit oraz płuc obserwowano nacieki komórkowe gdzie limfocyty $\gamma\delta$ stanowiły 30% wszystkich komórek jądrzastych (50). Przypuszcza się, że może to być związane z mechanizmami obronnymi przeciwko nowotworom (76). Również w ciągu ostatnich lat dostarczono wiele dowodów na to, że limfocyty $\gamma\delta$ mogą pełnić funkcję immunoregulacyjną w odpowiedzi immunologicznej (39,42). Także coraz większe zainteresowanie klinicystów budzi udział limfocytów $\gamma\delta$ w chorobach z autoagresji. Obserwowano między innymi obecność komórek $\gamma\delta$ w płynie maziowym stawów pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (77,78,79,80).

Przytoczone powyżej fakty świadczą w sposób jednoznaczny o roli komórek $\gamma\delta$ w organizmie żywym. Obecnie wiadomo coraz więcej o funkcji i mechanizmach poprzez jakie działają komórki z receptorem $\gamma\delta$. Niemniej jednak nadal pozostaje wiele nie rozstrzygniętych kwestii a ich rozwiązanie może mieć ogromne znaczenie nie tylko czysto teoretyczne lecz również kliniczne.

CEL PRACY

Przebieg reakcji immunologicznej zależy między innymi od sposobu immunizacji, dawki antygeny a także charakteru samego antygeny. O efekcie końcowym całego procesu decydują zarówno komórki efektorowe zaangażowane w odpowiedzi jak również komórki regulujące odpowiedź immunologiczną. Do chwili obecnej poznano wiele obwodów regulujących zarówno o aktywności pozytywnej jak i negatywnej na procesy immunologiczne.

Celem mojej pracy jest dokładniejsza charakterystyka funkcji immunoregulacyjnej limfocytów $\gamma\delta^+$ w systemie nadwrażliwości kontaktowej. W pracy starano się bliżej ocenić ich rolę zarówno w fenomenie supresji jak również kontrasupresji.

MATERIAŁ I METODY:

Zwierzęta doświadczalne:

Do doświadczeń używano myszy szczepu CBA/J oraz 129/J obu płci w wieku 5-7 tygodni. Wyżej wspomniane zwierzęta otrzymano z hodowli Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. W pewnej grupie eksperymentów badania prowadzono na szczepie myszy 129/J $TCR\alpha^{-/-}$ oraz $TCR\alpha^{+/-}$ hodowanych i dostarczonych przez Dr A. Hayday, Department of Biology, Yale University, New Haven, CT. Myszy hodowano w klatkach z filtrem i odżywiano autoklawowanym pokarmem i wodą. Klatki były zmieniane w komorze jałowej przez personel ubrany w sterylną odzież, rękawiczki oraz maski. W niektórych doświadczeniach używano myszy szczepu CBA/J pochodzące z hodowli Zakładu Immunologii.

Odczynniki:

Chlorek pikrylu {PCL, [trinitrophenyl (TNP) chloride] (Chemtronix, Swannanoa, NC,)} poddano przed użyciem rekrytalizacji w mieszaninie metanol/ H_2O ; Oksazolone (OX) [4-ethoxymethylene-2 phenyloxazolone], (Gallard-Schlesinger Chemical Mfg. Corp., Carle Place, NY); kwas trójnitrobenzenosulfonowy (TNBSA) (Eastman Chemicals, Rochester, NY); białko A (protein A) sprzęgnięte z Sepharose 4 Fast Flow, (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden); ziarenka magnetyczne opłaszczane przeciwciałami przeciw Ig chomika [Anti-hamster Ig antibody-coated magnetic beads (Bio Mag, 1 μ m iron magnetic particles, Advanced Magnetism, Cambridge, MA)]; surowica płodowa cielęca (Gemini Bioproducts, INC., Calabasas, CA.).

Przeciwciała monoklonalne i dopełniacz:

Użyto następujących przeciwciał monoklonalnych oczyszczonych na białku A: anty- $TCR\gamma\delta$ (klon UC7-135 D5,), które otrzymano od Dr J. Bluestone, University of Chicago; anty- $TCR\gamma\delta$ (klon GL3 i GL4), anty

V δ 4 (klon GL2) uzyskane od Dr Leo Lefrancois, University of Connecticut oraz anty-V γ 3 (klon F536) otrzymany od Dr James Allison, University of California at Berkeley. W niektórych doświadczeniach używano chemiczną frakcję IgG oczyszczoną chromatograficznie (Organon Technika Corp. West Chester. PA). Dodatkowo w pracy na cytofluorymetrze przepływowym posługiwano się następującymi przeciwciałami monoklonalnymi znakowanymi fluoresceiną: anty- $\alpha\beta$ oraz anty- $\gamma\delta$ (Pharmlngen, San Diego, CA). W pewnych doświadczeniach użyto liofilizowany dopełniacz króliczy (Pel-Freeze Brown Deer WI).

Oczyszczanie IgG na białku A:

W celu uzyskania czystej frakcji IgG z supernatantu produkowanego przez hybrydomę używano białko A [Protein A] sprzężone z Sepharose 4 Fast Flow, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) (81). W skrócie, białko A przepłukiwano przed użyciem buforem startowym (20 mMol bufor fosforanowy o pH=7.2). Następnie przez kolumnę przepuszczano supernatant zawierający mAb. W dalszym etapie kolumnę płukano wielokrotnie buforem fosforanowym. Do wymywania frakcji IgG z kolumny używano 0.1 M CH₃COONa (pH=4). W czasie elucji zbierano frakcje o objętości 1 ml, które były natychmiast doprowadzane do pH=7.0 przy pomocy buforu Tris-HCl o pH=9.0. Zawartość IgG w poszczególnych frakcjach oceniano spektrofotometrycznie (przy λ =280 nm) a następnie uzyskane przeciwciała dializowano względem PBS o pH=7.2. Cała preparatyka była przeprowadzana w temperaturze +4 C.

Przygotowanie komórek węzłów chłonnych i śledziony:

Węzły chłonne pachowe i pachwinowe oraz śledziony zbierano do zimnego (+4 C) DMEM. Następnie przygotowywano zawiesinę pojedynczych komórek poprzez delikatne roztarcie wspomnianych uprzednio narządów pomiędzy matowymi podstawowymi szkiełkami mikroskopowymi. Uzyskaną zawiesinę komórkową sączono przez gazę nylonową Nybolt 110 i płukano 3x zimnym PBS wzbogaconym 2% surowicy płodowej cielęcej (FCS).

Eliminacja limfocytów T $\gamma\delta$ przy użyciu przeciwciał monoklonalnych i dopełniacza:

Mieszaninę komórek węzłów chłonnych i śledzionowych zawieszano w nierozcieńczonym supernatancie produkowanym przez klon komórkowy UC7-135 D5 uzyskując koncentrację końcową równą 1×10^7 komórek/ml. Zawiesinę komórkową inkubowano na lodzie przez 45 min. Później komórki wirowano i płukano dwukrotnie w PBS zawierającym 2% FCS. i następnie inkubowano z liofilizowanym dopełniaczem króliczym o rozcieńczeniu 1:75 w łaźni wodnej o temp 37 C przez 45 min. Komórki z grupy kontrolnej inkubowano jedynie z rozcieńczonym komplemtem. Po zakończonej inkubacji komórki płukano 2-3x PBS+2% FCS przed dalszym użyciem.

Aktywne uczulenie i bierny transfer:

Myszy uczulano poprzez malowanie ogolonej skóry brzucha i klatki piersiowej oraz tylnych łap 0.15 ml 5% roztworem PCL lub 3% OX w mieszaninie acetonu i alkoholu (w stosunku 1:3) (82). Cztery dni po uczuleniu mierzono grubość małżowiny usznej przy pomocy śruby mikrometrycznej (Mitutoyo Mfg. Co. LTD. Tokyo, Japan) tuż przed aplikacją jednej kropli (igła 27 gauge, jedna kropla = 0.02 ml) 0.8% roztworu PCL lub OX w oleju z oliwek na obie strony każdego z uszu. Następnie dokonywano oceny grubości uszu po upływie 2, 24 oraz 48 godz. We wszystkich eksperymentach testowano w podobny sposób dodatkową grupę nie immunizowanych zwierząt (kontrola negatywna). Przyrost grubości uszu uzyskany w kontroli negatywnej odejmowano od wartości uzyskanych we wszystkich grupach badanych. Przeciętnie przyrost grubości uszu w grupie kontrolnej wynosił po 2 godz. 0.5-1 jednostki, po 24 godz. 1.5-2 jednostki a po 48 godz. 2-3 jednostki. W biernym transferze 7×10^7 komórek węzłów chłonnych i śledzionowych pochodzących od zwierząt uczulonych cztery dni wcześniej PCL lub OX wstrzykiwano dożylnie biorcom, których natychmiast testowano roztworem 0.8% PCL lub OX w oliwie. Reakcję nadwrażliwości

kontaktowej oceniano po upływie 24 i 48 godz. po odjęciu wyników grupy kontrolnej (zwierzęta tylko testowane na uszy, które nie otrzymały komórek).

Podawanie przeciwciał monoklonalnych:

W pewnych eksperymentach aktywnie uczulone myszy szczepiono dożylnie różnymi dawkami przeciwciał monoklonalnych anty $\gamma\delta$ lub frakcją IgG surowicy chomika (jako kontrola) przed lub po immunizacji. W biernym transferze dawcy lub biorcy komórek uczulonych byli traktowani dożylnie różnymi dawkami przeciwciał monoklonalnych anty $\gamma\delta$ lub chomiczą frakcją IgG jeden dzień przed transferem.

Indukcja komórek supresyjnych (Ts):

TNP-swoiste limfocyty Ts: Myszy szczepiono dożylnie 2x po 0.3 ml (w dniu "0" oraz "+3") zbuforowanym (pH = 7.2) 1% roztworem TNBSA. Śledziona stanowiąca źródło komórek supresyjnych pobierano w siódmym dniu od pierwszej iniekcji TNBSA (83).

OX-swoiste limfocyty Ts:

Myszy szczepiono dożylnie 0.3 ml 10% OX-MRBC w PBS. Erytrocyty mysie znakowano zgodnie z metodyką uprzednio przez nas opisaną (84). 1 ml upakowanych MRBC zawieszano w 10 ml PBS a następnie mieszano z 20 ml roztworu oksazolonu zawierającym 20 mg haptenu uprzednio rozpuszczonym w 1 ml alkoholu absolutnego. Całość inkubowano przez 30 min w temp. pokojowej chroniąc przed światłem. Krwinki przed użyciem płukano 4x PBS. Po siedmiu dniach od chwili podania OX-MRBC pobierano śledziona, które stanowiły źródło antygenowo-swoistych limfocytów Ts.

Przełamanie tolerancji:

W omawianym teście część dawców komórek limfoidalnych była traktowana dożylnie dawką 100 μg mAb anty- $\gamma\delta$ UC7 lub w grupie kontrolnej PBS jeden dzień przed transferem komórkowym. 7×10^7 uczulonych komórek od

zwierząt traktowanych lub nie mAb anti- $\gamma\delta$ inkubowano z 5×10^7 Ts w łaźni wodnej o temp. 37 C przez 30 min. Jako kontrolę pozytywną używano uczulone komórki inkubowane bez komórek regulacyjnych. Po zakończonej inkubacji komórki płukano 2-3x PBS + 2% FCS i wstrzykiwano dożylnie normalnym biorcom (traktowanym PBS) lub biorcom uprzednio traktowanym dawką 100 ug/mysz mAb anti- $\gamma\delta$ UC7 jeden dzień przed transferem. Natychmiast po transferze zwierzęta testowano 0.8% roztworem PCL w oliwie i przyrost grubości uszu testowano po 24 i 48 godz.

Uzyskanie i testowanie aktywności kontrasupresyjnej supernatantu produkowanego przez aktywowane limfocyty $\gamma\delta$:

Myszy uczulone na skórę roztworem 5% PCL szczepiono dożylnie 100 ug mAb UC7 lub PBS jeden dzień przed zbiorem narządów limfatycznych. W czwartym dniu od immunizacji przygotowywano zawiesinę komórek śledzionowych oraz węzłów chłonnych a następnie płukano kilka razy PBS + 2% FCS. Tak przygotowane komórki zawieszano w RPMI 1640 zawierającym 2% FCS (koncentracja komórek = 10^7 /ml) i hodowano w inkubatorze w temp. 37 C i atmosferze 5% CO₂ przez 48 godz. Po zakończonej hodowli, zawiesinę komórkową wirowano, zbierano supernatanty a następnie przechowywano zamrożone w temp. -20 C do chwili użycia.

W teście na aktywność kontrasupresyjną 7×10^7 uczulonych PCL komórek węzłów chłonnych i śledziony inkubowano w 5 ml testowanego supernatantu w łaźni wodnej w temperaturze 37 C przez 30 min. Po zakończonej inkubacji płukano a następnie inkubowano z 5×10^7 Ts w łaźni wodnej w temp. 37 C przez 30 min. Jako kontrolę pozytywną używano uczulonych komórek inkubowanych jedynie w RPMI 1640 + 2% FCS. W grupie kontrolnej supresji 7×10^7 uczulonych komórek inkubowano z 5×10^7 Ts bez uprzedniej inkubacji z supernatantem przez okres 30 min w temp 37 C. Po zakończonej inkubacji komórki płukano parokrotnie PBS z 2% FCS a następnie wstrzykiwano dożylnie syngenicznym biorcom. Niezwłocznie po iniekcji biorców testowano 0.8% roztworem PCL w

oliwie na uszy. Przyrost grubości małżowiny usznej testowano po upływie 24 godz.

Ocena ekspresji TCR $\gamma\delta$ przy użyciu cytometrycznego przepływowego:

Krew, śledziony oraz węzły chłonne pobierano od myszy uprzednio uczulonych PCL na skórę, które były traktowane dożylnie lub też nie 100 μ g mAb anty- $\gamma\delta$ lub PBS jeden dzień przed testem. W powyższym doświadczeniu dołączono grupę zwierząt nie immunizowanych (kontrola negatywna), z których część otrzymała injekcję dożylną 100 μ g mAb anty $\gamma\delta$ pozostałym natomiast myszom podawano PBS w dniu poprzedzającym kolekcjonowanie narządów limfatycznych oraz krwi. Krew pobierano pipetą pasteurowską w ilości ok 100 μ l przez nakłucie splotu naczyniowego pozagałkowego po uprzednim wstrzyknięciu dożylnym 10 U heparyny w 0.2 ml PBS. Uzyskane próbki mieszano z równą objętością 2% roztworu dextranu T-500 w PBS zawierającym 3 mg EDTA/ml. Całość inkubowano w probówkach Eppendorfa w łaźni wodnej o temp 37 C przez 30 min. Po zakończonej inkubacji większość erytrocytów sedimentowała co pozwalało na zebranie czystej populacji leukocytów z górnych warstw zawiesiny (85). Leukocyty krwi oraz komórki węzłów chłonnych i śledziony płukano 3x zimnym PBS (+4 C) a następnie inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi anty- $\gamma\delta$ UC7 znakowanymi fluoresceiną. Powyższa inkubacja przebiegała na lodzie przez 30 min w ciemności. W kontroli negatywnej wyżej wspomniane próbki inkubowano w buforze (0.1% roztwór NaN_3 w PBS zawierającym 2% FCS) bez mAb w takich samych warunkach jak próbki badane. Po zakończonej inkubacji próbki badane płukano 3x buforem a następnie zawieszano w 200 μ l 1% roztworu paraformaldehydu w PBS. Analizę badanego materiału przeprowadzano przy życiu aparatu Becton Dickinson FACSTAR PLUS oceniając 10^4 komórek w każdej próbce.

Rozdział komórek limfoidalnych przy użyciu ziarenek magnetycznych (magnetic beads):

1.5×10^8 komórek śledzionowych pochodzących od myszy szczepu 129/J

TCR α +/+ lub 129/J TCR α -/- uprzednio toleryzowanych poprzez podanie dożylnie 1% TNBSA inkubowano w 20 ml supernatantu anty- $\gamma\delta$ UC7 przez 60 min na lodzie. Po zakończonej inkubacji komórki płukano 3x PBS + 2% FCS. Odpłukane splenocyty zawieszano w 40 ml PBS z 2% FCS, który zawierał 5-10 ziarenek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami anty Ig chomika/na 1 komórkę z receptorem TCR $\gamma\delta$ przyjmując w nadmiarze, że komórki $\gamma\delta$ stanowią 10% całkowitej populacji). W rzeczywistości komórki limfoidalne zawierają 2% limfocytów TCR $\gamma\delta$ pozytywnych a zatem w trakcie doświadczenia używano pięciokrotnie więcej ziarenek magnetycznych w celu uzyskania lepszego rozdziału. Inkubację splenocytów z ziarenkami magnetycznymi przeprowadzano w naczyniach do hodowli o objętości 50 ml (tissue culture flask, 3108-Falcon, Franklin Lakes, NJ.) przez 30 min w łaźni lodowej. Następnie do większej ścianki naczynia hodowlanego przykładano magnes o wymiarach 8x12 cm (Bio Mag Separator for Flasks, Advanced Magnetics, Cambridge, MA). Po upływie 10 min komórki nie przylegające ($\gamma\delta^-$) zbierano przy pomocy pipety. Następnie po odłączeniu magnesu zbierano komórki przylegające do ścianki naczynia ($\gamma\delta^+$). Uzyskane frakcje komórkowe płukano PBS z 2% FCS. W dalszym etapie doświadczenia używano nierozdzielane komórki śledzionowe, populację komórek $\gamma\delta^+$ oraz $\gamma\delta^-$ ($86 \cdot 10^7$ komórek węzłów chłonnych i śledzionowych pochodzących od myszy szczepu 129/J TCR α +/+ uczulonych PCL inkubowano z $5 \cdot 10^7$ nie rozdzielonych komórek regulacyjnych lub równoważną liczbą komórek rozdzielonych ($\gamma\delta^+$ lub $\gamma\delta^-$) pochodzących od myszy toleryzowanych (dwukrotne podanie drogą dożylną TNBSA) szczepu 129/J TCR α +/+ lub 129/J TCR α -/- przez 30 min. w temp. 37 C. Po zakończonej inkubacji komórki płukano i podawano dootrzewnowo syngenicznym biorcom. Reakcja nadwrażliwości kontaktowej była wywoływana w kolejnym dniu po transferze. Po upływie 24 godz od wywołania reakcji nadwrażliwości kontaktowej dokonywano pomiaru obrzęku małżowiny usznej.

Testowanie swoistości antygenowej limfocytów supresyjnych $\gamma\delta$:
 7×10^7 komórek limfoidalnych od myszy uczulonych PCL lub OX z 5×10^7 komórek supresyjnych o tej samej lub różnej swoistości antygenowej co komórki uczulone przez 30 min. w temp. 37 C. Komórki regulacyjne pochodziły od myszy kontrolnych 129/J TCR α +/+ lub 129 TCR α -/-. Po zakończonej inkubacji komórki podawano dożylnie syngenicznym biorcom, których natychmiast testowano odpowiednim haptenem (0.8% PCL lub OX) w oliwie. Oceny reakcji nadwrażliwości kontaktowej dokonywano po upływie 24 godz.

Opracowanie wyników:

Wyniki poszczególnych grup przedstawiono jako średnią (\pm SD). Istotność statystyczną pomiędzy grupami eksperymentalnymi badano testem t-Studenta. Wyniki te są podawane w opisie rycin. W rycinach podano także wyniki w formie " % reakcji kontrolnej ". Wskaźnik ten obliczano wg. wzoru (średnia grupy badanej - średnia grupy kontrolnej negatywnej) : (średnia grupy kontrolnej pozytywnej - średnia grupy kontrolnej negatywnej) x 100%.

WYNIKI

Immunostymulujący efekt *in vivo* mAb anty-TCR $\gamma\delta$ (UC7):

W celu sprawdzenia wpływu mAb anty-TCR $\gamma\delta$ (UC7) na reakcję nadwrażliwości kontaktowej u aktywnie uczulonych zwierząt, myszom podawano dożylnie wysoką dawkę mAb (400 μ g/mysz) jeden dzień przed, trzy dni po immunizacji lub w obu czasach. Test przeprowadzono w cztery dni po uczuleniu. Rycina 1 pokazuje brak istotnego wpływu na wielkość wczesnej komponenty nadwrażliwości kontaktowej (mierzonej po 2 godz. od restymulacji haptenem). Natomiast dokonując oceny komponenty późnej nadwrażliwości kontaktowej stwierdzono pozytywny wpływ mAb gdy pomiaru dokonywano po 48 godz. przy jednoczesnym braku efektu po 24 godz. Immunostymulujący efekt przeciwciał monoklonalnych UC7 obserwowano zarówno gdy zwierzęta traktowano mAb jeden dzień przed immunizacją grupa B, trzy dni po uczuleniu grupa C jak również traktowanych w obu czasach (jeden dzień przed i trzy dni po immunizacji) grupa D.

Pozytywny wpływ mAb anty-TCR $\gamma\delta$ (UC7) jest zależny od dawki:

W niniejszym eksperymencie postanowiono określić optymalną dawkę mAb anty-TCR $\gamma\delta$ (UC7) posiadających pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Uczulone myszy 5% roztworem PCL szczepiono dożylnie malejącymi dawkami mAb UC7: 100; 25; 6.25 lub 1.56 μ g/mysz trzy dni po immunizacji. Wyniki przedstawione na Rycinie 2 sugerują, że optymalna dawka mAb, która posiada pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej przy pomiarze po 24 i 48 godz. od restymulacji znajduje się w przedziale pomiędzy 25 a 100 μ g/mysz (grupy B i C).

Dwa inne mAb anty $\gamma\delta$ (F536 i GL2), które reagują z $\gamma\delta$ V-obszarem determinant (odpowiednio V γ 3 i V δ 4) mają także pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej *in vivo*:

W celu stwierdzenia, który z regionów zmiennych V TCR $\gamma\delta$ jest zaangażowany w pozytywnej regulacji nadwrażliwości kontaktowej przeprowadzono doświadczenie z dostępnymi mAb przeciwko obszarowi zmiennemu V TCR $\gamma\delta$. Zwierzęta uczulone PCL traktowano dożylnie dawką 400 lub 25 μg /mysz mAb anty V γ 3(F536) lub anty V δ 4(GL2) lub 100 μg /mysz frakcją IgG chomika (HIgG) trzy dni po immunizacji. Rycina 3a pokazuje, że iniekcja mAb F536 oraz GL2 zwiększa wielkość odpowiedzi immunologicznej. Niemniej jednak efekt stymulujący wspomnianych przeciwciał występował w innym zakresie dawki. I tak iniekcja dawki 400 μg mAb F536 (grupa B) wywołuje efekt immunostymulujący gdy natomiast niższa dawka 25 μg (grupa C) nie wywiera jakichkolwiek zmian. W przypadku mAb GL2 dawka 400 μg pozostawała bez efektu (grupa D) podczas gdy iniekcja 25 μg (grupa E) zwiększała w sposób istotny wielkość reakcji nadwrażliwości kontaktowej. Iniekcja frakcji IgG chomika (jako kontrola) nie wpływała na wielkość odpowiedzi.

mAb anty- $\gamma\delta$: GL4 lecz nie lecz nie GL3 posiadają pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej u aktywnie uczulonych zwierząt:

W tym eksperymencie starano się sprawdzić czy inne mAb anty $\gamma\delta$ mają wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Myszy uczulone 5% roztworem PCL szczepiono dożylnie dawką 100 μg mAb GL3 lub GL4/mysz trzy dni po immunizacji. Jako przeciwciał kontrolnych posiadających pozytywny wpływ na odpowiedź immunologiczną użyto mAb anty- $\gamma\delta$ UC7. Rycina 3b pokazuje, że traktowanie myszy przeciwciałami GL4 zwiększa wielkość nadwrażliwości kontaktowej (grupa D), natomiast nie obserwowano jakiegokolwiek efektu po użyciu przeciwciał GL3 (grupa C) (testowanie nadwrażliwości kontaktowej 48 godz. po restymulacji haptenem).

mAb anty- $\gamma\delta$ nasilają reakcję nadwrażliwości kontaktowej gdy podawano je przed a nie po testowaniu haptenem:

W dalszych badaniach próbowano znaleźć optymalny czas iniekcji optymalnej dawki mAb. Aktywnie uczulone myszy traktowano dawką 25 μg

mAb UC7/mysz 1 dzień przed immunizacją haptenem, 1 lub dwa dni po uczuleniu w dniu testu lub 1 dzień po nim. Podanie dożylnie mAb przed testowaniem haptenem wywiera pozytywny efekt na reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Natomiast iniekcja mAb UC7 w dniu testowania haptenem lub jeden dzień po nim pozostaje bez wpływu na wielkość odpowiedzi (wyniki nie uwzględnione na rycinie).

Iniekcja mAb anty- $\gamma\delta$ biorcom transferu umożliwia powodzenie adoptywnego transferu nadwrażliwości kontaktowej przy użyciu limfocytów T $\alpha\beta$ pozbawionych obecności komórek $\gamma\delta$:

We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w naszym zakładzie wykazano, że komórki efektorowe nadwrażliwości kontaktowej pozbawione limfocytów $\gamma\delta$ nie są zdolne do adoptywnego przeniesienia reakcji nadwrażliwości kontaktowej (46). W dalszych badaniach stwierdzono także iż możliwe jest przeniesienie odporności przy użyciu komórek efektorowych pozbawionych limfocytów $\gamma\delta$ jedynie do biorców uprzednio traktowanych niską dawką cyklofosfamidu. W powyższym doświadczeniu próbowałem stwierdzić czy dożylnie traktowanie biorców transferu mAb anty- $\gamma\delta$ (UC7) pozwoli na powodzenie pasywnego transferu przy użyciu populacji uczulonych komórek pozbawionych uprzednio limfocytów TCR $\gamma\delta^+$ (Rycina 4). W niniejszym eksperymencie TCR $\gamma\delta^-$ komórki uczulone podawano dożylnie normalnym biorcom (grupa B), biorcom uprzednio traktowanym dawką 50 mg/kg cyklofosfamidu (grupa C) lub traktowanym różnymi dawkami mAb anty- $\gamma\delta$ (grupy D, E, F oraz G). W doświadczeniu testowano wpływ traktowania in vivo dawką 100; 25; 6.25 oraz 1.56 μg /mysz mAb UC7 na adoptywny transfer TCR $\gamma\delta^-$ populacji limfocytów uczulonych. Rycina 5 pokazuje, że dożylnie podanie przeciwciał UC7 biorcom komórek pozwala na adoptywny transfer przy użyciu TCR $\gamma\delta^-$ populacji nawet przy zastosowaniu najniższej dawki mAb 1.56 μg /mysz. Podsumowując można przypuszczać iż traktowanie biorców transferu mAb anty- $\gamma\delta$ może prowadzić do aktywacji pozytywnie działających limfocytów $\gamma\delta$ lub eliminacji komórek supresyjnych co z kolei pozwala

na powodzenie transferu nadwrażliwości kontaktowej w nieobecności limfocytów $\gamma\delta$ pośród komórek efektorowych.

Traktowanie zarówno dawców jak i biorców transferu mAb anty- $\gamma\delta$ (UC7) może przełamać działanie limfocytów T supresyjnych:

Poprzednie doświadczenia mogły sugerować iż limfocyty $\gamma\delta$ mogą posiadać aktywność kontrasupresyjną. Dla potwierdzenia tych przypuszczeń postanowiłem sprawdzić czy traktowanie mAb anty- $\gamma\delta$ może blokować działanie limfocytów T supresyjnych. Zarówno grupa dawców jak i biorców uczulonych komórek jak również obie grupy zwierząt jednocześnie (biorcy i dawcy) były traktowane dawką 100 μg mAb UC7 jeden dzień przed transferem komórkowym. Następnie uczulone komórki od myszy nie traktowanych lub traktowanych mAb UC7 inkubowano z limfocytami supresyjnymi po czym tak uzyskaną mieszaninę komórek podawano normalnym biorcom lub też biorcom traktowanym mAb UC7. Rycina 5 pokazuje, że traktowanie zarówno biorców jak i dawców transferu przeciwciałami anty- $\gamma\delta$ (porównaj grupę B z grupami C, D oraz E) pozwala na adoptywny transfer nadwrażliwości kontaktowej pomimo uprzedniej inkubacji uczulonych komórek z limfocytami supresyjnymi.

Analiza cytofluorymetryczna:

W celu stwierdzenia czy pozytywny efekt mAb anty- $\gamma\delta$ in vivo związany był ze zmianami ilościowymi komórek $\gamma\delta$ w doświadczeniach dokonano oceny ilościowej (skład procentowy) limfocytów $\text{TCR}\gamma\delta^+$ we krwi obwodowej oraz narządach limfatycznych. Uzyskane wyniki świadczą w sposób jednoznaczny, że dożylnie podanie 100 μg mAb UC7 na jeden dzień przed testem nie prowadzi do deplecji limfocytów $\gamma\delta$ w narządach chłonnych (węzły chłonne i śledziona). Także analiza cytofluorymetryczna krwi obwodowej nie wykazała w grupie badanej istotnych zmian w całkowitej ilości limfocytów jak również limfocytów $\alpha\beta^+$ i $\gamma\delta^+$ (wyniki nie uwzględnione na rycinie).

Limfocyty $\gamma\delta$ nie pokonują supresji poprzez produkcję rozpuszczalnych mediatorów:

Ponieważ poprzednie doświadczenia potwierdziły przypuszczenie o aktywności kontrasupresyjnej limfocytów $\gamma\delta$ powstaje zatem pytanie czy wspomniane zjawisko jest związane z produkowanymi przez limfocyty $\gamma\delta$ rozpuszczalnych czynników. W tym celu uczulone komórki inkubowano w medium bez komórek regulacyjnych (grupa A) lub z limfocytami supresyjnymi (grupa B). W niektórych grupach uczulone komórki preinkubowano z supernatantem uzyskanym z hodowli komórek limfoidalnych myszy uczulonych PCL nie traktowanych (grupa C) lub traktowanych (grupa D) dawką 100 μg mAb UC7 (grupa D). Rycina 6 pokazuje iż komórki efektorowe nadwrażliwości kontaktowej nie są chronione przez czynniki zawarte w supernatantach pochodzących od uczulonych zwierząt nie traktowanych (grupa C) jak również traktowanych mAb anty- $\gamma\delta$ (grupa D) przed negatywnymi sygnałami limfocytów supresyjnych.

Traktowanie tolerogennem indukuje supresję nie tylko u myszy kontrolnych 129/J TCR α +/+lecz także w defektywnym szczepie zwierząt 129/J TCR α -/- (α knock out mice):

W kolejnym eksperymencie starano się sprawdzić czy możliwa jest indukcja komórek supresyjnych w szczepie myszy pozbawionych limfocytów TCR $\alpha\beta$ ⁺. Uczulone komórki inkubowano z limfocytami supresyjnymi (indukowanymi przez dożylną injekcję TNBSA), które pochodziły od zwierząt kontrolnych 129/J (grupa B), myszy TCR α -/- (grupa C) lub zwierząt TCR α +/- (grupa D). Rycina 7 pokazuje iż dwukrotna dożylna injekcja TNBSA powoduje generację komórek supresyjnych zarówno u szczepu kontrolnego 129/J (grupa B) jak również u myszy TCR α -/- (grupa C) oraz TCR α +/- (grupa D).

$\gamma\delta$ pozytywne lecz nie $\gamma\delta$ negatywne komórki u myszy 129/J TCR α -/- hamują nadwrażliwość kontaktową:

W oparciu o wyniki z poprzedniego doświadczenia postanowiono

dokonać rozdziału komórek regulacyjnych przy użyciu ziarenek magnetycznych (magnetic beads) celem stwierdzenia jaki typ komórek hamuje reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Uczulone limfocyty inkubowano z nie rozdzielonymi komórkami regulacyjnymi lub frakcjonowanymi ($\gamma\delta^+$ lub $\gamma\delta^-$), które pochodziły od uprzednio toleryzowanych myszy 129/J lub $\text{TCR}\alpha^{-/-}$. Rycina 8 pokazuje, że komórki $\gamma\delta^+$ od myszy $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ posiadają aktywność supresyjną (grupa F). Natomiast we frakcji $\gamma\delta^-$ w tej samej grupie zwierząt obserwowano słabą aktywność supresyjną (grupa G), najprawdopodobniej było to związane z kontaminacją frakcji $\gamma\delta^-$ przez komórki $\gamma\delta^+$. Przeciwnostawne wyniki uzyskano testując komórki regulacyjne pochodzące od szczepu kontrolnego 129/J. Frakcja komórek $\gamma\delta^+$ nie posiadała własności supresyjnych (grupa C) podczas gdy komórki $\gamma\delta^-$ wykazywały silną aktywność supresyjną.

Swoistość antygenowa komórek supresyjnych $\text{TCR}\gamma\delta^+$:

W przedstawionym eksperymencie starano się sprawdzić swoistość antygenową $\gamma\delta^+$ komórek supresyjnych. W tym celu uczulone limfocyty pochodzące od myszy kontrolnych 129/J uczulonych PCL lub OX inkubowano z limfocytami supresyjnymi o swoistości antygenowej zgodnej lub odmiennej od komórek efektorowych. Komórki regulacyjne pochodziły od myszy kontrolnych 129/J oraz $\text{TCR}\alpha^{-/-}$. Uzyskane wyniki wskazują na to, że limfocyty $\gamma\delta^+$ o aktywności supresyjnej wykazują swoistość antygenową. Rycina 9 (porównaj grupy D i E).

DYSKUSJA

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wskazują iż limfocyty T z receptorem $\gamma\delta$ mogą wywierać pozytywny (kontrasupresyjny) lub negatywny (supresyjny) wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej w zależności od warunków ich indukcji oraz stymulacji. Istnieje wiele publikacji dotyczących funkcji immunoregulacyjnej limfocytów $\gamma\delta$ (39,40,43,44,46) jednak niewielka ilość prac poświęcona jest wpływowi przeciwciał monoklonalnych anty- $\gamma\delta$ na odpowiedź immunologiczną *in vivo* (87). Dotychczas przeprowadzono szereg doświadczeń z użyciem mAb skierowanych przeciw receptorowi $\alpha\beta$ limfocytów T. Limfocyty takie stanowią ponad 98% ogólnej populacji limfocytów T. Stosując przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko części zmiennej TCR $\alpha\beta$ w obecności Il-1 obserwowano proliferację klonu komórek zdolnych do produkcji Il-4 (88). Ponadto w badaniach przeprowadzonych *in vivo* stwierdzono, że traktowanie myszy w okresie noworodkowym wysokimi dawkami mAb anty-TCR $\alpha\beta$ prowadziło do eliminacji limfocytów T z receptorem $\alpha\beta$ (89). Konsekwencją usunięcia limfocytów T $\alpha\beta$ była obniżona odpowiedź na mitogeny splenocytów oraz obniżenie poziomu IgG w surowicy krwi.

Pozytywny wpływ mAb anty- $\gamma\delta$ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej został wykazany przeze mnie w trzech różnych systemach. Obejmują one nadwrażliwość kontaktową po aktywnym uczuleniu haptenem, adoptywny transfer odpowiedzi typu komórkowego oraz przełamanie supresji. We wszystkich typach doświadczeń, w których używano mAb anty- $\gamma\delta$ *in vivo* obserwowano ten sam efekt tj. pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Jest jednak interesujące, że nie wszystkie z testowanych mAb wywierają ten sam na reakcję nadwrażliwości kontaktowej.

Przeciwciała UC7 oraz GL4 skierowane przeciwko fragmentowi stałemu receptora antygenowego TCR $\gamma\delta$ wywierały pozytywny wpływ na

reakcję nadwrażliwości kontaktowej w systemie aktywnego uczulenia podczas gdy inne mAb - GL3, także skierowane przeciw części stałej TCR $\gamma\delta$, nie były aktywne. Mechanizmy poprzez które mAb powodują zwiększenie odpowiedzi immunologicznej mogą być dwojakie. Z jednej strony mAb mogą opsonizować limfocyty $\gamma\delta$ o aktywności supresyjnej i powodować ich eliminację przez komórki układu siateczkowo-środbłonkowego lub też poprzez następowe przyłączenie i aktywację dopełniacza prowadzić do ich cytolizy. Innym możliwym mechanizmem odpowiedzialnym za zwiększenie reakcji nadwrażliwości kontaktowej u zwierząt traktowanych mAb anty $\gamma\delta$ może być stymulacja limfocytów $\gamma\delta$ o aktywności kontrasupresyjnej co w konsekwencji może indukować odpowiednie sygnały na powierzchni błony komórkowej (ekspresja molekuł aktywacyjnych i adhezyjnych) oraz uwalnianie rozpuszczalnych czynników pełniących funkcję immunoregulacyjną (np. cytokiny). Za hipotezą aktywacji komórek $\gamma\delta$ przez mAb przemawia obserwowana między innymi przez Lynch i wsp. (90) proliferacja wspomnianych limfocytów *in vitro* pod wpływem mAb anty $\gamma\delta$ i w obecności odpowiedniego zestawu cytokin.

W trakcie prób ustalenia optymalnej ilości immunostymulującej mAb anty $\gamma\delta$ stwierdzono, że pozytywny wpływ mAb UC7 na reakcję nadwrażliwości kontaktowej wywierają dawki między 25 a 100 μg na mysz.

Powyższy stan może świadczyć iż aktywacja limfocytów T $\gamma\delta$ poprzez fragment stały TCR może wymagać interakcji ze specyficznymi miejscami obszaru stałego TCR $\gamma\delta$ ściśle określonym stosunku antygen-przeciwciało co w konsekwencji sprawia iż średnia dawka mAb (25-100 μg) wywiera znacznie silniejszy efekt na reakcję nadwrażliwości kontaktowej w porównaniu do dawek maksymalnej (400 μg) oraz minimalnej (1.56 μg). Wspomniane powyżej ściśle ograniczenie ilości mAb UC7, które stymuluje reakcję nadwrażliwości kontaktowej przypomina znane z serologii zjawisko Danyszka, w którym efekt maksymalny w reakcji antygen-przeciwciało jest obserwowany przy odpowiednim stosunku obu substratów reakcji. Ma to niewątpliwie

związek z dwoma rodzajami wiązań powstających w reakcji antygenu z przeciwciałem. Pierwszy typ wiązań to wiązania monogamiczne polegające na łączeniu dwóch miejsc wiążących przeciwciała z jedną cząsteczką antygenu. Wiązanie monogamiczne ma również miejsce w reakcji antygenu z nadmiarem przeciwciał gdzie możliwe jest wiązanie się cząsteczki przeciwciała poprzez jedno miejsce wiążące ze względu na dostępność determinant antygenowych. Drugi typ wiązania to wiązanie heterogamiczne gdzie cząsteczka przeciwciała łączy się swymi dwoma miejscami wiążącymi z dwoma różnymi cząsteczkami antygenu. Być może te dwa odmienne rodzaje wiązań antygen-przeciwciało w przypadku reakcji swoistych przeciwciał z receptorem antygenowym (TCR) mogą być przyczyną różnego stopnia aktywacji limfocytów.

W badaniach nad strukturami obszaru zmiennego (V) receptora antygenowego TCR $\gamma\delta$ zaangażowanymi w aktywacji lub eliminacji limfocytów T $\gamma\delta$ posłużono się dwoma mAb F536 o swoistości anty-V γ 3 oraz GL2, które rozpoznają fragment zmienny V δ 4. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika iż oba z testowanych *in vivo* mAb posiadają pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej u aktywnie uczulonych zwierząt. Niemniej jednak stymulujący zakres dawki dla każdego z przeciwciał był odmienny. I tak dla mAb F536 pozytywny efekt obserwowano w przypadku zastosowania maksymalnej dawki przeciwciał 400 $\mu\text{g}/\text{mysz}$, podczas gdy mAb GL2 indukowały podobny efekt po zastosowaniu niższej dawki równej 25 $\mu\text{g}/\text{mysz}$. Tak więc wzmoczenie odpowiedzi komórkowej obserwowano zawsze gdy podawano mAb anty- $\gamma\delta$ niezależnie od tego czy były one skierowane przeciwko fragmentowi stałemu (C) TCR czy też jego części zmiennej (V).

Jak już wspomniano i dyskutowano wyżej doświadczenia moje nie dają bezpośredniej odpowiedzi czy efekt wzmagający odpowiedź wyznaczony jest przez cytotoksyczne czy immunostymulujące działanie przeciwciał anty- $\gamma\delta$. Przychyłam się jednak bardziej do tej drugiej możliwości tym bardziej, że analiza cytofluorymetryczna wykazała, że iniekcja dożylna mAb UC7 jeden dzień przed testem nie wpływała na skład procentowy komórek $\gamma\delta$ w narządach chłonnych oraz krwi obwodowej. W

oparciu o przytoczone powyżej wyniki można przypuszczać, że pozytywny efekt mAb anti- $\gamma\delta$ obserwowany *in vivo* nie jest wynikiem eliminacji komórek $\gamma\delta$ lecz raczej spowodowany jest aktywacją komórek $\gamma\delta$.

Uzyskane wyniki pozwalają wysnuć hipotezę iż uruchomienie mechanizmów wywołujących aktywację komórki wymaga swoistych sygnałów a wartość progowa dla osiągnięcia pozytywnego efektu może być odmienna w przypadku różnych populacji komórek $\gamma\delta$ w zależności od ujawnianego przez nie obszaru zmiennego (V) receptora antygenowego TCR $\gamma\delta$. Dodatkowo odmienny immunostymulujący zakres dawki dla różnych mAb może być związany z różnym powinowactwem i swoistością mAb do rozpoznawanych przez nie struktur obszaru zmiennego TCR $\gamma\delta$. Nasuwa to przypuszczenie, że aktywacja odpowiedniego typu limfocytów T $\gamma\delta$ osiągnięta w danym procesie na drodze interakcji z przeciwciałem może ostatecznie dyktować jego zdolność do regulacji danego procesu. Możliwy jest jeszcze dodatkowy mechanizm. Istnieją doniesienia o występowaniu dwóch odmian TCR $\gamma\delta$ u ludzi. Pierwszy typ posiada łańcuch C γ 1 bogaty w cysteinę co sprzyja tworzeniu wiązań dwusiarczkowych z drugą składową receptora, łańcuchem δ . W drugim typie receptora $\gamma\delta$ w związku z występowaniem łańcucha C γ 2 nie dochodzi do wytworzenia wiązań dwusiarczkowych z łańcuchem δ . Obecność wiązania dwusiarczkowego pomiędzy łańcuchami γ i δ może być odpowiedzialne za inne odkształcenie przestrzenne receptora antygenowego C γ 1 w porównaniu z receptorem C γ 2 co w konsekwencji może powodować inny rodzaj pobudzenia komórki w momencie zadziałania bodźca np. antygen lub przeciwciała. Co prawda u myszy nie stwierdzono obecności receptorów $\gamma\delta$, w których brak jest dwusiarczkowego wiązania międzyłańcuchowego niemniej jednak istnienie drugiego typu receptora antygenowego $\gamma\delta$ jest teoretycznie możliwe. Powyższy stan mógłby częściowo tłumaczyć różny wpływ mAb na limfocyty $\gamma\delta$ w zależności od ujawnianego przez nie typu receptora $\gamma\delta$.

Pozytywny efekt mAb anti- $\gamma\delta$ UC7 w systemie aktywnego uczulenia obserwowano tylko wówczas gdy przeciwciała anti- $\gamma\delta$ podawano w okresie uczulenia a nie w dniu testowania nadwrażliwości kontaktowej (wyniki

nie ujęte w rycinie). Ten ostatni stan jest prawdopodobnie spowodowany faktem zbyt późnej aktywacji lub eliminacji komórek $\gamma\delta$ pełniących funkcję immunoregulacyjną.

Z uprzednich badań nad adoptywnym przeniesieniem nadwrażliwości kontaktowej wynika, że uczulone limfocyty $TCR\alpha\beta^+$ w nieobecności komórek $TCR\gamma\delta^+$ są zdolne tylko w niewielkim stopniu do przeniesienia odporności do immunokompetentnych, syngenicznych biorców. Dalsze badania wykazały także iż $\gamma\delta^-$ komórki mogą przenieść nadwrażliwość kontaktową do zwierząt traktowanych jeden dzień przed transferem niską dawką cyklofosfamidu (50 mg/kg). W moich doświadczeniach wykazałem, że w systemie biernego przeniesienia odporności dożylnie podanie mAb anti- $\gamma\delta$ (UC7) biorcom na jeden dzień przed transferem pozwala na przeniesienie nadwrażliwości kontaktowej przy użyciu uczulonych komórek pozbawionych uprzednio limfocytów $\gamma\delta$. Również i w tym przypadku jednoznaczna interpretacja działających mechanizmów jest trudna. Tak więc albo eliminacja negatywnie działających limfocytów $\gamma\delta$ u biorców transferu uprzednio traktowanych mAb anti- $\gamma\delta$ (podobnie jak hamowanie funkcji komórek supresyjnych biorców przez cyklofosfamid) pozwala na bierne przeniesienie odporności komórkowej przy użyciu antygenowo-swoistych uczulonych limfocytów $TCR\alpha\beta$ pozbawionych uprzednio komórek $\gamma\delta$, lub też stymulacja limfocytów kontrasupresyjnych $\gamma\delta^+$ u biorcy stanowi ochronę dla przenoszonych biernie uczulonych komórek.

W dalszych doświadczeniach wykazano iż traktowanie in vivo zwierząt mAb anti- $\gamma\delta$ (UC7) może znosić efekt działania limfocytów T supresyjnych. Uzyskane wyniki wykazują, że dożylnie podanie mAb anti- $\gamma\delta$ (UC7) biorcom lub dawcom uczulonych komórek pozwala na bierne przeniesienie odporności pomimo uprzedniej inkubacji komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej z limfocytami T supresyjnymi. Dość nieoczekiwany był wynik w grupie gdzie zablokowane przez limfocyty T supresyjne komórki efektorowe były zdolne do przeniesienia odpowiedzi komórkowej do biorców uprzednio traktowanych

mAb anty- $\gamma\delta$. Powyższy fakt pozostaje w pewnej sprzeczności z dotychczasowym stanem wiedzy na temat mechanizmu działania limfocytów T supresyjnych. Wiadomo bowiem iż choć zablokowanie komórek efektorowych przez limfocyty supresyjne a ściślej mówiąc przez ich czynnik supresyjny ma charakter odwracalny to następową inkubacja komórek efektorowych z limfocytami T kontrasupresyjnymi nie przywraca im zdolności do przenoszenia odpowiedzi komórkowej w transferze adoptywnym. Zjawisko odwracalności zjawiska supresji z udziałem limfocytów T $\alpha\beta$ może być związane z dwoma mechanizmami. Pierwszy z nich obejmuje obumieranie komórek supresyjnych (komórki te są krótko żyjące) co pozwala z czasem na odzyskanie aktywności przez komórki efektorowe. Drugi mechanizm związany jest z udziałem czynnika supresyjnego (TsF). W miarę upływu czasu uprzednio zablokowana funkcja komórek efektorowych przez TsF ulega zniesieniu, prawdopodobnie na skutek zmian metabolicznych zachodzących w limfocytach uczulonych. Jak widać zjawisko supresji z udziałem limfocytów T $\alpha\beta$ jest odwracalne w odległym horyzoncie czasu. Natomiast w moich doświadczeniach badania przeprowadzone były w krótkim przedziale czasowym. Obserwowany efekt przeniesienia odpowiedzi komórkowej przez uprzednio zablokowane komórki efektorowe gdy były one podawane biorcom uprzednio traktowanym mAb może świadczyć o zdjęciu "jarzma" supresji z komórek efektorowych przez zaktywowane u biorców komórki $\gamma\delta$ o aktywności kontrasupresyjnej pod wpływem mAb anty $\gamma\delta$. Mechanizm tego zjawiska pozostaje jednak całkowicie niejasny.

W innym doświadczeniu w którym komórki efektorowe od myszy traktowanych uprzednio mAb UC7 inkubowano z limfocytami T supresyjnymi były one nadal zdolne do przeniesienia odporności. Stan ten ściśle przypomina opisane zjawisko kontrasupresji w którym inkubacja limfocytów efektorowych z komórkami kontrasupresyjnymi lub ich antygenowo-swoistym czynnikiem czyni je niewrażliwymi na supresję wydaje się więc, że komórki efektorowe nadwrażliwości kontaktowej pod wpływem sygnałów generowanych przez komórki $\gamma\delta$ stają się niewrażliwe

na negatywne sygnały limfocytów T supresyjnych. Może to być związane z pewnymi zmianami strukturalnymi błony komórkowej (np. molekuł zaangażowanych w odpowiedzi immunologicznej) jak również z uwalnianiem przez limfocyty $\gamma\delta$ rozpuszczalnych czynników na wzór limfocytów T kontrasupresyjnych. W celu sprawdzenia tej hipotezy starano się ustalić czy takie rozpuszczalne czynniki są produkowane przez limfocyty $\gamma\delta$ i jeśli tak czy są one zdolne do ochrony limfocytów $\text{TCR}\alpha\beta^+$ przed negatywnymi sygnałami generowanymi przez komórki supresyjne. Wyniki badań pokazują iż preinkubacja komórek uczulonych z supernatantami pochodzącymi z hodowli komórek węzłów chłonnych i śledziony zwierząt uczulonych PCL nie traktowanych lub traktowanych mAb anti- $\gamma\delta$ nie zabezpiecza przed negatywnym działaniem limfocytów supresyjnych. Zatem uzyskane wyniki sugerują, że limfocyty $\gamma\delta$ nie produkują rozpuszczalnych czynników bądź też produkują je w ilościach niewykrywalnych w używanym teście ochrony komórek efektorowych przed negatywnymi sygnałami komórek spresyjnych. Łącznie jednak z powyżej przedstawionymi wynikami o pozytywnej roli limfocytów $\gamma\delta$ w reakcji nadwrażliwości kontaktowej wydaje się bardzo prawdopodobne iż dla pełnego efektu immunostymulującego komórek $\gamma\delta$ niezbędny jest bezpośredni kontakt (komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej z limfocytami $\gamma\delta$). Jest również wysoce prawdopodobne, że pewne rozpuszczalne czynniki (np. cytokiny) uwalniane przez komórki $\gamma\delta$ są niezbędne dla wyrażenia pełnej aktywności immunoregulacyjnej wspomnianej populacji komórek.

W dalszej części pracy skoncentrowano się nad zjawiskiem odwrotnym do uprzednio opisanego tj. nad supresją mediowaną przez limfocyty T $\gamma\delta$. W badaniach posłużono się defektywnym szczepem myszy 129/J $\text{TCR}\alpha^-/-$ (α knock out mice), które nie posiadają limfocytów T z receptorem $\text{TCR}\alpha\beta^+$.

Większość dotychczasowych prac traktuje supresję jako fenomen mediowany przez limfocyty $\text{TCR}\alpha\beta^+$ (91,92) Niemniej jednak z własnych badań na szczepie myszy CBA/J wynika, że aktywność supresyjna znajdowała się zarówno w populacji $\text{TCR}\alpha\beta^+$ jak również $\text{TCR}\alpha\beta^-$. Zatem w

organizmie może występować kilka jakościowo różnych mechanizmów supresji.

Dotychczas istnieją pojedyncze doniesienia na temat supresji mediowanej przez limfocyty T $\gamma\delta$ (44). Posłużenie się w eksperymentach myszami α knock out pozwoliło na swobodne manipulowanie czystą populacją limfocytów T $\gamma\delta$ przy jednoczesnym braku limfocytów TCR $\alpha\beta$.

W pierwszej fazie badań stwierdzono iż dożylnie podanie wysokiej dawki antygeny (TNBSA) indukuje supresję zarówno u heterozygot 129/J TCR α +/- jak również homozygot 129/J TCR α -/-, której wartość była porównywalna z supresją wywołaną u zwierząt kontrolnych 129/J TCR $\alpha\beta$ ⁺ co wykazano używając komórek limfoidalnych tych zwierząt jako limfocytów regulacyjnych w biernym transferze nadwrażliwości kontaktowej.

Istnienie zjawiska supresji u szczepu myszy pozbawionych limfocytów T TCR $\alpha\beta$ ⁺ może być tłumaczone między innymi tym iż obecne limfocyty T $\gamma\delta$ są odpowiedzialne za wspomniany fenomen. Przypuszczenie to istotnie zostało poparte badaniami w których izolowana z całej populacji komórek śledzionowych myszy α knock out czysta populacja komórek $\gamma\delta$ zachowywała swą aktywność supresyjną.

Istnieje kilka możliwych mechanizmów, przez które limfocyty supresyjne $\gamma\delta$ hamują aktywność komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej.

Należą do nich między innymi:

1. Eliminacja komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej przez limfocyty $\gamma\delta$ na drodze cytotoksycznego uszkodzenia. Istnieje szereg doniesień mówiących o tym, że limfocyty $\gamma\delta$ mogą posiadać aktywność cytotoksyczną (47,50). Należy jednak nadmienić iż supresja z udziałem limfocytów T $\alpha\beta$ nie jest związana z cytolizą komórek efektorowych gdyż jest odwracalna. Niemniej jednak nie można wykluczyć, że zjawisko to ma miejsce w przypadku komórek supresyjnych $\gamma\delta$.
2. Hamowanie funkcji efektorowych limfocytów zaangażowanych w reakcji nadwrażliwości kontaktowej poprzez bezpośredni kontakt komórka efektorowa-limfocyt supresyjny $\gamma\delta$ (np. poprzez ekspresję na błonie

komórkowej molekuł indukujących negatywne sygnały) lub też przez uwalnianie mediatorów przez limfocyty $\gamma\delta$ (np. cytokiny, inne czynniki o aktywności regulacyjnej) lub też łączne działanie tych mechanizmów.

Ostatnim już pytaniem, na które starano się znaleźć odpowiedź była swoistość antygenowa limfocytów supresyjnych $\gamma\delta$. Dla jej przetestowania posłużono się dwoma haptenami PCL oraz OX, które nie dają reakcji krzyżowych. Opisane doświadczenia przeprowadzono także na szczepie myszy " α knock out". Uzyskane wyniki wskazują w sposób jednoznaczny na swoistość antygenową limfocytów $\gamma\delta^+$ o aktywności supresyjnej. W piśmiennictwie również istnieją doniesienia na temat swoistości antygenowej komórek $\gamma\delta$ supresyjnych (44). Ponieważ reakcja nadwrażliwości typu późnego stanowi istotny mechanizm obrony ustroju musi ona znajdować się pod ścisłą kontrolą obwodów regulacyjnych. Do niedawna wiadomo było iż reakcja nadwrażliwości kontaktowej jest pozytywnie regulowana przez limfocyty $T\alpha\beta$ kontrasupresyjne. Z drugiej strony wspomniana reakcja odpowiedzi typu komórkowego znajduje się pod negatywną kontrolą limfocytów $T\alpha\beta$ supresyjnych. Dorobek ostatnich lat wniósł szereg dalszych informacji na temat regulacji nadwrażliwości kontaktowej. Obecnie można także przypuszczać, że reakcja nadwrażliwości kontaktowej znajduje się pod zarówno pozytywną jak i negatywną kontrolą limfocytów $T\gamma\delta$.

Przy obecnym stanie wiedzy można sądzić, że wszelkie zaburzenia któregoś z obwodów regulacyjnych może prowadzić do obniżenia odporności co manifestować się może zwiększeniem podatności na zakażenia czy też zapadalnością na nowotwory lub też jej zwiększeniem nieadekwatnym do potrzeb co może w konsekwencji prowadzić do nadwrażliwości lub chorób z autoagresji. W tą złożoną sieć interakcji "wplatają" się również swoją funkcją limfocyty T z receptorem $\gamma\delta$.

PODSUMOWANIE

1. Dożylnie podanie wysokiej dawki (400 $\mu\text{g}/\text{mysz}$) mAb anti- $\gamma\delta$ (UC7) aktywnie uczulonym zwierzętom zwiększa wielkość odpowiedzi immunologicznej. Efekt ten obserwowano zarówno gdy mAb podawano jeden dzień przed immunizacją lub trzy dni po uczuleniu lub w obu czasach.
2. Przy dożylnym podaniu mAb anti- $\gamma\delta$ (UC7) optymalna dawka immunostymulująca mieści się w granicach pomiędzy 25 a 100 $\mu\text{g}/\text{mysz}$.
3. Trzy inne mAb anti- $\gamma\delta$ wywierają także efekt immunostymulujący. Dożylnie podanie mAb GL4 (anti- $\gamma\delta$), F536 (anti-V γ 3) oraz GL2 (anti-V δ 4) zwiększa odpowiedź komórkową u aktywnie uczulonych myszy podczas gdy mAb GL3 pozostają areaktywne.
4. Dożylnie podanie dawki 25 $\mu\text{g}/\text{mysz}$ anti- $\gamma\delta$ (UC7) jeden dzień przed immunizacją, jeden lub dwa dni po uczuleniu wywiera pozytywny wpływ na reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Natomiast wstrzyknięcie mAb UC7 w dniu testowania lub jeden dzień po nim pozostaje bez wpływu na wielkość odpowiedzi.
5. Iniekcja mAb anti- $\gamma\delta$ biorcom transferu umożliwia powodzenie adoptywnego transferu nadwrażliwości kontaktowej przy użyciu limfocytów T $\alpha\beta$ pozbawionych obecności komórek $\gamma\delta$. Podobny efekt obserwowano po podaniu biorcom komórek uczulonych ($\gamma\delta^-$), których uprzednio traktowano niską dawką cyklofosfamidu.
6. Traktowanie zarówno biorców jak i dawców transferu mAb anti- $\gamma\delta$ (UC7) pozwala na przełamanie negatywnych sygnałów generowanych przez limfocyty T supresyjne.
7. Dożylnie podanie mAb UC7 na jeden dzień przed testem nie prowadzi do usunięcia limfocytów $\gamma\delta$ w narządach chłonnych (węzły chłonne, śledziona) oraz krwi obwodowej.
8. Komórki efektorowe nadwrażliwości kontaktowej nie są chronione przez czynniki zawarte w supernatantach uzyskanych z hodowli uczulonych myszy i traktowanych mAb UC7 przed negatywnymi sygnałami limfocytów supresyjnych.

9. Dwukrotna dożylna iniekcja TNBSA powoduje generację komórek supresyjnych u defektywnych myszy 129/J TCR α +/- jak również 129/J TCR α -/-.
10. Aktywność supresyjna u myszy 129/J TCR α -/- związana jest z populacją komórek $\gamma\delta^+$.
11. Limfocyty $\gamma\delta^+$ o aktywności supresyjnej wykazują swoistość antygenową.

WNIOSKI

1. Limfocyty T posiadające receptor $\gamma\delta$ mogą wywierać pozytywne (kontrasupresyjne) lub negatywne (supresyjne) działanie regulacyjne na reakcję nadwrażliwości kontaktowej u myszy mediowaną przez limfocyty T z receptorem $\alpha\beta$.

2. Fenomen kontrasupresji mediowanej przez limfocyty $\gamma\delta^+$ może być indukowany przez dożylne podanie przeciwciał anti- $\gamma\delta$ skierowanych zarówno przeciwko obszarowi stałemu jak również strukturom zmiennym receptora antygenowego TCR. Wpływ mAb anti- $\gamma\delta$ może polegać albo na eliminacji limfocytów T $\gamma\delta^+$ o działaniu supresyjnym poprzez ich opsonizację lub też poprzez stymulację limfocytów $\gamma\delta^+$ o działaniu kontrasupresyjnym.

3. Dożylne podanie myszom wysokiej dawki tolerogenu indukuje zarówno limfocyty T $\alpha\beta^+$ supresyjne jak również limfocyty T $\gamma\delta^+$ supresyjne. Dożylne podanie tolerogenu myszom defektywnego szczepu 129/J TCR α ^{-/-} nie posiadających limfocytów T $\alpha\beta^+$ powoduje indukcję limfocytów T $\gamma\delta^+$ supresyjnych, które wykazują swoistość antygenową.

Rycina 1

Traktowanie dawką 400 ug/mysz mAb anty- $\gamma\delta$ UC7 zwiększa wielkość odpowiedzi komórkowej u aktywnie uczulonych myszy:

Myszy CBA/J uczulano aktywnie przez malowanie skóry 5% roztworem PCL. Immunizowane zwierzęta traktowano i.v. dawką 400 μ g mAb UC7 jeden dzień przed uczuleniem, trzy dni po lub w obu czasach. Cztery dni po immunizacji myszy testowano na uszy roztworem 0.8% PCL w oliwie. Pomiaru grubości małżowiny usznej dokonywano przy użyciu śruby mikrometrycznej tuż przed aplikacją na uszy homologicznego haptenu oraz po 2, 24 oraz 48 godz. od restymulacji PCL. Od wyników grup doświadczalnych odejmowano nieswoisty obrzęk małżowiny usznej obserwowany u zwierząt, które nie były immunizowane a jedynie otrzymywały haptenu na uszy. Średnie wyniki w poszczególnych grupach podane są w jednostkach, $1j = 10^{-3}$ cm \pm SD (odchylenie standardowe). Każda grupa liczyła po cztery myszy. W teście t-Studenta znamienność statystyczna dla pomiarów po 48 godz. wynosi: B vs A, $p < 0.05$, C vs A, $p < 0.025$ oraz D vs A, $p < 0.025$.

Rycina 2

Wielkość reakcji nadwrażliwości kontaktowej jest zależna od dawki mAb anty- $\gamma\delta$:

Myszy CBA/J uczulano 5% PCL a następnie traktowano i.v. dawką 100; 25; 6.25 lub 1.56 μg /mysz mAb UC7 w trzecim dniu po immunizacji. Wielkość odpowiedzi oceniano 24 i 48 godz. po testowaniu haptenem. Grupa B różniła się od grupy kontrolnej A ($p < 0.025$) dla odczytu po 24 godz. Wielkość odpowiedzi w grupach C, D oraz E w odniesieniu do grupy kontrolnej A była wyższa lecz różnice nie były statystycznie znamienne. Znamienność statystyczna po 48 godz.: B vs A, $p < 0.05$; C vs A, $p < 0.005$; D vs A, $p < 0.05$ oraz E vs A, $p < 0.025$.

Rycina 3a

Podanie mAb anty- $V\gamma 3$ lub $V\delta 4$ zwiększa wielkość nadwrażliwości kontaktowej:

Aktywnie uczulone myszy CBA/J traktowano i.v. dawką 25 lub 400 μg /mysz mAb anty- $V\gamma 3$ (F536), anty- $V\delta 4$ (GL2) lub w grupie kontrolnej 100 μg chemicznej frakcji IgG (HIgG) jeden dzień przed testowaniem 0.8% PCL w oliwie. Dalsze szczegóły w opisie ryciny 1. W teście t-Studenta znamienność statystyczna dla pomiaru po 24 godz. wynosi: B vs A, $p < 0.005$, E vs A, $p < 0.005$, dla pomiaru po 48 godz.: B vs A, $p < 0.005$ oraz E vs A, $p < 0.005$.

Rycina 3b

mAb GL4 lecz nie GL3 zwiększają nadwrażliwość kontaktową u aktywnie uczulonych zwierząt:

Aktywnie uczulone myszy traktowano i.v. dawką 100 μg mAb UC7, GL3 lub GL4 trzy dni po uczuleniu haptenem. Pomiaru obrzęku usznego dokonywano 24 i 48 godziny po aplikacji haptenu na uszy (dzień 4 po uczuleniu). Rycina 4 pokazuje wyniki uzyskane w trakcie pomiaru po 48

godz. Zmienność statystyczna: B vs A, $p < 0.005$, D vs A, $p < 0.005$, A vs C, brak znamienności statystycznej.

Rycina 4

Traktowanie biorców mAb anti- $\gamma\delta$ UC7 pozwala na powodzenie transferu nadwrażliwości kontaktowej z użyciem populacji komórek uczulonych TCR $\gamma\delta^-$:

Uczulone komórki pozbawione limfocytów $\gamma\delta$ mają zmniejszoną zdolność do przeniesienia odporności do normalnych syngenicznych biorców. i zapobiega temu traktowanie biorców transferu mAb anti- $\gamma\delta$. Uczulone limfocyty pozbawione komórek $\gamma\delta$ podawano dożylnie normalnym biorcom, biorcom traktowanym dawką 50 mg/kg cyklofosfamidu lub różnymi dawkami mAb anti- $\gamma\delta$ UC7 (100; 25; 6.25 lub 1.56 $\mu\text{g}/\text{mysz}$) jeden dzień przed przeniesieniem komórek efektorowych. Zwierzęta otrzymywały 0.8% PCL na uszy natychmiast po transferze. Pomiaru obrzęku usznego dokonywano po 24 i 48 godz. Znamienność statystyczna po 24 godz.: C vs B, $p < 0.05$, E vs B, $p < 0.05$, D vs B, $p < 0.025$, F vs B, $p < 0.025$ oraz G vs B, $p < 0.025$, dla pomiaru po 48 godz.: D vs B, $p < 0.005$, E vs B, $p < 0.025$ oraz F vs B, $p < 0.025$.

Rycina 5

Traktowanie zarówno biorców jak i dawców transferu mAb UC7 chroni komórki efektorowe przed hamującym wpływem limfocytów Ts:

Dawcy, biorcy lub obie grupy zwierząt (biorcy i dawcy) uczulonych komórek byli traktowani dawką 100 μg mAb anti- $\gamma\delta$ UC7 jeden dzień przed transferem. 7×10^7 uczulonych komórek od myszy nie traktowanych lub traktowanych mAb UC7 inkubowano z 5×10^7 Ts przez 30 min. w temp 37C. Następnie zwiesinę komórek płukano i podawano i.v. myszom nie traktowanym lub traktowanym mAb UC7. Biorców transferu natychmiast testowano 0.8% PCL w oliwie. Oceny przyrostu grubości małżowiny usznej dokonywano po 24 i 48 godz. od aplikacji PCL na

uszy. Znamienność statystyczna dla pomiaru po 24 godz.: A vs B, $p < 0.005$, C,D,E vs B, $p < 0.005$. Dla pomiaru po 48 godz.: A vs B, $p < 0.05$, D vs B, $p < 0.025$ oraz E vs B, $p < 0.01$.

Rycina 6

Rozpuszczalne mediatory produkowane przez komórki $\gamma\delta$ in vitro nie zapobiegają supresji limfocytów efektorowych przez Ts:

Uczulone komórki (od zwierząt immunizowanych PCL) podawano dożylnie w PBS lub razem z komórkami supresyjnymi po uprzedniej inkubacji przez 30 min. w temp 37 C (grupy B, C oraz D). W grupach C i D uczulone limfocyty preinkubowano z supernatantami uzyskanymi z hodowli komórek uczulonych pochodzących od zwierząt nie traktowanych lub traktowanych dawką 100 μg mAb UC7 jeden dzień przed zbiórką komórek. Biorców transferu testowano 0.8% PCL w oliwie i przyrost grubości małżowiny usznej mierzono 24 godz. później. Znamienność statystyczna: A vs B,C, $p < 0.005$, A vs D, $p < 0.025$.

Rycina 7

Traktowanie tolerogenem indukuje supresję nie tylko u szczepu kontrolnego 129/J ($\text{TCR}\alpha^{+/+}$ lecz również u myszy 129/J $\text{TCR}\alpha^{+/-}$ oraz $\text{TCR}\alpha^{-/-}$:

7×10^7 uczulonych komórek od myszy 129/J inkubowano z 5×10^7 komórek supresyjnych (indukowanych przez dwukrotną injekcję TNBSA) pochodzących od myszy 129/J, $\text{TCR}\alpha^{+/-}$ lub $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ przez 30 min. w temp. 37C. Następnie komórki płukano i podawano dożylnie syngenicznym biorcom, których natychmiast testowano 0.8% PCL w oliwie. Przyrost grubości małżowiny usznej mierzono po 24 i 48 godz. Znamienność statystyczna dla pomiaru po 24 godz.: B vs A, $p < 0.005$; C vs A, $p < 0.005$ oraz D vs A, $p < 0.005$. Dla pomiaru po 48 godz.: B vs A, $p < 0.005$; C vs A, $p < 0.005$ oraz D vs A, $p < 0.025$.

Rycina 8

Limfocyty $\gamma\delta^+$ indukowane tolerogenem u myszy szczepu TCR α -/- hamują nadwrażliwość kontaktową:

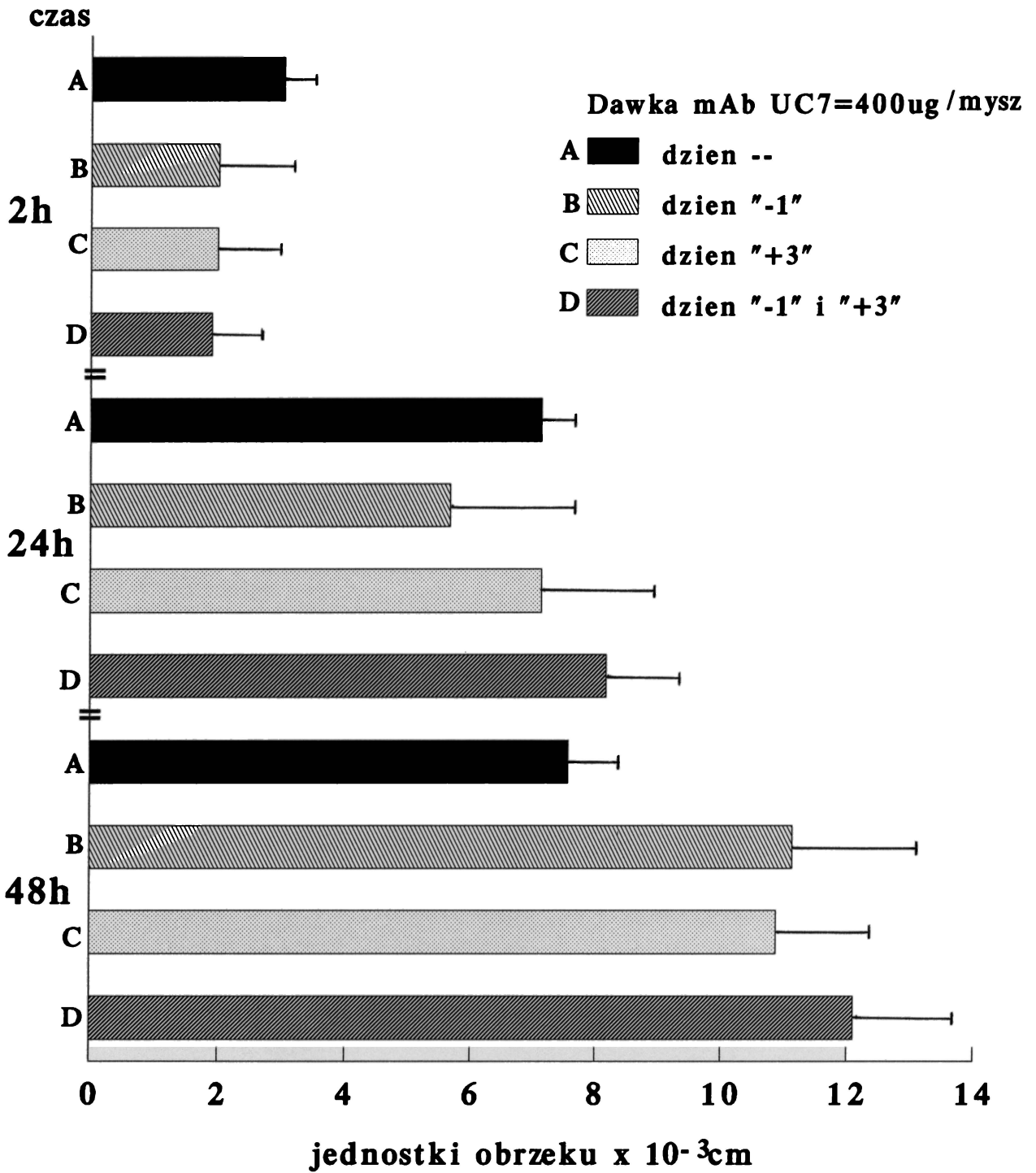
1.5×10^8 komórek śledzionowych od myszy 129/J lub TCR α -/- toleryzowanych przez dożylnie podanie TNBSA rozdzielano na $\gamma\delta^+$ oraz $\gamma\delta^-$ komórki przy użyciu ziarenek magnetycznych (opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko chemicznemu IgG). Następnie 7×10^7 uczulonych komórek inkubowano z 5×10^7 nie rozdzielanych komórek Ts lub ekwiwalentem rozdzielanych ($\gamma\delta^+$ lub $\gamma\delta^-$) komórek regulacyjnych pochodzących od myszy 129/J lub TCR α -/- przez 30 min. w temp. 37C. Jako kontrolę pozytywną używano komórki uczulone inkubowane tylko w medium (bez limfocytów regulacyjnych). Po zakończonej inkubacji komórki płukano i podawano dootrzewnowo biorcom, których testowano 0.8% PCL w oliwie następnego dnia. Oceny obrzęku usznego dokonywano po 24 godz. Znamienność statystyczna: B vs A, $p < 0.01$; D vs A, $p < 0.025$; E vs A, $p < 0.025$; F vs A, $p < 0.005$ oraz G vs A, $p < 0.05$.

Rycina 9

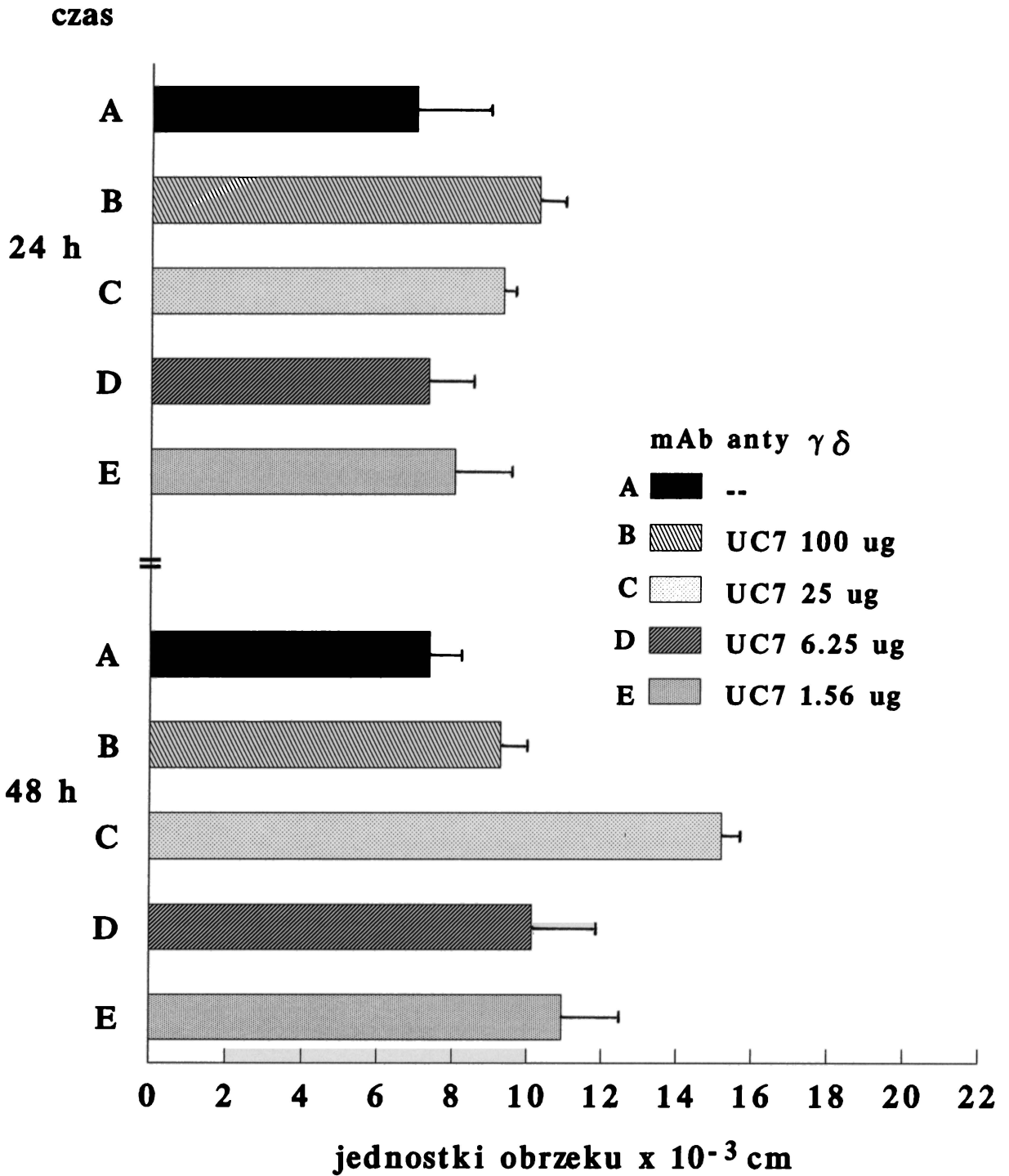
$\gamma\delta^+$ komórki supresyjne wykazują swoistość antygenową:

7×10^7 uczulonych komórek od myszy 129/J immunizowanych PCL lub OX inkubowano przez 30 min. w temp. 37C z 5×10^7 limfocytów supresyjnych o swoistości antygenowej zgodnej lub odmiennej z komórkami efektorowymi. Komórki śledzionowe od myszy 129/J lub TCR α -/- użyto jako źródło komórek regulacyjnych. Po zakończonej inkubacji komórki płukano i podawano dożylnie syngenicznym biorcom, których natychmiast testowano homologicznym haptenem (0.8% PCL lub OX) w oliwie. Przyrost grubości małżowiny usznej był oceniany po 24 godz. Znamienność statystyczna w teście TNP-swoistym: B vs A, $p < 0.01$; D vs A. Znamienność statystyczna w teście OX-swoistym: $p < 0.05$, C vs A, $p < 0.01$ oraz E vs A, $p < 0.005$.

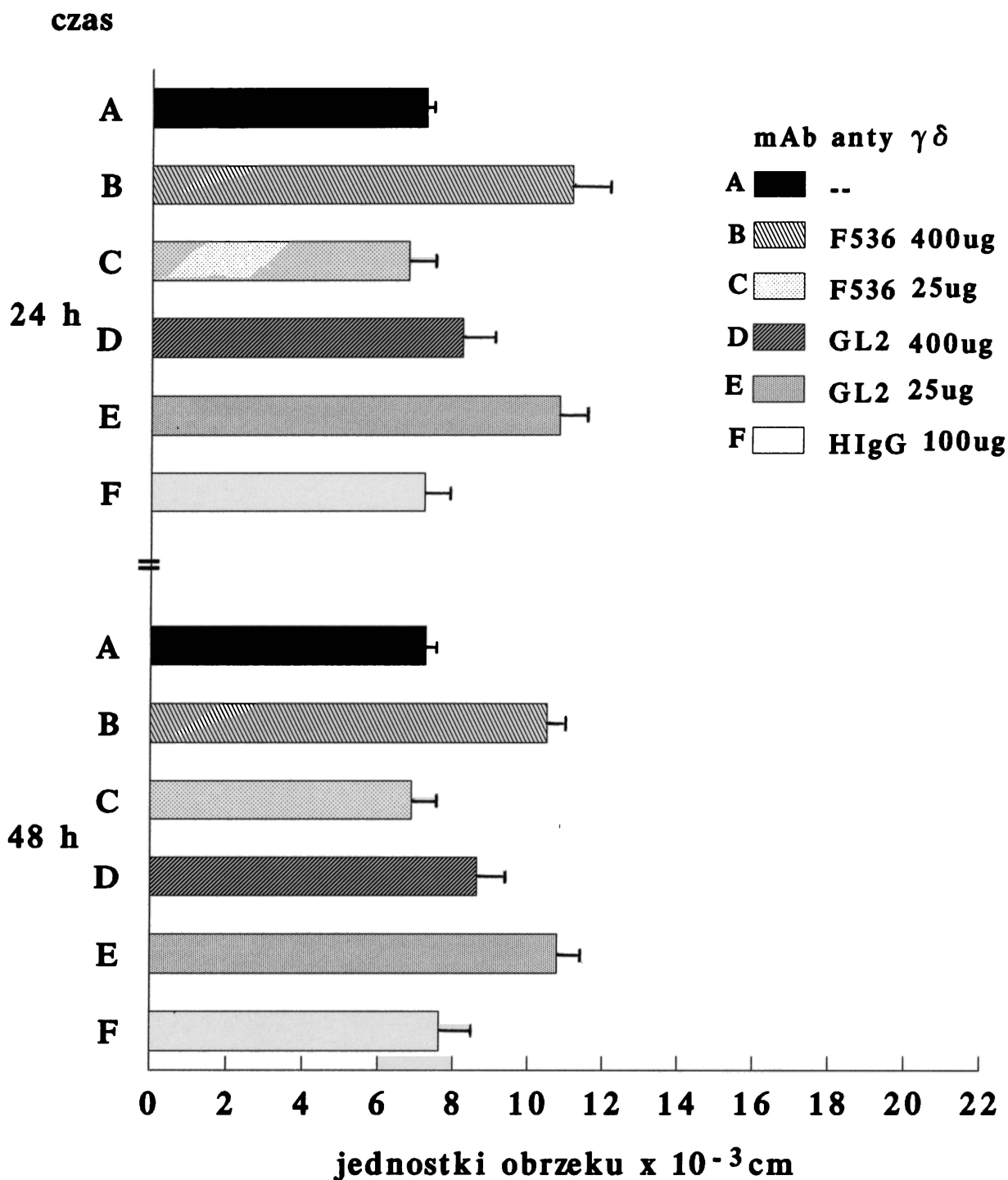
Ryc. 1



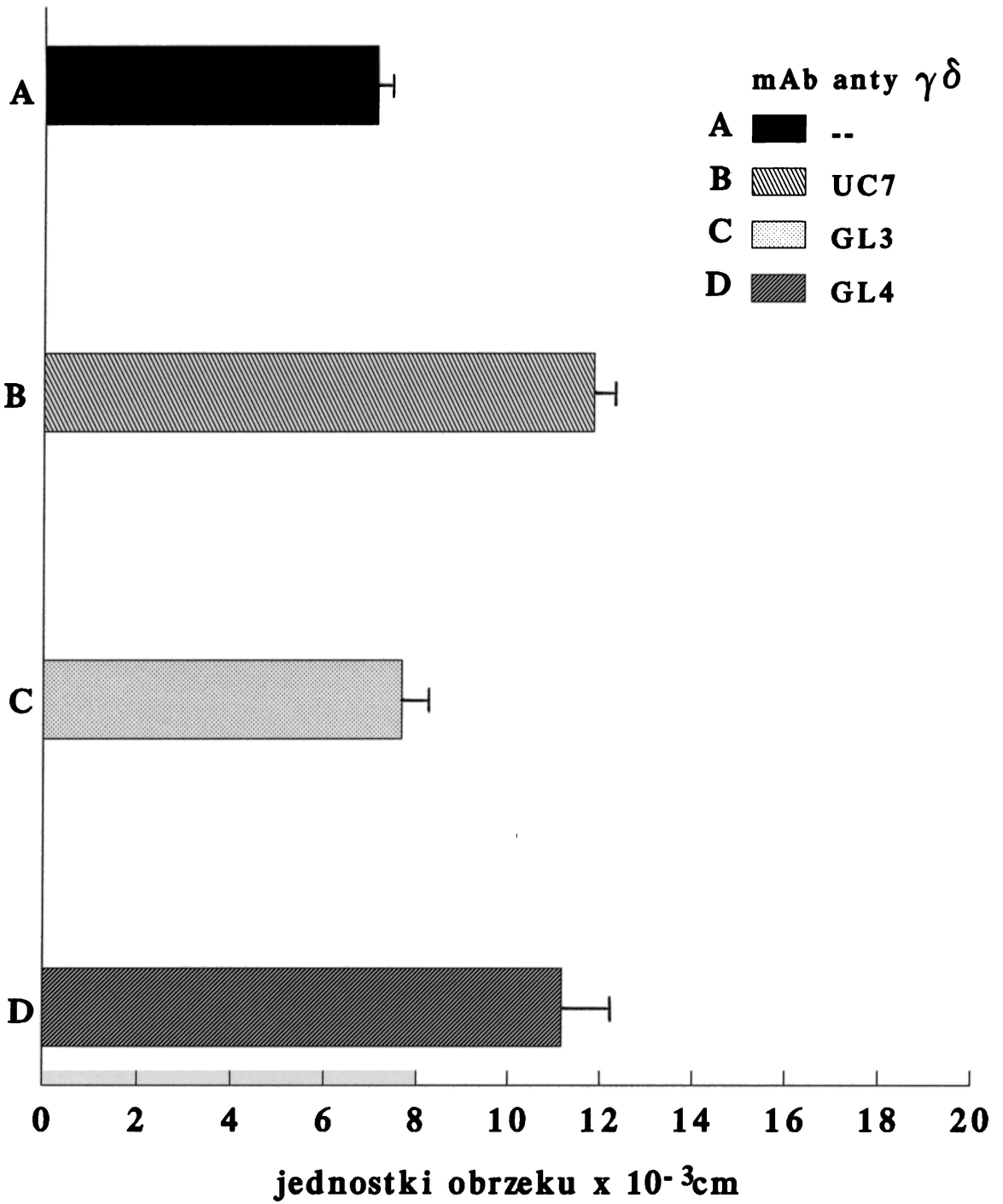
Ryc. 2



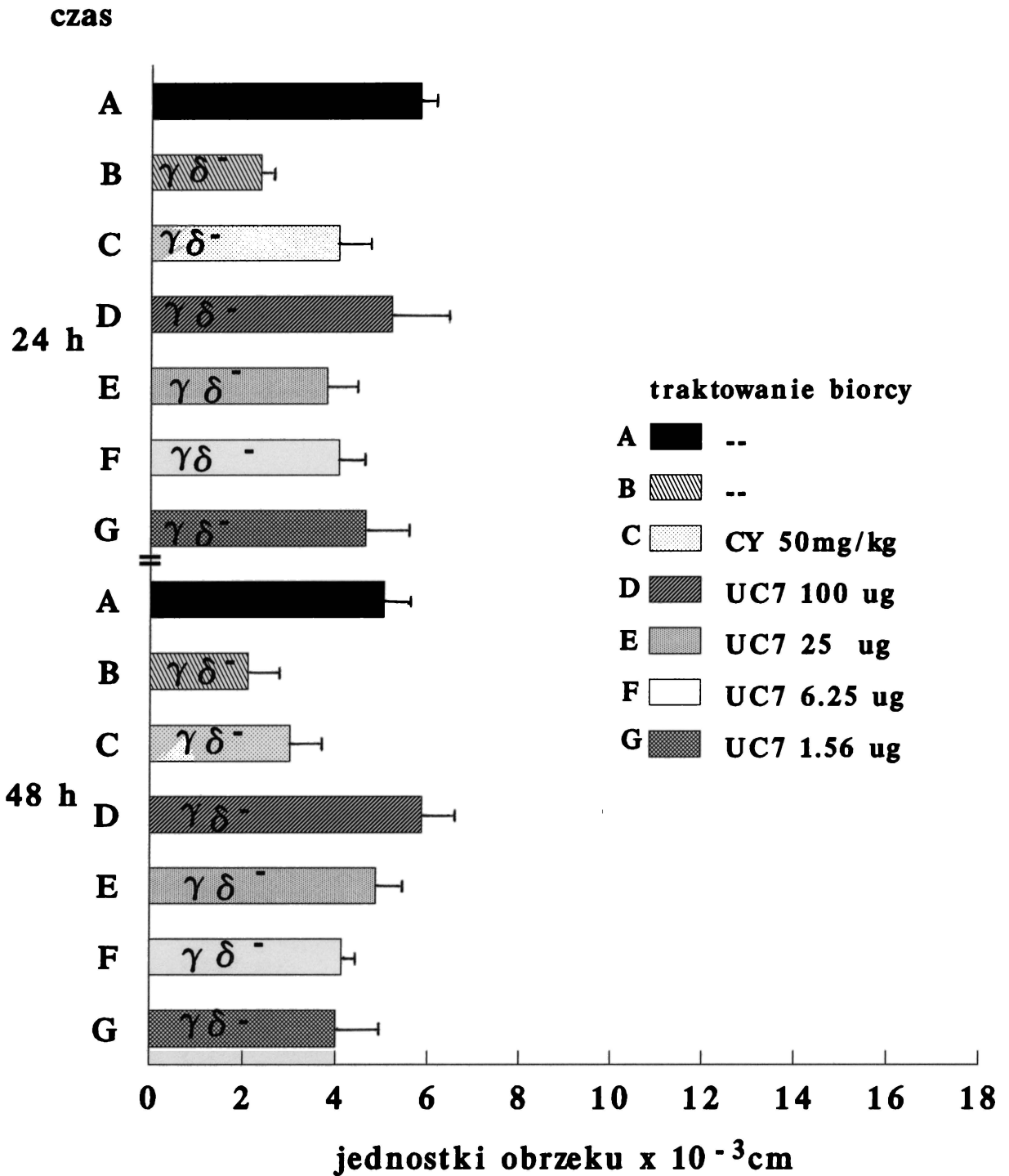
Ryc. 3 A



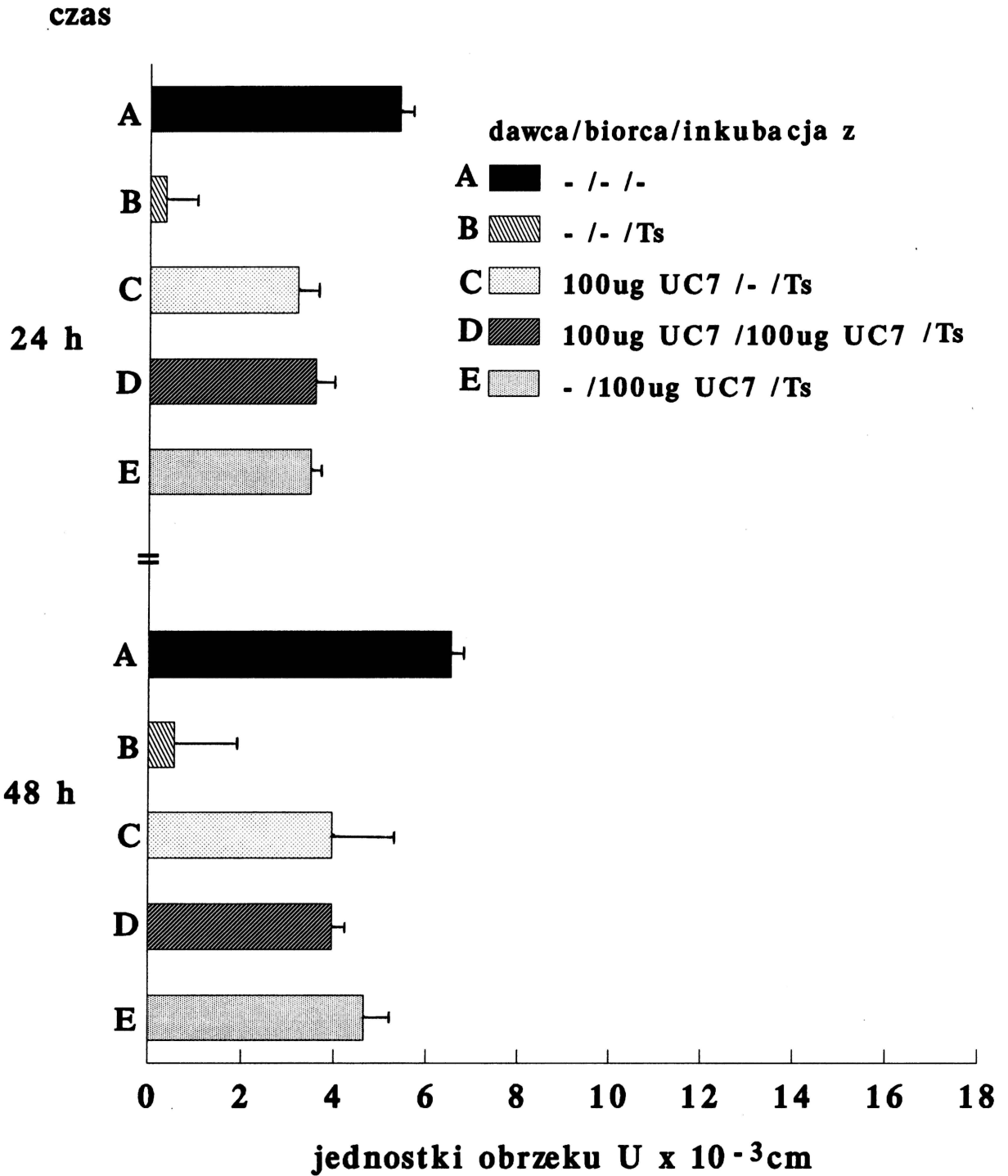
Ryc. 3B



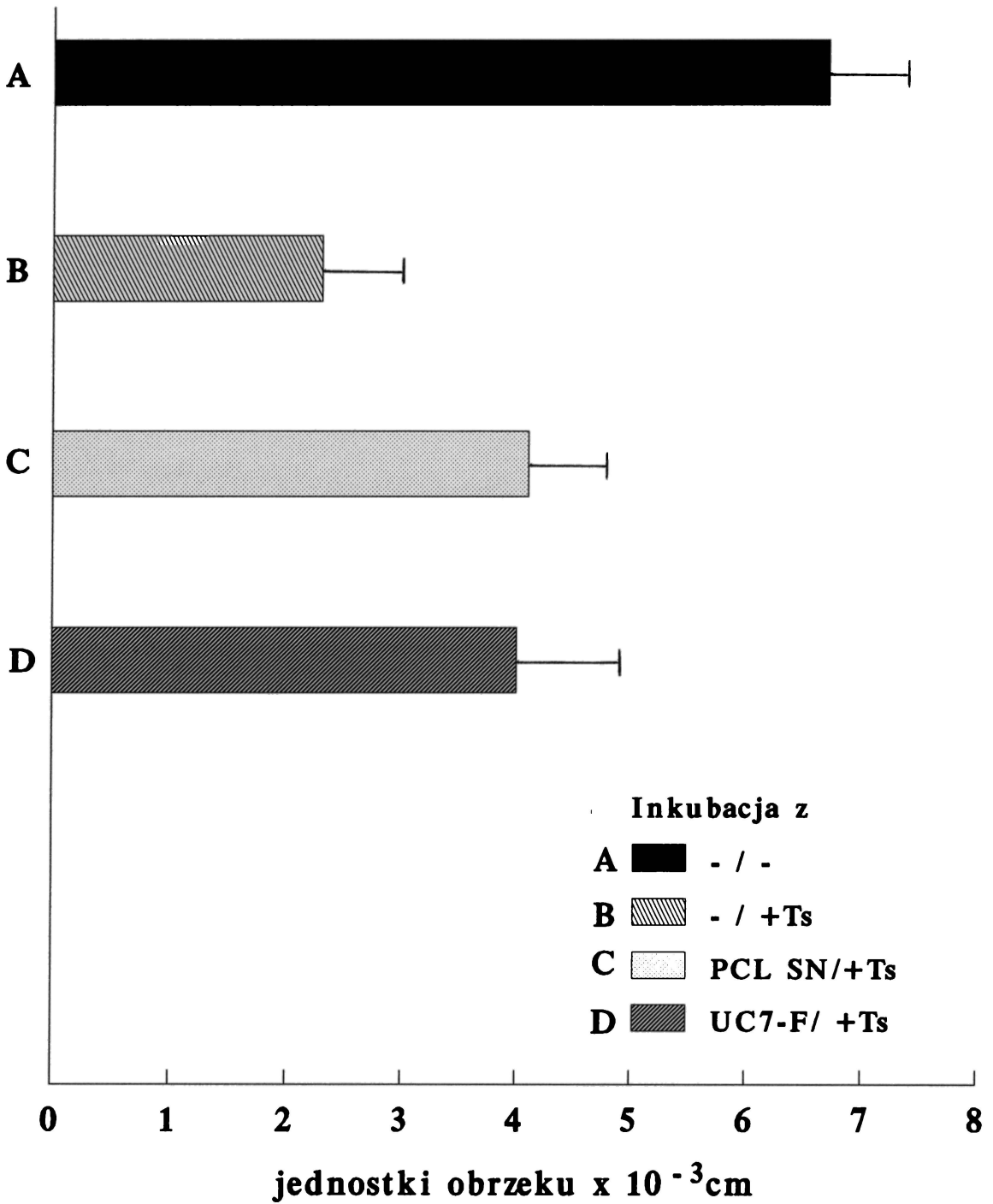
Ryc. 4



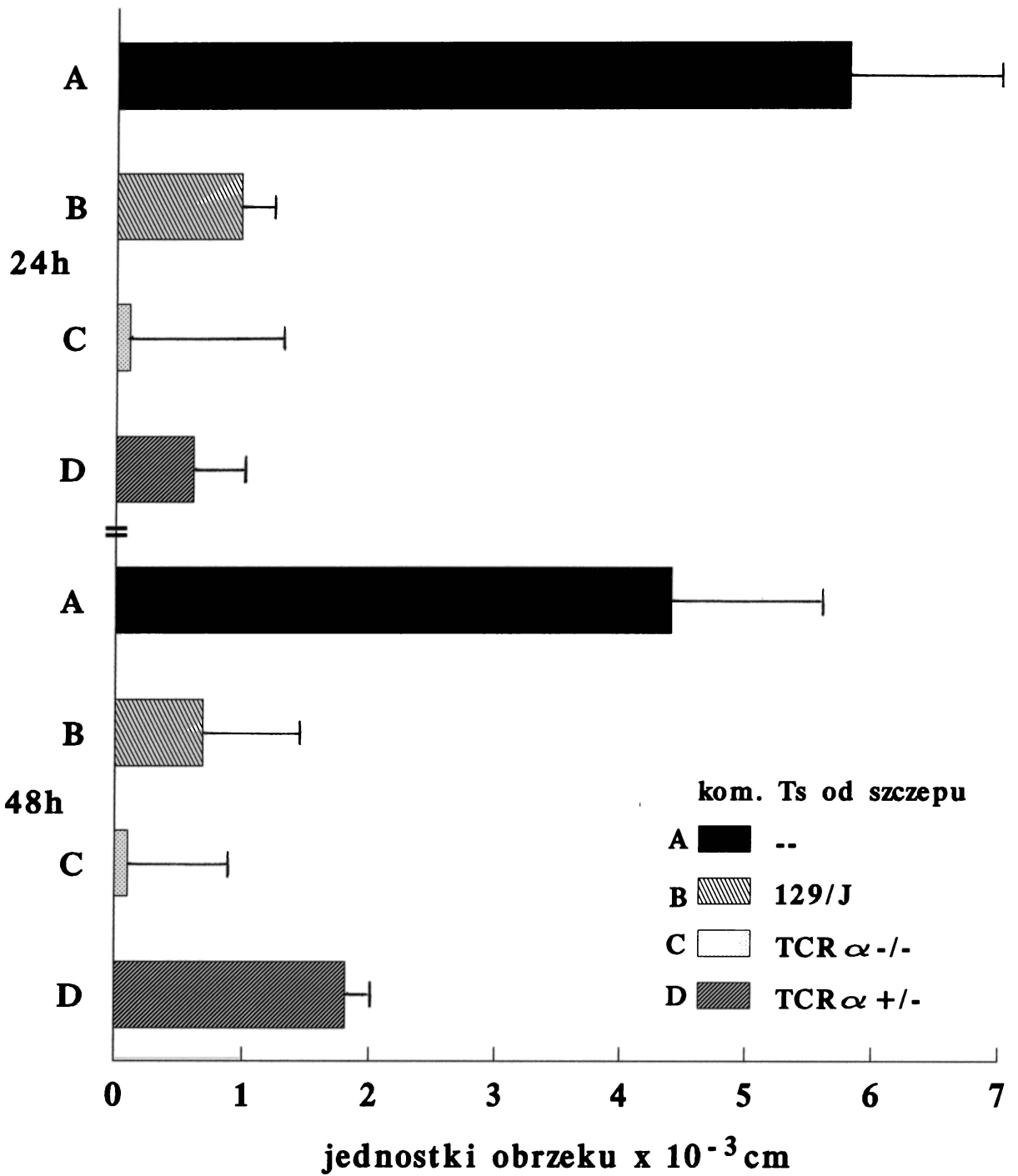
Ryc. 5



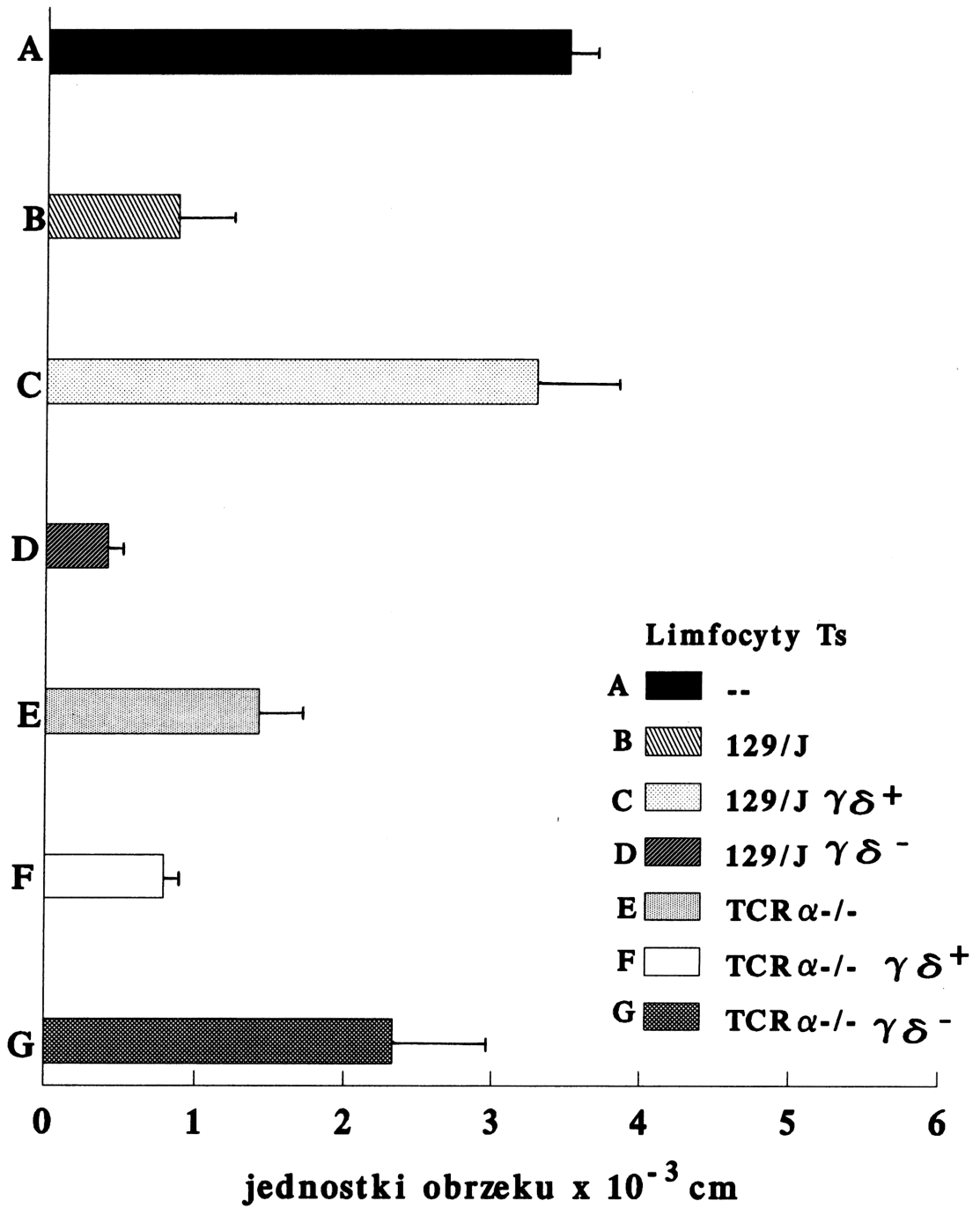
Ryc. 6



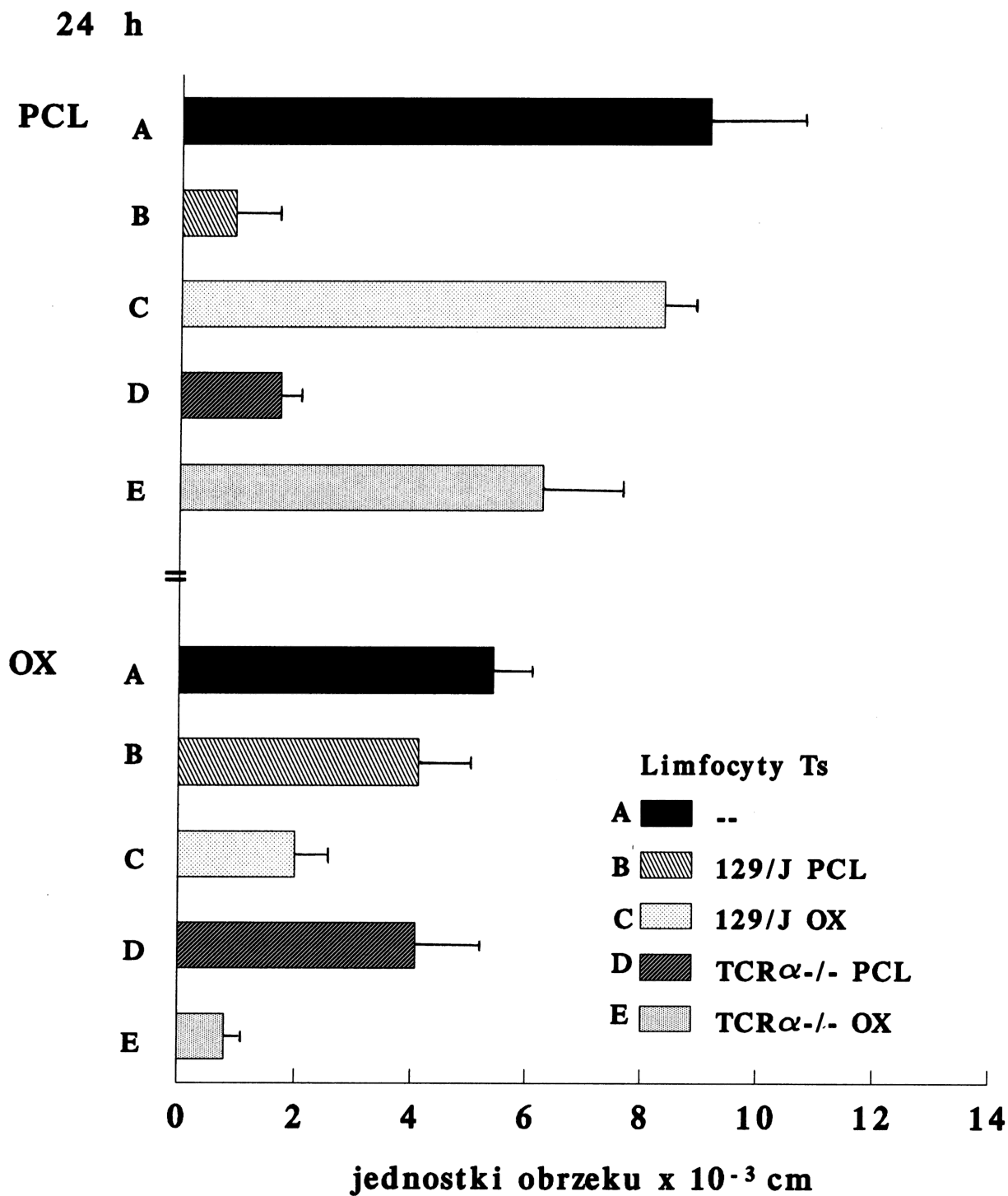
Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9



1. Cher D.J. Mosmann T.R.: Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. J. Immunol. 1987, 138, 3688-3694.
2. Herzog W.R. Ferreri N.R. Ptak W. Askenase P.W.: The antigen-specific DTH-initiating Thy1⁺ cell is double negative (CD4⁻CD8⁻) and CD3 negative, and express Il-3 receptors, but no Il-2 receptors. J. Immunol. 1989, 143, 3125-3133.
3. Mosmann T.R., Coffman R.L.: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 1989, 7, 145-173.
4. Marcinkiewicz J., Chain B.M.: Further studies on the regulation of lymphokine biosynthesis in contact sensitivity. Cytokine 1990, 2, 344-352.
5. Askenase P.W.: Delayed-type hypersensitivity recruitment of T cell subsets via antigen-specific non-IgE factors or IgE antibodies: Relevance to asthma, autoimmunity and immune responses to tumors and parasites. Chem. Immunol. 1992, 54, 166-211.
6. Gocinski B.L., Tigelaar R.E.: Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. J. Immunol. 1990, 144, 4121-4128.
7. Askenase P.W.: Effector and regulatory mechanisms in delayed-type hypersensitivity; in Allergy: Principles and practice, 2nd ed., eds. Middleton E. Jr., Reed C.E., Ellis E.F., Atkinson N.F. St. Louis, Mosby, 1988. 247-274.
8. Roitt I., Brostoff J., Male D.: Immunology, Mosby-Year Book Europe Ltd, 1993, 8.8-8.16.
9. Meltzer M.S., Nancy C.A.: Delayed-type hypersensitivity and induction of activated, cytotoxic macrophages. in Fundamental Immunology, 2nd ed. E. Paul, Raven Press Ltd., New York, 1989, 765-777.

10. Van Loveren H., Ptak W., Askenase P.W.: Involvement of antigen-specific T cell factors in regulation of separate steps in the delayed-type hypersensitivity cascade. *Lymphokines* 1987, 14, 405-429.
11. Asherson G.L., Ptak W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer. *Immunology* 1968, 15, 405-416.
12. Van Loveren H., Askenase P.W.: Delayed-type hypersensitivity is mediated by a sequence of two different T cell activities. *J. Immunol.* 1984, 133, 2397-2401.
13. Van Loveren H., Kato K., Meade R., Green D.R., Horowitz M, Ptak W, Askenase P.W.: Characterization of two different $Ly1^+$ T cell populations that mediate delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 1984, 133, 2402-2411.
14. Herzog W.R., Ferreri N.R., Ramabhadran R., Millet I., Askenase P.W.: An antigen-specific DTH-initiating cell clone: Functional, phenotypical and partial molecular characterization. *J. Immunol.* 1990, 144, 3667-3676.
15. Ptak W., Askenase P.W., Rosenstein R.W., Gershon R.K.: Transfer of an antigen specific immediate hypersensitivity-like reaction with an antigen binding factor produced by T cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1982, 79, 1969-1973.
16. Askenase P.W., Rosenstein R.W., Ptak W.: T cells produce an antigen binding factor with in vivo activity analogous to IgE antibody. *J. Exp. Med.* 1983, 157, 862-873.
17. Van Loveren H., Ratzlaff R.E., Kato K., Meade R., Ferguson T., Iverson M., Janeway C.A., Askenase P.W.: Immune serum from mice contact sensitized with picryl chloride contains an antigen-specific T cell factor that transfers immediate cutaneous reactivity. *Eur. J. Immunol.* 1986, 16, 1203-1208.
18. Fong A.T., Mossman T.R.: The role of $IFN-\gamma$ in delayed hypersensitivity mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* 1989, 143, 2887-2893.

19. Ptak W., Bereta M., Ptak M., Askenase P.W.: Isotype-like suppression of T cell-mediated immunity in vivo. I. Delayed-type hypersensitivity specificity of T cell suppression induced by antigen-binding T cell factors that initiate contact sensitivity. *J. Immunol.* 1986, 136, 1554-1563.
20. Ptak W., Bereta M., Ptak M., Askenase P.W.: Isotype-like suppression of T cell-mediated immunity in vivo: II. Suppression of the early component of contact sensitivity by a Ly2⁺ T cell-derived suppressor factor that binds to contact sensitivity-initiating, antigen-specific, Ly1⁺ cell-derived factors that are of different antigen specificities. *J. Immunol.* 1986, 136, 1564-1570.
21. Ptak W., Janeway C.A., Flood P.M.: Immunoregulatory role of Ig isotypes: II. Activation of cells that block induction of contact sensitivity responses by antibodies of IgG2a and IgG2b isotypes. *J. Immunol.* 1988, 141, 765-773.
22. Ptak W., Zembala M., Gershon R.K.: Intermediary role of macrophages in the passage of suppressor signals between T cell subsets. *J. Exp. Med.* 1978, 144, 424-434.
23. Kato K., Askenase P.W.: Reconstitution of an inactive antigen specific T cell suppressor factor by incubation of the factor with prostaglandins. *J. Immunol.* 1984, 133, 2025-2031.
24. Ptak W., Różycka D., Askenase P.W., Gershon R.K.: Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 1980, 151, 362-375.
25. Miller S.D., Claman H.N.: The induction of hapten specific T cell tolerance by hapten-modified lymphoid cells. I. Characterization of tolerance induction. *J. Immunol.* 1976, 117, 1519-1527.
26. Green M.I., Sugimoto M., Benacerraf B.: Mechanism of regulation of cell-mediated immune responses. I. Effect of the route of immunization with TNP-coupled syngenic cells on the induction and suppression of contact sensitivity to picryl chloride. *J. Immunol.* 1978, 120, 1604-1611.

27. Gautman S.C., Chikkake N.F., Hamilton T.A.: Anti-inflammatory action of Il-4. Negative regulation of contact sensitivity to trinitrochlorobenzene. *J. Immunol.* 1992, 148, 1411-1415.
28. Bogdon C., Vodovotz Y., Nathan C.: Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 1991, 174, 1549-1555.
29. Bloom B.R., Selgame P., Diamond B.: Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol. Today* 1992, 13, 131-136.
30. Ptak W.: Kontrasupresja-nowy obwód regulacyjny. Droga do odkrycia. *Immunol. Pol.* 1984, 9, 37-49.
31. Ptak W.: Regulacja odpowiedzi immunologicznej przez limfocyty kontrasupresyjne. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1984, 38, 389-425.
32. Ptak W., Friedman A., Bereta M., Marcinkiewicz J., Harvat B., Reuter P., Green D.R., Flood P.M.: The role of kontrasuppressor T cells in the adoptive transfer of contact sensitivity responses to picryl chloride. *Immunol. Res.* 1988, 7, 1-11.
33. Iverson G.M., Ptak W., Green D.R., Gershon R.K.: The role of kontrasuppression in the adoptive transfer of immunity. *J. Exp. Med.* 1983, 158, 982-987.
34. Britz J.S., Askenase P.W., Ptak W., Steiman R.M., Gershon R.K.: Specialized antigen-presenting cells: Splenic dendritic cells, and peritoneal exudate cells induced by mycobacteria activate effector T cells that are resistant to suppression. *J. Exp. Med.* 1982, 155, 1344-1352.
35. Ptak W., Ptak M., Gryglewski A.: Preferential induction of antigen-specific kontrasuppressor T lymphocytes by trinitrophenyl (TNP) - substituted Langerhans cells. *Scand. J. Immunol.* 1986, 23, 555-560.
36. Ptak W., Bereta M., Marcinkiewicz J., Gershon R.K., Green D.R.: Production of antigen-specific kontrasuppressor cells and factor and their augmentation of cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 1984, 133, 623-628.
37. Ptak W., Flood P.M., Marcinkiewicz J., Green D.R.: Immunoregulatory role of Ig isotypes. I. Induction of

- contrasuppressor T cells for contact sensitivity responses by antibodies of the IgM, IgG1 and IgG3 isotypes. *J. Immunol.* 1988, 141, 756-764.
38. Ptak W., Green D.R., Flood P.W.: Cellular interactions in the adoptive transfer of contact sensitivity: characterization of an antigen-nonspecific vicia villosa-adherent T cell needed for adoptive transfer into naive recipients. *J. Immunol.* 1986, 137, 1822-1828.
39. Fujihashi K., Kiyono H., Aicher W.K., Green D.R., Singh B., Eldridge J.H., Mc Ghee J.R.: Immunoregulatory function of CD3⁺, CD4⁻ and CD8⁻ T cells. $\gamma\delta$ T cell receptor-positive T cells from nude mice abrogate oral tolerance. *J. Immunol.* 1989, 143, 3415-3422.
40. Fujihashi K., Taguchi T., Mc Ghee J.R., Eldridge J.H., Bruce M.G., Green D.R., Singh B., Kiyono H.: Regulatory function for murine intraepithelial lymphocytes. Two subsets of CD3⁺, T cell receptor-1⁺ intraepithelial lymphocyte T cells abrogate oral tolerance. *J. Immunol.* 1990, 145, 2010-2019.
41. Yuuki H., Yoshikai Y., Kishikara K., Iwasaki A., Matsuzaki G., Takimoto H., Nomoto K.: Clonal anergy in self-reactive α/β cells is abrogated by heat-shock protein-reactive γ/δ T cells in aged athymic nude mice. *Eur. J. Immunol.* 1990, 20, 1475-1482.
42. Fujihashi K., Taguchi T., Aicher W.K., Mc Ghee J.R., Bluestone J.A., Eldridge J.H., Kiyono H.: Immunoregulatory function for murine intraepithelial lymphocytes. $\gamma\delta$ T cell receptor-positive (TCR⁺) T cells abrogate oral tolerance, while $\alpha\beta$ TCR⁺ T cells provide B cell help. *J. Exp. Med.* 1992, 175, 695-707.
43. Editorial: What's up with Gamma-Delta T cells? *Clin. Immunol. Spectrum.*, 1991, 7-13.
44. Mc Menamin C., Oliver J., Grin B., Holt B.J., Kees U.R., Thomar W.R., Holt P.G.: Regulation of T-cell sensitization at epithelial surfaces in the respiratory tract: suppression of IgE responses to inhaled antigens by CD3⁺ TCR α^-/β^- lymphocytes (putative γ/δ T cells) *Immunology* 1991, 74, 234-239.

45. Askenase P.W., Ptak W.: Role of Gamma/Delta T cells as positive regulators of Alpha/Beta TCR⁺ effector T cells in allergic contact sensitivity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1992, 99, 246-251.
46. Ptak W., Askenase P.W.: $\gamma\delta$ T cells assist $\alpha\beta$ T cells in adoptive transfer of contact sensitivity. *J. Immunol.* 1992, 149, 3503-3508.
47. Broker B., Lydyard P.M., Emmrich F.: The role of $\gamma\delta$ T cells in the normal and disordered immune system. *Klin. Wschr.* 1990, 68, 489-495.
48. Janis E.M., Kaufmann S.H.E., Schwartz R.H., Pardoll D.M.: Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to mycobacterium tuberculosis. *Science* 1989, 244, 713-716.
49. Taguchi T., Aicher W.K., Fujihashi K., Yamamoto M., Mc Ghee J.R., Bluestone J.A., Kiyomo H.: Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes: murine CD3⁺, γ/δ TCR⁺ T cells produce IFN- γ and Il-5. *J. Immunol.* 1991, 147, 3736-3744.
50. O'Brien R.L., Born W.K.: Direct evidence for an immunological role of lymphocytes bearing T cell receptor $\gamma\delta$. *The Year in Immunol.* 1990, 6, 51-68.
51. Haas W., Pereira P., Tonegawa S.: Gamma/Delta cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1993, 11, 637-685.
52. Male D., Champion B., Cooke A., Owen M.: *Advanced Immunology*, 1991, Gower Medical Publishing.
53. Sowder J.T., Chen C.H., Lanier A.L., Chan M.M., Cooper M.D.: A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T γ/δ receptor. *J. Exp. Med.* 1988, 167, 315-322.
54. Lewetzky A., Tiefenthaler G., Kubo R., Hunig T.: Identification and characterization of rat T cell subpopulations expressing T cell receptors $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$. *Eur. J. Immunol.* 1990, 20, 343-347.
55. Hein W.R., Mackay C.R.: Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 1991, 12, 30-34.
56. Deninger J., Wollace V.A., Kishihara K., Molina T., Krause H., Mak T.W.: Molecular organization, ontogeny and expression of murine $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors. *Exp. Clin. Immunogenet.* 1991, 8, 57-74.

57. Strominger J.L., Farber D.: The $\gamma\delta$ T cell receptor and class Ib MHC-related proteins: Enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* 1989, 57, 895-898.
58. Davis M.M., Bjorkman P.J.: T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 1988, 334, 395-401.
59. Bell E.B.: Thymus derived and non-thymus derived T-like cells: The origin and function of cells bearing $\gamma\delta$ receptors. *Thymus* 1989, 14, 3-17.
60. Spiess S., Kuchrober A., Schirmbeck R., Arden B., Reimann J.: Diversity of functional T-cell receptor δ -chain transcripts from bone marrow cells of athymic nude mice. *Immunology* 1993, 78, 252-259.
61. Mosley R.L., Styre D., Klein J.R.: Differentiation and functional maturation of bone marrow-derived intestinal epithelial T cells expressing membrane T-cell receptor in athymic radiation chimeras. *J. Immunol.* 1990, 145, 1369-1375.
62. Guy-Grand D., Cerf-Benussan N., Malissen B., Malassis-Seris M., Briotet C., Vassalli P.: Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: A role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 1991, 173, 471-481.
63. Lefrancois L.: Extrathymic differentiation of intraepithelial lymphocytes: generation of a separate and unequal T-cell repertoire? *Immunol. Today* 1991, 12, 436-438.
64. Lydyard P.M., van Eden W.: Heat shock proteins: immunity and immunopathology. *Immunol. Today* 1990, 11, 228-230.
65. Kaufmann S.H.E.: Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today* 1990, 11, 129-135.
66. Pfeffer K., Schoel B., Gulle H., Kaufmann S.H.E., Wagner H.: Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of $\gamma\delta$ T cells are stimulated by proteinase-resistant ligands. *Eur. J. Immunol.* 1990, 20, 1175-1179.
67. Pfeffer K., Schoel B., Plesnila N., Lipford G.B., Kromer S., Duesch K., Wagner K.: A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial

- ligand specifically activates $V\gamma 9^+$ human $\gamma\delta$ T cells. J. Immunol. 1992, 148, 575-583.
68. Janeway C.A.: doniesienie ustne.
69. Wade W.F., Davoust J., Salamero J., Andre P., Watts T.H., Cambier C.: Structural compartmentalization of MHC class II signaling function. Immunol. Today 1993, 11, 539-546.
70. Born W.K., O'Brien R.L., Modlin R.L.: Antigen specificity of $\gamma\delta$ T lymphocytes. FASEB J. 1991, 5, 2699-2703.
71. Haney J.A., Zmijewski C., Croce C.M.: Human TCR γ^+/δ^+ , $CD8^+$ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. J. Exp. Med. 1989, 169, 1847-1851.
72. Born W.K., Harshan K., Modlin R.L., O'Brien R.L.: The role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in infection. Curr. Opin Immunol. 1991, 3, 455-459.
73. Orsini D.L.M., Res P.C.M., Laar van J.M., Muller L.M., Soprano A.E.L., Kooy Y.M.C., Tak P.P., Koning F.: A subset of $V\delta 1$ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines in vitro. Scand. J. Immunol. 1993, 38, 335-340.
74. Carding S.R., Allan W., Kyes S., Hayday A., Bottomly K., Doherty P.C.: Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by γ/δ^+ T cells. J. Exp. Med. 1990, 172, 1225-1231.
75. Uyemura K., Hos C.T., Ohmen J.D., Rea T.H., Modlin R.L.: Selective expansion of $V\delta 1^+$ T cells from leprosy skin lesions. J. Invest. Dermatol. 1992, 99, 848-852.
76. Janeway C.A., Jones B., Hayday A.: Specificity and function of T cells bearing $\gamma\delta$ receptors. Immunol. Today 1988, 9, 73-76.
77. Kabelitz D.: Function and specificity of human γ/δ -positive T cells. Crit. Rev. Immunol. 1992, 11, 281-303.
78. Sioud M., Kjeldsen-Kragh J., Quayle A., Kalvenes C.W., Waalen K., Forre O., Natvig J.B.: The $V\delta$ gene usage by freshly isolated T lymphocytes from synovial fluids in rheumatoid synovitis: a preliminary report. Scand. J. Immunol. 1990, 31, 415-421.
79. Sioud M., Forre O., Natvig J.B.: T cell receptor δ diversity of

- freshly isolated T lymphocytes in rheumatoid synovitis. Eur. J. Immunol. 1991, 21, 239-241.
80. Ciccone E., Grossi C.E., Edwards J.C.W., Mackenzie L., Kinne R., Weseloh G., Gluckert K., Lydyard P.M.: T $\gamma\delta$ cells and their subset in blood and synovial tissue from rheumatoid arthritis patients. Scand. J. Immunol. 1990, 32, 585-593.
81. Forsgren A., Sjoquist J.: Protein A from *S. aureus*. I Pseudo-immune reaction with human γ -globulin. J. Immunol. 1976, 6, 207-215.
82. Herzog W.R., Ptak W., Askenase P.W.: Suppression and contrasuppression in athymic nude mice: Nude mice produce the antigen-specific component of a T suppressor factor that inhibits the 24-hr phase of DTH, but not generate suppression nor contrasuppression of the early initiating phase of DTH. Cell. Immunol. 1990, 127, 130-145.
83. Ptak W., Rosenstein R.W., Gershon R.K.: Interaction between molecules (subfactors) released by different T cell sets that yield a complete factor factor with biological (suppressive) activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 2375-2378.
84. Ptak W., Różycka D., Rewicka D.: Induction of suppressor cells and cells producing antigen-specific suppressor factors by haptens bound to self carriers. Immunobiology 1979, 156, 400-409.
85. Mc Cune J.M., Namikawa R., Kaneshima H., Schultz L.D., Lieberman M., Weissman I.L.: The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. Science 1988, 241, 1632-1642.
86. Whitesides G.W., Kazlauskas R.J., Josephson L.: Magnetic separations in biotechnology. Trends Biotechnol. 1983, 1, 144-148.
87. Hiromatsu K., Yoshikai Y., Matsuzaki G., Ohga S., Muramori K., Matsumoto K., Bluestone J.A., Nomoto K.: A protective role of $\gamma\delta$ T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. J. Exp. Med. 1992, 175, 49-56.
88. Janeway C.A., Bottomly K.: Signals and signs for lymphocyte

responses. Cell 1994, 76, 275-285.

89. Mixter F.P., Sydora B.C., Hershberg R.M., Kronenberg M.: Depletion of $\alpha\beta$ T cell antigen receptor bearing lymphocytes by neonatal monoclonal antibody treatment. J. Immunol. 1991, 147, 4109-4117.

90. Lynch F.: doniesienie ustne.

91. Asherson G.L., Zembala M.: Suppression of contact sensitivity by T cells in the mouse. I. Demonstration that suppressor cells act on the effector stage of contact sensitivity and their induction following in vitro exposure to antigen. Proc. Roy. Soc. Med. 1974, 187, 329-335.

92. Zembala M., Asherson G.L.: Depression of the T cell phenomenon of contact sensitivity by T cells from unresponsive mice. Nature 1973, 244, 227-233.