

Agnieszka Jóźwik

**BADANIE ZMIAN FENOTYPU I DYNAMIKI
PROLIFERACJI LIMFOCYTÓW T
U PACJENTÓW Z CHOROBAŁ ALZHEIMERA**

(Rozprawa doktorska)

**Katedra i Zakład Fizjopatologii
Akademii Medycznej w Gdańsku**

Promotor: dr hab. n. med. Jacek Maciej Witkowski, prof. ndzw.

Gdańsk 2008

„Zadanie nauki polega na tym,
by zastąpić wizję faktami,
a wrażenia dowodami.”

John Ruskin

**Serdecznie dziękuję
mojemu promotorowi, prof. Jackowi Witkowskiemu
oraz wszystkim, których wsparcie merytoryczne
oraz poświęcony czas sprawiły, że możliwe było powstanie tej pracy**

Wykaz najważniejszych skrótów używanych w pracy:

A β	amyloid beta
AD	(ang. Alzheimer's disease) choroba Alzheimera
APP	(ang. amyloid precursor protein) białko prekursorowe beta amyloidu
CFSE	(ang. carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)
FACS	(ang. fluorescence activated cell sorter) cytometr przepływowy
FITC	(ang. fluorescein isothiocyanate) związek fluoresceiny wykazujący fluorescencję o długości fali 519 nm
FSC	(ang. forward scatter channel) detector rozproszenia światła zgodnym z kierunkiem wiązki laserowej
IL	interleukina
MFI	(ang. mean fluorescence intensity) średni poziom fluorescencji
MHC	(ang. major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej
PBMC	(ang. peripheral blood mononuclear cells) jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PBS	(ang. phosphate buffered saline) sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PE	(ang. phycoerythrin) fikoerytryna, białko wykazujące fluorescencję o długość fali - 578 nm
PerCP	(ang. peridinin chlorophyll protein) białko wykazujące fluorescencję o długości fali 675 nm
SSC	(ang. Side scatter Channel) detektor, mierzący ilość światła rozproszonego pod kątem 90 stopni od osi optycznej
TCR	(ang. T cell receptor – receptor limfocytów T)

SPIS TREŚCI

Wykaz najważniejszych skrótów używanych w pracy.....	4
1. WSTĘP	
1.1 Choroba Alzheimerera i jej patomechanizm.....	8
1.2 Immunologia choroby Alzheimerera.....	11
1.2.1 Rola limfocytów w patogenezie choroby Alzheimerera.....	12
1.2.2 Limfocyty T w immunoterapii choroby Alzheimerera.....	16
1.2.3 Rola odpowiedzi zapalnej i cytokin w patogenezie choroby Alzheimerera..	17
1.3 Rola cholesterolu w patogenezie choroby Alzheimerera.....	19
1.3.1 Tratewki błonowe a zaburzenia funkcjonalności komórek układu immunologicznego.....	21
1.3.2 Tratewki błonowe i ich potencjalna rola w patogenezie AD.....	22
2. CELE PRACY.....	23
3. MATERIAŁY I METODY.....	24
3.1 Charakterystyka badanych grup.....	24
3.2 Ocena lipidogramu.....	26
3.3 Oznaczanie subpopulacji limfocytów z krwi pełnej.....	26
3.4 Izolacja limfocytów z krwi pełnej.....	27
3.5 Ocena tempa proliferacji limfocytów.....	28
3.5.1 Zakładanie hodowli komórkowych.....	28
3.5.2 Pomiary cytometryczne i analiza wyników.....	30
3.6 Ocena poziomu cytokin typu Th1 i Th2.....	31
3.7 Analiza statystyczna.....	31

4. WYNIKI

4.1	Zmiany fenotypowe limfocytów T pacjent z chorobą Alzheimera ex vivo w porównaniu z grupą osób zdrowych.....	32
4.1.1	Zmiany odsetka komórek CD28+ oraz poziomu ekspresji tego antygenu na limfocytach osób chorych z AD.....	32
4.1.2	Zmiany proporcji subpopulacji aktywowanych limfocytów CD4+ u osób z chorobą Alzheimera.....	34
4.2	Porównanie zmian fenotypu limfocytów T u osób zdrowych i chorych z AD w wyniku stymulacji przeciwciałem antyCD3 oraz mieszaniną przeciwciał antyCD3antyCD28.....	38
4.2.1	Porównanie zmian fenotypu limfocytów T u osób z AD i osób zdrowych związanych z aktywacją za pomocą przeciwciała antyCD3.....	38
4.2.2	Porównanie zmian fenotypu limfocytów T u osób z AD i osób zdrowych związanych z aktywacją za pomocą przeciwciałami antyCD3 oraz antyCD28.....	39
4.3	Porównanie zmian dynamiki proliferacji limfocytów T u osób chorych z AD i w grupie osób zdrowych zależnej od stymulacji przeciwciałem antyCD3 oraz mieszaniną przeciwciał antyCD3antyCD28.....	40
4.4	Ocena efektu β -amyloidu na odpowiedź proliferacyjną limfocytów CD4+CD28+ oraz na fenotyp limfocytów T.....	41
4.5	Porównanie stężeń cytokin Th1/Th2 w surowicy krwi oraz w supernatantach z hodowli komórkowych stymulowanych przeciwciałem antyCD3 w kostymulacji z A β 1-42.....	56
4.5.1	Stężenie cytokin Th1/Th2 w surowicy krwi osób z chorobą Alzheimera w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych.....	56
4.5.2	Porównanie poziomu produkcji cytokin Th1/Th2 w wyniku stymulacji przeciwciałem antyCD3 oraz modulacji tej stymulacji przez peptyd A β 1-42 w obu badanych grupach.....	59
4.6	Porównanie poziomu lipidów w surowicy krwi pacjentów z chorobą Alzheimera z grupą kontrolną osób zdrowych oraz próba korelacji tego parametru ze zmianami w cyklu komórkowym oraz poziomem cytokin..	63

4.6.1.	Porównanie poziomu lipidów w surowicy krwi pacjentów z chorobą Alzheimera z grupą kontrolną osób zdrowych.....	63
4.6.2	Próba powiązania zmian w postaci podwyższonego poziomu cholesterolu u osób z AD z parametrami dynamiki cyklu komórkowego oraz produkcją cytokin w wyniku odpowiedzi na β -amyloidy.....	65
4.7	Analiza korelacji zaawansowania choroby Alzheimera z fenotypem limfocytów ex vivo oraz parametrami dynamiki cyklu komórkowego i stężeniem cytokin Th1/Th2 w osoczu i supernatantach hodowlanych.....	67
5.	DYSKUSJA	
5.1	Zmiany fenotypowe limfocytów T u chorych z AD oraz ich potencjalne znaczenie dla funkcjonalności komórek.....	69
5.2	Zmiany dynamiki proliferacji komórek CD4+CD28+ u osób z AD i zdrowych w odpowiedzi na modyfikację stymulacji antyCD3 i antyCD3/antyCD28 przez β -amyloidy.....	71
5.3	Różnice w stężeniu cytokin Th1/Th2 w surowicy krwi oraz w supernatantach hodowli stymulowanych antyCD3 i β -amyloidem 1-42 oraz ich powiązanie ze zmianami dynamiki cyklu komórkowego.....	77
5.4	Próba powiązania podwyższonego poziomu cholesterolu u osób z AD ze zmianami fenotypu oraz kinetyki proliferacji komórek T.....	79
6.	PODUMOWANIE.....	81
7.	WNIOSKI.....	82
8.	LITERATURA.....	83
9.	STRESZCZENIE.....	96
10.	ABSTRAKT.....	96

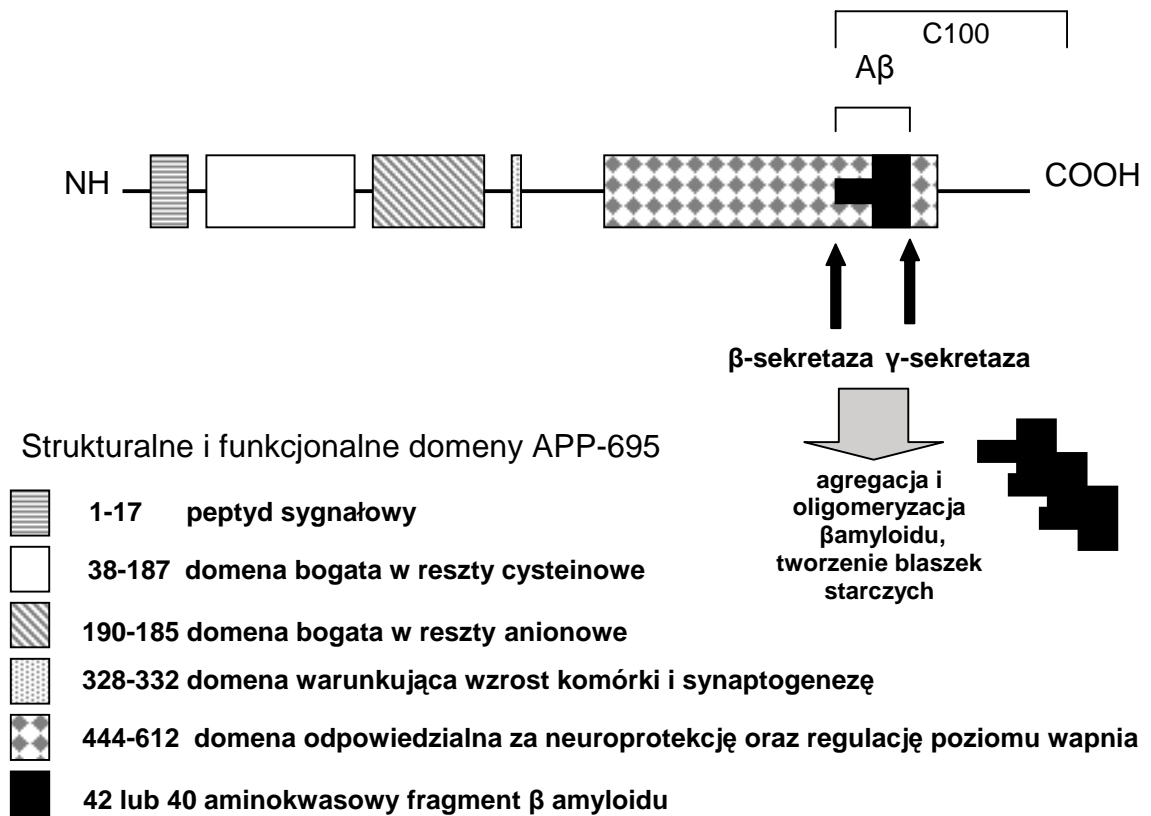
1. WSTĘP

1.1 Choroba Alzheimerera i jej patomechanizm

Choroba Alzheimerera, (ang. Alzheimer's disease – AD) - jest najczęstszą postacią otępienia w populacji ludzi w podeszłym wieku. Szacuje się, że na świecie liczba osób dotkniętych tą chorobą to około 15-21 milionów, natomiast w samej Polsce liczbę tę ocenia się na 500 tysięcy osób (Barcikowska, 2004).

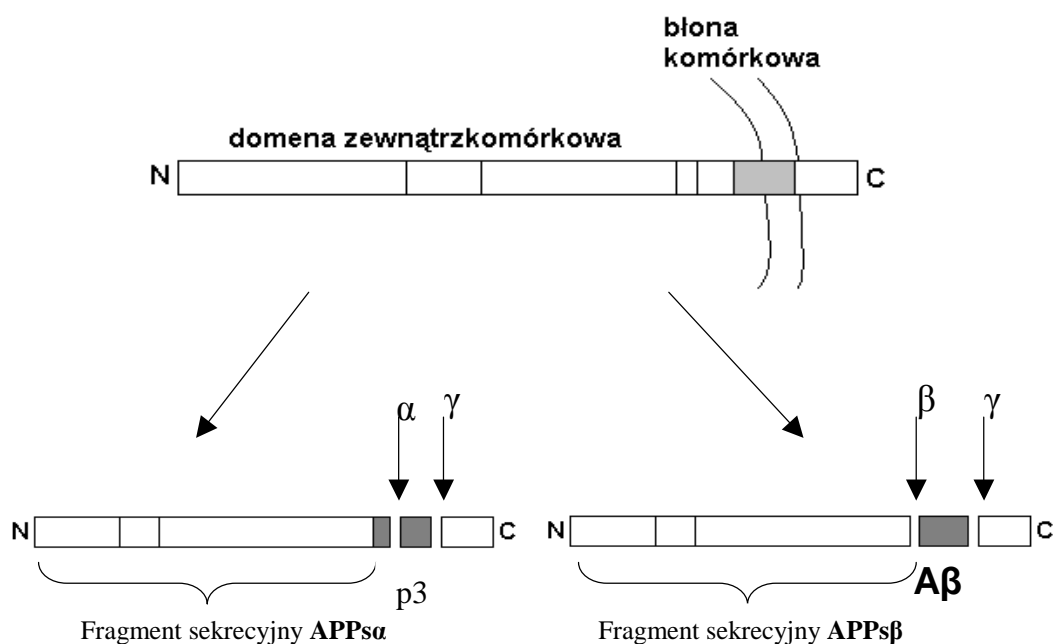
U podstaw etiologii choroby Alzheimerera leży odkładanie w określonych obszarach mózgu dwu białek o zmienionej konformacji: β -amyloidu ($A\beta$) w przestrzeni zewnątrzkomórkowej przyjmującego postać blaszek starczych oraz białka tau wewnątrz neuronów pod postacią splotów neurofibrylarnych.

Z punktu widzenia patogenezy AD najistotniejszą funkcję pełni β -amyloid ($A\beta$). $A\beta$ jest 40-42- aminokwasowym fragmentem powstającym ze znacznie dłuższego błonowego białka prekursorowego β APP (β -amyloid precursor protein) liczącego 375 aminokwasów (Rycina 1) (Selkoe i wsp, 1996). Biologiczna rola tego białka nie jest do końca poznana. Istnieją hipotezy, że jest to jeden z czynników troficznych (Saitoh i wsp, 1997), biorących udział w transdukcji sygnału lub, że jest to jedno z białek szoku termicznego albo, że stanowi ono element połączeń synaptycznych. (Wang B., 2007)



Rycina 1. Budowa białka APP wraz z wyszczególnieniem jego funkcjonalnych domen (kolejne liczby oznaczają liczby porządkowe aminokwasów licząc od końca N). (Neve R. L. , 2000, zmodyfikowano)

β APP może być przetwarzane na dwa sposoby. Jedną z możliwości jest cięcie proteolityczne dokonywane przez α - i γ - sekretazę, którego konsekwencją jest powstanie neuroprotekcynnego fragmentu sekrecyjnego - APPs α (secreted Amyloid Prekursor Protein) oraz 3 kDa peptydu w formie rozpuszczalnej, nie tworzącego złogów. Jeżeli natomiast jest ono dokonywane przez β - i γ -sekretazę, generowany jest neurotoksyczny **β -amyloid** (Rycina 2), który wykazuje tendencję do agregacji i w związku z tą właściwością tworzy amyloidowe blaszki starcze.



Rycina 2. Metabolizm białka APP i dwa rodzaje generowanych produktów: rozpuszczalny fragment p3 oraz amyloidogenna forma A β . (Johnston J. A., 2005, zmodyfikowano)

Najczęściej spotykane formy uwolnionego A β to **1-40** i **1-42**, przy czym dłuższa forma wykazuje większe zdolności do agregacji (Citron M. i wsp., 1996). Uwolniony A β 1-42 łatwiej agreguje i tym samym jest bardziej neurotoksyczny (Hartmann 1997).

Obumieranie neuronów indukowane przez formy β -amyloidu odbywa się głównie drogą apoptozy poprzez uwalnianie kaskady wolnych rodników, działanie tlenku azotu i aminokwasów pobudzających (Mattson M. P, i wsp 1992) oraz w konsekwencji stanu zapalnego wywołanego obecnością złogów β -amyloidu (Maccioni R.B. i wsp., 2008).

Do czynników ryzyka choroby Alzheimera niechybnie należy wiek. Rozpowszechnienie choroby u osób w wieku 65 lat i powyżej określa się na 1,9-5,8%. Do 74 roku życia współczynnik rozpowszechnienia wynosi poniżej 5%, natomiast u 85-latków wzrasta do 20-30% (Kiejna A. i wsp, 2005).

Wśród postaci AD rozróżnia się postać sporadyczną oraz postać rodzinną, związaną z dziedziczeniem określonego wariantu APO E.

Jedynym potwierdzonym, wielokrotnie uznanym genetycznym czynnikiem ryzyka jest polimorfizm genu apolipoproteiny E (APO E), kodującego białko zaangażowane w transport cholesterolu (Poirier J. i wsp. 1993; Strittmatter W. J. i wsp, 1993). Izofорма oznaczona numerem $\epsilon 4$ zwiększa ryzyko zachorowania nawet

kilkunastokrotnie, a izoforma APO E oznaczona $\epsilon 2$ ma działanie ochronne, szczególnie, jeżeli występuje jako homozygota. Pamiętać jednak należy, że grupa chorych o znanym dziedziczeniu dotyczy nie więcej niż 1,5 do 5% wszystkich przypadków AD (Cruts i wsp., 1998).

Pozostałymi czynnikami genetycznymi, które zwiększają ryzyko zachorowania na AD są polimorfizmy genów presenilin (kodujących sekretazy uczestniczące w tworzeniu β -amyloidu) oraz mutacje białka APP (amyloid precursor protein)- białka prekursorowego β -amyloidu (Barcikowska M., 2003).

1.2 Immunologia choroby Alzheimerera

Od kilku lat trwają badania, które potwierdziły rolę układu immunologicznego w patogenezie choroby Alzheimerera. Metabolity amyloidowe białka APP są celem układu immunologicznego, który jest zaangażowany w ich usuwanie. 'Przechwytywaniem' i przetwarzaniem β -amyloidu zajmują się komórki mikrogleju i makrofagi (Maat-Schieman M. L. i wsp 1994, Shaffer i wsp 1995, Parensce D. M. i wsp 1996) oraz białka takie jak apolipoproteina E (Strittmatter i Roses, 1995), oraz autoprzeciwciała (Gaskin F. i wsp, 1993) i komórki dendrytyczne (Grubeck – Loebenstein B. i wsp, 1997). Badania wskazują, że te ostatnie, jako najbardziej wydajne komórki prezentujące antygen, są w stanie endocytować amyloid nawet w jego zagregowanej formie (Schmitt T. L. i wsp, 1997). Endocytoza amyloidu przez komórki prezentujące antygen, jego przetwarzanie i konstytutywna prezentacja w kontekście kompleksu MHC jest pierwszym potencjalnym krokiem prowadzącym do uruchomienia immunologicznej odpowiedzi zarówno komórkowej jak i humoralnej. Przetworzony β -amyloid staje się potencjalnym antygenem, który jest w stanie stymulować odpowiedź immunologiczną (Rycina 3).

1.2.1 Rola limfocytów T w patogenezie choroby Alzheimera

Według obecnej wiedzy na temat choroby Alzheimera, istotnym elementem jej patogenezы jest stan zapalny. Początkowe stadium zapalenia związane jest z akumulacją β -amyloidu i aktywacją komórek mikrogleju, astrocytów jak również aktywacją białek dopełniacza i zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych (Finch C. E. i wsp, 2007). Wiele badań sugeruje, że źródłem odpowiedzi zapalnej mogą być nie tylko komórki centralnego układu nerwowego (mikroglej), ale również komórki wchodzące w skład krążenia obwodowego, jakimi są limfocyty T.

Badania przeprowadzone w ciągu kilku ostatnich lat wykazują, że komórki T często wkraczają na obszar mózgu, pomimo wcześniej opisywanego statusu tego organu jako 'chronionego' przed układem immunologicznym (Togo T. i wsp. 2002). Możliwe, że na skutek uszkodzeń bariery krew-mózg lub w odpowiedzi na sygnały pochodzące z komórek uczestniczących w procesie zapalnym w mózgu (oba te zjawiska są typowe w patogenezie AD) limfocyty T penetrują tkankę mózgu w miejscach agregacji β -amyloidu i akumulują się w tym obszarze w przeciwieństwie tkanki mózgu osób zdrowych.

Innym potencjalnym miejscem kontaktu limfocytów T z β -amyloidem są naczynia krwionośne, gdzie amyloid może być nie tylko gromadzony (środkowa warstwa naczyń krwionośnych oraz cytoplazma komórek mięśni gładkich naczyń), ale też produkowany przez komórki mięśniówki naczyń krwionośnych (Wiśniewski H. M. i wsp, 1995, Frąckowiak J. i wsp, 1995) oraz płytki krwi (Casoli T. i wsp, 2007). Wielokrotnie potwierdzona została również obecność β -amyloidu w postaci formy rozpuszczalnej w surowicy krwi (Irizarry M C. i wsp. 2004, Seubert P. i wsp. 1992).

Kluczowe pytanie dotyczy roli komórek T i tego czy istnieje odpowiedź na β -amyloid z ich strony, a jeżeli tak to czy może ona przyczyniać się do patomechanizmu AD. Udowodniono, że fenotyp obwodowych limfocytów T u pacjentów z AD ulega zmianie z CD45RA na CD45RO w stosunku do grupy osób zdrowych lub tych z inną formą demencji (Tan i wsp, 2002a), co ma związek z ich transformacją w kierunku komórek aktywowanych. Wyniki te potwierdzono, udowadniając, że izolowane limfocyty T osób z AD, umieszczone w hodowli komórkowej i poddane stymulacji antyCD3, wykazują zwiększoną ekspresję CD45RO w stosunku do komórek osób zdrowych (Lombardi i wsp, 2004). Co interesujące, wykazano również obecność

komórek CD45RO+ w mózгах osób z AD (Togo i wsp., 2002). Inne badania, w których dokonano immunofenotypizacji limfocytów T od pacjentów z AD i zdrowych kontroli w podobnym wieku mówią o wzroście liczby komórek CD4+CD25+ w grupie osób chorych. (Lombardi i wsp, 1999).

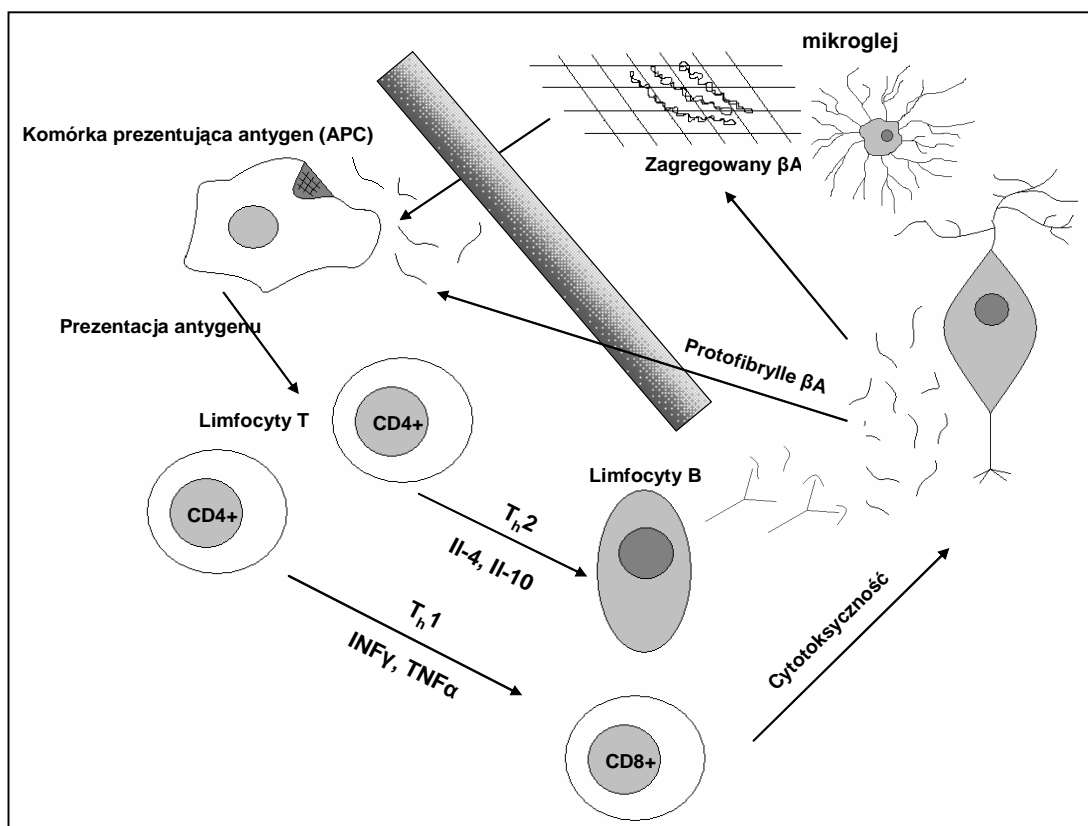
Dodatkowy dowód na systemową aktywację limfocytów T w chorobie Alzheimera pochodzi z badań zaprojektowanych w celu zmierzenia poziomu autoprzeciwciał skierowanych przeciwko β -amyloidowi lub $A\beta$ reaktywnych limfocytów T u osób z AD i zdrowych. Choć za produkcję przeciwciał odpowiadają limfocyty B, to w całej kaskadzie zdarzeń prowadzącej do ich powstania czynnie uczestniczą limfocyty T. Przynajmniej w trzech badaniach wykazano czterokrotnie zwiększoną ilość krążących autoprzeciwciał u pacjentów z klinicznie zdiagnozowanym otępieniem w stosunku do kontroli (Nath A. i wsp. 2003; Gruden M. i wsp. 2004; Mruthinti S. i wsp. 2004).

Istnieją przesłanki pozwalające przypuszczać, że odpowiedź limfocytów T osób chorych z AD na stymulację jest zmieniona w porównaniu z grupą osób zdrowych. Taki stan rzeczy może się wiązać z wstępnie zmienioną reaktywności tych komórek, co potwierdzono obecnością na ich powierzchni antygenów wskazujących na aktywację. Fenotyp o znamionach aktywacji może się wiązać z dostępnością β -amyloidu, który mógłby potencjalnie działać jako antygen.

W ostatnich latach, przy pomocy specjalnie opracowanego systemu do wykrywania autoreaktywnych komórek T oraz z użyciem różnej długości peptydów β -amyloidu do stymulacji (włącznie z $A\beta_{1-42}$) wykazano, że krążące limfocyty T reagujące przeciwko β -amyloidowi są obecne we krwi a ich liczba rośnie wraz z wiekiem (Monsongo A. i wsp, 2003). Co ciekawe, ogólnie stwierdza się obniżoną reaktywność limfocytów T wraz z wiekiem (Linton P. J. i wsp, 1996), choć w przypadku β -amyloidu to właśnie reakcja ludzi starszych jest wzmożona w porównaniu z grupą osób młodych. Chociaż rodowód tych autoreaktywnych komórek nie jest jasny, możliwe, że nie ulegają one negatywnej selekcji na etapie edukacji w grasicy, tak jak się dzieje z wieloma rodzajami autoreaktywnych komórek, co udowodniono w wielu badaniach (Peterson D. A. i wsp. 1999).

Trudniej jest wyjaśnić jak limfocyty T mogłyby uczestniczyć w patomechanizmie AD nie wkraczając do centralnego układu nerwowego (CUN). Jedną z możliwości jest taka, że komórki T wydzielają cytokiny, takie jak $INF\gamma$ i że to te prozapalne cytokiny przenikają do CUN i aktywują komórki mikrogleju i astrocyty.

Inną hipotezą jest, że limfocyty T aktywowane obwodowo powodują aktywację komórek mieloidalnych takich jak monocyty, makrofagi czy komórki dendrytyczne, które potem wydzielają cytokiny prozapalne takie jak TNF- α , interleukina IL-1 β i IL-6. Istnieją doniesienia mówiące o podniesionym poziomie IL-6 wydzielanej przez monocyty pochodzące od chorych z AD (Shalit F. i wsp. 1994, Huberman M. i wsp. 1995). Cytokiny te mogą powodować proces zapalny CUN i glikolizę po przekroczeniu bariery krew – mózg, a co za tym idzie powodować zwiększoną odpowiedź zapalną na złogi A β (na przykład pobudzać odpowiedź immunologiczną ze strony komórek mikrogleju). Pozostaje natomiast szereg pytań dotyczących tego, które populacje komórek T ulegają aktywacji i na jakim etapie choroby pojawia się ta aktywacja, czy aktywacja limfocytów T jest specyficzna tylko dla A β i czy zmiany te są częścią etiologii choroby Alzheimerera czy tylko znamionami uszkodzeń CUN.



Rycina 3. Proponowany schemat komórkowej odpowiedzi immunologicznej na peptyd β -amyloidu (według Grubeck-Loebenstein B. i wsp., 1998, zmodyfikowano)

W związku z postulowaną przez niektórych badaczy rolą β -amyloidu stanowiącego swoisty antygen dla komórek układu immunologicznego, zaczęto badać jego wpływ na potencjał proliferacyjny m. in. limfocytów T.

Do chwili obecnej pojawiło się zaledwie kilka doniesień na temat tempa proliferacji limfocytów T w odpowiedzi na β -amyloidy u pacjentów z chorobą Alzheimera. Wszystkie te dane zostały uzyskane metodą inkorporacji radioaktywnie znakowanej tymidyny i późniejszym pomiarem emisji promieniowania, lecz pozostają one w znaczącej sprzeczności wobec siebie i nie przynoszą jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy limfocyty osób z chorobą Alzheimera oraz osób zdrowych reagują na obecność β -amyloidu jako potencjalnego stymulatora, a jeżeli tak to czy ta odpowiedź jest różna u osób chorych w porównaniu z grupą zdrowych w podeszłym wieku..

Cześć prac donosi o porównywalnej odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów T u osób chorych oraz osób zdrowych w podeszłym wieku na stymulację amyloidem 1-42 (Salveti M. i wsp, 2003), podczas gdy inne mówią o braku odpowiedzi ze strony limfocytów T, choć te zostały one przeprowadzone z użyciem innego amyloidu o długości 1-40 (Trannoy E i wsp., 2004). Istnieją doniesienia, których autorzy twierdzą, że jedynie limfocyty osób zdrowych, zarówno młodych jak i starszych, reagują na amyloid, natomiast komórki chorych z AD nie wykazują takiej reakcji (Grubeck-Loebenstein B. i wsp, 1996). W zdecydowanej sprzeczności wobec powyższych danych są doniesienia wnioskujące o zwiększonej liczbie podziałów limfocytów T u osób starszych oraz u osób z AD w porównaniu z grupą młodych zdrowych (Monsoego A. i wsp, 2003).

Wyżej wymienione źródła, ze względu na metodologię badań proliferacji komórek, badają całą populację limfocytów T, nie ma natomiast żadnych danych, które mówiłyby o wpływie β -amyloidu na poszczególne subpopulacje tych komórek takie jak CD4+ czy CD8+. Od czasu cytowanych prac pojawiły się techniki pozwalające na śledzenie fenotypu komórek jednocześnie z obserwacją tempa proliferacji poszczególnych populacji, jednak nie ma żadnych prac, które koncentrowałyby się na wpływie β -amyloidu na poszczególne grupy limfocytów T.

Oprócz wątpliwości dotyczących potencjału proliferacyjnego związanego z niespecyficzną w przypadku choroby Alzheimera stymulacją antygenami, jakim jest na przykład LPS, brakuje również jednoznacznych danych dotyczących specyfiki reakcji tych komórek na peptydy β -amyloidów będących składnikami patologicznych struktur

leżących u podstaw etiologii tej choroby, natomiast te, które pojawiły się w literaturze pozostają sprzeczne.

Ciekawe więc ze względu na niejednoznaczne wcześniejsze doniesienia wydaje się zbadanie zarówno ogólnej reaktywności komórek T osób z AD na niespecyficzne stymulanty jak również ich analiza dotycząca reakcji na charakterystyczne dla choroby peptydy β -amyloidów.

1.2.2 Limfocyty T w immunoterapii choroby Alzheimera

W ostatnich latach głównym wyzwaniem i celem terapeutycznym w leczeniu choroby Alzheimera stała się redukcja poziomu β -amyloidu w mózgach osób chorych, z użyciem szczepionki. Badania przeprowadzone na myszach dostarczyły dowodów, że użycie β -amyloidu jako antygeny i zaangażowanie układu immunologicznego do eliminacji β -amyloidu powoduje obniżenie akumulacji złogów w mózgu jak również zahamowanie upośledzenia zdolności poznawczych, a co za tym idzie, postępu choroby (Schenk D. i wsp. 1999, Janus C. i wsp. 2000, Morgan D. i wsp. 2000). Sukcesy osiągnięte podczas badań na myszach zachęciły do przeprowadzenia prób klinicznych na grupie osób z AD w postaci szczepień syntetycznym peptydem A β 1-42, co miało spowodować stymulację układu immunologicznego do produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko β -amyloidowi. Próby zostały wstrzymane w momencie, gdy u kilkunastu chorych stwierdzono powikłania w postaci aseptycznego zapalenia opon mózgowych i mózgu. Nadzieje na skonstruowanie skutecznej szczepionki nie zostały jednak porzucone, a badania trwają nadal na zwierzętach transgenicznym. Istnieją uzasadnione podejrzenia, że taka konsekwencja pojawiła się w związku z reakcją układu immunologicznego i napływających limfocytów T (Pfeifer M. i wsp., 2002). W pośmiertnych badaniach skrawków tkankowych mózgu jednego z pacjentów zmarłych w wyniku podania szczepionki, stwierdzono znaczną redukcję płytek starczych w częściach kory nowej (neocortex) przypisywaną aktywności immunologicznej skierowanej przeciwko β -amyloidowi (Nicoll J. i wsp., 2003). Takie wyniki sugerują, że odpowiedź immunologiczna będąca wynikiem podania szczepionki, powoduje 'usuwanie' złogów amyloidowych przez komórki mikrogleju, w którym to procesie dochodzi do aktywacji napływających później limfocytów T. Wyniki te udowadniają jak szkodliwa może być odpowiedź układu immunologicznego w przypadku zbyt

silnego wzbudzenia, do którego zwykle nie dochodzi w AD, a w którym w tym przypadku pośredniczą aktywowane obwodowo limfocyty T. Te wyniki wydają się sugerować, że β -amyloid jest samoistnym stymulatorem odpowiedzi immunologicznej także u ludzi.

Pomimo rozlicznych badań, mechanizm odpowiedzi układu immunologicznego, a zwłaszcza limfocytów T na β -amyloid funkcjonujący jako potencjalny antygen nie jest jeszcze poznany. Pytanie to jest dodatkowo istotne w kontekście badań, które mówią, że β -amyloid może być zlokalizowany nie tylko w obrębie samego układu nerwowego, ale także naczyń krwionośnych w mózгах osób chorych (Wisniewski T. i wsp, 1994), skąd potencjalnie może być przenoszony do krwioobiegu i tam mieć kontakt z komórkami układu odpornościowego. Z drugiej strony udowodniono, że limfocyty T mogą się pojawiać na terenie tkanki mózgowej osób z AD, co stwierdzono podczas badań post mortal (Togo T. i wsp, 2002). Co więcej limfocyty T, których obecność wykazano na terenie tkanki mózgowej pacjentów z AD wykazują fenotyp powierzchniowy, który świadczy o ich aktywacji.

Podsumowując badania nad konsekwencjami podania szczepionki w postaci peptydu β -amyloidu pacjentom z AD, fakt, że u jednych pacjentów pojawia się silna odpowiedź zapalna, podczas gdy inni nie wykazują takiej reakcji, pozostaje zagadkowy a podstawy tego procesu niezrozumiałe.

1.2.3 Rola odpowiedzi zapalnej i cytokin w patogenezie choroby Alzheimera

Pośród różnych czynników zaangażowanych w patogenezę AD wiele faktów potwierdza hipotezę o udziale odpowiedzi zapalnej przyczyniającej się do zmian neurodegeneracyjnych (Tuppo E. E. i wsp, 2005). Znaczenie odczynu zapalnego potwierdzają badania epidemiologiczne stwierdzające pozytywny wpływ stosowania leków przeciwzapalnych, które spowalniają postęp choroby (McGeer i McGeer 1999).

Cytokiny należą do białek kontrolujących proces zapalny i wpływają na wzrost, proliferację i pobudzenie komórek biorących udział w odpowiedzi odpornościowej. Oprócz komórek układu nerwowego, takich jak komórki mikrogleju i astrocyty, do produkcji cytokin w patogenezie choroby Alzheimera w znacznym stopniu przyczyniają się limfocyty T (Beloosesky Y. i wsp., 2002, Sala G. i wsp., 2003). Udowodniono, że

komórki mikrogleju w obecności β -amyloidu produkują cytokiny prozapalne takie jak IL-1 β , IL-6 oraz TNF α (Rogers J. i Lue L. F., 2001), natomiast w przypadku limfocytów T udowodniono podwyższoną produkcję cytokin prozapalnych takich jak IL-6 czy TNF.

Dane z ostatnich lat, koncentrujące się na badaniu różnic w poziomie cytokin, nie tylko w płynie mózgowo rdzeniowym (CSF – cerebrospinal fluid), ale również w krwi obwodowej, potwierdzają różnice między pacjentami z AD a grupą kontrolną w podeszłym wieku, jednak doniesienia na ten temat pozostają niespójne. Podobnie doniesienia dotyczące poziomu cytokin prozapalnych w supernatantach hodowli komórek krwi obwodowej stymulowanych przy pomocy różnych mitogenów, pozostają ze sobą sprzeczne. W badaniu, w którym używano fitohematglutyniny (PHA – phytohemagglutinin) jako stymulanta mówi się o podwyższonej produkcji IL-2 i interferonu gamma (INF γ) u chorych z AD (Huberman H. i wsp., 1994). Wyniki te potwierdzają badania, w których do stymulacji używano lipopolisacharydu (LPS – lipopolysaccharide) stwierdzające, że poziom IL-1beta, IL-6 i TNF α oraz IL-10 jest znacząco wyższy u chorych (Lombardi V. R. i wsp., 1999). Badania, które stawiały sobie za cel weryfikację wcześniejszych wyników podsumowują, że komórki jednojądrzaste krwi obwodowej stymulowane za pomocą LPS u osób chorych z AD wykazują obniżony poziom produkcji IL-1beta, IL-6 i TNF α u chorych w porównaniu z grupą kontrolną, odwrotnie proporcjonalny do zaawansowania choroby. Obecny stan wiedzy nie daje możliwości jednoznacznego spojrzenia na problem zmian w produkcji poszczególnych cytokin w związku ze znacznymi rozbieżnościami w wynikach.

Inne badania koncentrują się na polaryzacji limfocytów T i produkcji cytokin w kierunku odpowiedzi typu Th1 bądź Th2. Limfocyty Th1 produkujące INF γ , IL-2 i TNF α uruchamiają proces zapalny i wywołują odpowiedź komórkową konieczną do walki z patogenami takimi jak bakterie i wirusy. Natomiast komórki typu Th2 produkują cytokiny: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 i IL-13 i aktywują produkcję przeciwciał. (Romagnani , 2000). Istnieją prace mówiące o zwiększonej odpowiedzi typu Th2 i obniżonej Th1 w wyniku immunizacji A β 1-42 (Town T. i wsp., 2002, Ghochikyan A. i wsp., 2005). Odkrycie to jest zgodne z oczekiwaniami dotyczącymi odpowiedzi limfocytów T na immunizację A β i wywołaniem za pomocą tej interwencji produkcji skierowanych przeciwko niemu przeciwciał.

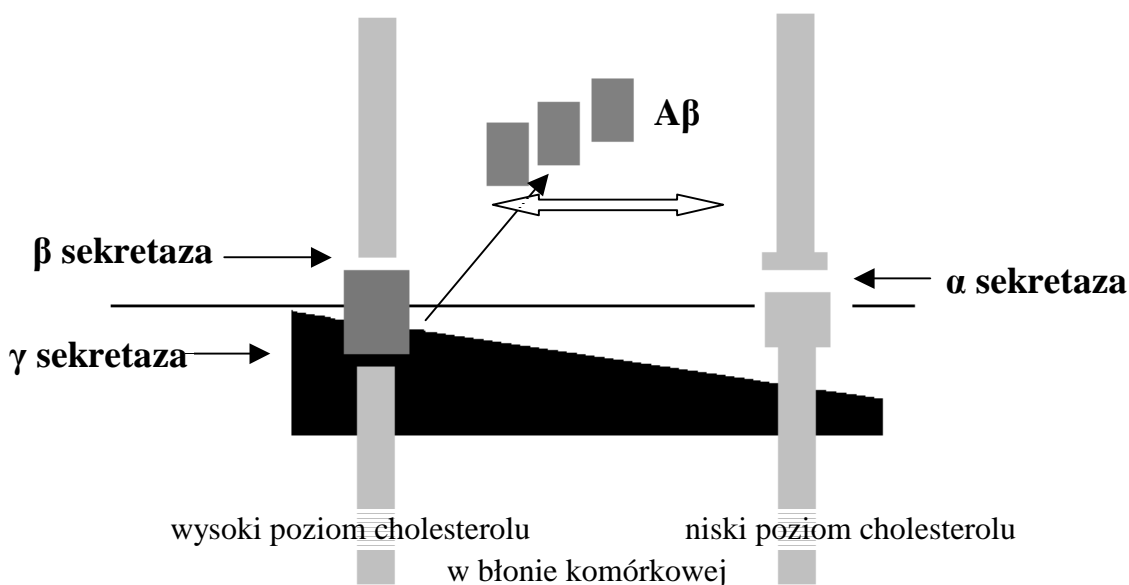
Wiadomo, że reakcja zapalna jest jednym ze składników obrazu choroby Alzheimerera jak również, że nasilenie tej reakcji następuje w wyniku podania peptydu

β -amyloidu jako składnika szczepionki i antygeny dla komórek T. Dane dotyczące mechanizmu reakcji zapalnej będącej wynikiem kontaktu komórek układu immunologicznego z tym antygenem są jednak skąpe, a samo zjawisko pozostaje niewyjaśnione. Warto zbadania wydaje się profil produkcji cytokin przeciw i prozapalnych produkowanych przez limfocyty w konsekwencji stymulacji β -amyloidami i jego korelacja z tempem proliferacji limfocytów oraz z samym zaawansowaniem choroby.

1.3 Rola cholesterolu w patogenezie choroby Alzheimera

Badania epidemiologiczne sugerują, że podwyższony poziom całkowitego cholesterolu w surowicy krwi może być czynnikiem ryzyka w zachorowalności na AD i łagodne zaburzenia poznawcze (MCI – mild cognitive impairment) (Kivielto M. i wsp., 2001). Uważa się, że cholesterol produkowany w mózgu jest przetwarzany do 24-hydroksycholesterolu, który może dyfundować przez barierę krew-mózg do krążenia obwodowego, co jest jedynym mechanizmem jego wymiany, jako, że usuwanie cholesterolu nie jest dokonywane przez lipoproteiny. Istotnym jest, że poziom 24-hydroksycholesterolu w płynie mózgowo-rdzeniowym jest podwyższony we wczesnych stadiach otępienia (Papassoritopopulos A. i wsp., 2002), a leczenie statynami powoduje, że jego poziom obniża się u pacjentów z AD z czym koreluje poprawa zdolności poznawczych potwierdzona zwiększeniem liczby punktów w teście MMSE (Vega G.L. i wsp., 2003).

Udowodniono, że cholesterol ma szczególne znaczenie w regulacji metabolizmu białka APP przez α - i β - sekretazy (Simons M. i wsp., 2001; Simons K. i wsp. 2002).



Rycina 4 Model obrazujący rozdzielność miejsca działania α i β sekretazy oraz związek tych enzymów z niskim bądź wysokim poziomem cholesterolu (na podstawie Simons M., 2001)

W neuronach niewielka, około 5% frakcja APP przetwarzana jest do β -amyloidu, podczas gdy większość przetwarzana jest z uczestnictwem α sekretazy i wytwarzany jest sekrecyjny fragment α APP. Kilka badań wykazało że APP w neuronach związane jest z trawkami lipidowymi (Simons M. i wsp., 1998; Lee S. J. i wsp., 1998; Bouilliot C. i wsp., 1996). Obecnie uważa się, że przetwarzanie białka APP prowadzące do produkcji β -amyloidu dokonuje się w obrębie tratek błonowych, podczas gdy ścieżka prowadząca do produkcji formy rozpuszczalnej (cięcie przez α sekretazę) ma miejsce poza trawkami (Rycina 4). Jest to konsekwencją lokalizacji APP, które jedynie w niewielkim procencie znajduje się w obrębie struktur tratek błonowych (Simons M., 1998). Ta rozdzielność pod względem miejsca działania tłumaczy również dlaczego dochodzi albo do cięcia enzymatycznego przez α bądź β sekterazę, a nigdy do wspólnego działania tych enzymów.

Co więcej potwierdzono dodatnią korelację pomiędzy poziomem całkowitego cholesterolu i cholesterolu LDL w surowicy a ilością β -amyloidu w mózgach chorych z AD (Kuo Y. M. i wsp., 1998). Sądzi się, że podwyższony poziom cholesterolu w wieku średnim powoduje zwiększone ryzyko zachorowania na AD w późniejszych latach (Kivipelto, M. i wsp. 2001).

Intrygującą więc kwestią pozostaje udział hipercholesterolemii w patogenezie choroby Alzheimera oraz pytanie czy poziom cholesterolu w osoczu krwi, może mieć związek ze zmienioną reaktywnością komórek T u osób z chorobą Alzheimera.

1.3.1 Tratewki błonowe a zaburzenia funkcjonalności komórek układu immunologicznego

Tratewki błonowe mają szczególne znaczenie w funkcjonowaniu limfocytów T i innych komórek układu immunologicznego.

Rozpoczęcie sygnałowania i jego propagacja w limfocycie T rozpoczyna się od ligacji receptora TCR, który to będąc w kompleksie z CD3 jest elementem rozpoznającym obcy peptyd prezentowany przez komórkę APC. Dochodzi do sygnalizacji przez białka z rodziny SRC, LCK oraz FYN, które następnie fosforylują elementy podjednostek TCR tzw. ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation motifs). To natomiast powoduje zbliżenie kinaz z rodziny SYK, ZAP-70 do fosforylowanego receptora i sprzyja ich aktywacji.

Wzbudzenie aktywności kinaz PTK ma swoje rozliczne konsekwencje w postaci aktywacji fosfolipazy C (PLC)- γ 1, która katalizuje przemianę PIP₃ (1,4,5-trójfosforan inozytolu) do trójfosforanu inozytolu (IP₃) oraz diacyloglicerolu (DAG), co w konsekwencji powoduje wzrost wewnątrzkomórkowej puli jonów wapnia Ca²⁺ i aktywację kinazy białkowej kinazy C (PKC). Ta kaskada enzymatyczna powoduje aktywację białek z rodziny Ras, które z kolei pośredniczą w uruchomieniu ścieżki kinaz ERK MAP. W końcowym etapie tej drogi dochodzi do transkrypcji genów, które powodują wejście limfocyty w cykl komórkowy, w którym to pośredniczy czynnik wzrostu nowotworów T (TGF) oraz inteleukinę 2.

Szereg białek będących niezbędnymi elementami aktywacji komórek T znajduje się właśnie w obrębie tratewek błonowych. Wśród nich są kinaza LCK, niezbędna w procesie różnicowania i proliferacji limfocyty T, błonowe białko adaptorowe (LAT-linker for activation of T cells) i inne. Nie trudno więc sobie wyobrazić, że jeżeli dojdzie do zaburzenia struktur gromadzących kluczowe enzymy pośredniczące w inicjacji sygnałowania, może to mieć swoje konsekwencje w postaci upośledzonej funkcjonalności limfocytów T. Wiadomo, że dzieje się tak w przypadku obniżenia jak również podwyższenia zawartości cholesterolu jako składowej tratewek błonowych, co ma związek z zaburzeniami we inicjacji sygnału w limfocycie T (Fulop T. i wsp., 2004).

1.3.2 Tratewki błonowe i ich potencjalna rola w patogenezie AD

Wszystkie wspomniane badania wykazują, że podwyższone stężenie cholesterolu wewnątrz neuronów ma znaczenie w powstawaniu złogów β -amyloidu. Choć nadal nie ma jednoznacznej odpowiedzi jaki jest mechanizm tej regulacji, postuluje się, że ze zwiększoną produkcją β -amyloidu są związane tratewki błonowe (lipid rafts).

Tratewki błonowe składają i ze sfingolipidów i cholesterolu zlokalizowanego w błonie komórkowej (Simons K. i D. Toomre, 2000). Tworzą one zorganizowane skupiska, które 'pływają' w matrix błony komórkowej i są odpowiedzialne za odbywanie się procesów w błonie komórkowej jedynie w jej określonych regionach.

W obrębie tratewek błonowych znajdują się białka sygnalizacyjne (Dopico A. M. i Tigyi G. J., 2007). Taka lokalizacja czynników sygnalizacyjnych pozwala odseparować jedne ścieżki sygnalizacyjne od innych.

Zarówno β jak i γ sekretazy są obecne w obrębie tratewek błonowych, a przetwarzanie białka APP jest zależne od komórkowego poziomu cholesterolu. Udowodniono, że obniżenie poziomu cholesterolu komórkowego blokuje powstawanie $A\beta$ generowanego przez komórki linii N2a (Simons K. i wsp., 2003). Mechanizm tego zjawiska próbuje się wyjaśnić lokalizacją zarówno APP jak i β sekretazy w obrębie tratewek błonowych, gdzie jak się postuluje, zachodzi samo tworzenie β -amyloidu, tak więc zjawisko to zależy od integralności tych struktur.

Nie ma żadnych doniesień dotyczących wpływu podwyższonego poziomu cholesterolu, jaki odnotowuje się w surowicy chorych z AD, na zmianę reaktywności limfocytów T, którą udowodniono w szeregu prac. Stąd też ciekawym wydaje się zbadanie zależności pomiędzy podwyższonym poziomem cholesterolu w surowicy krwi a ewentualnymi zmianami tempa proliferacji limfocytów T czy też ich poziomu aktywacji.

2. CELE PRACY

Próba odpowiedzi na pytanie o udział limfocytów T w patomechanizmie choroby Alzheimera poprzez badanie odpowiedzi proliferacyjnej komórek CD4+ na peptydy β -amyloidów w grupie osób z AD i grupie osób zdrowych.

1. Porównanie różnic fenotypowych limfocytów *in vivo*, z krwi pełnej pacjentów AD i osób z grupy kontrolnej.
2. Analiza aktywności proliferacyjnej limfocytów CD4+ w zależności od stymulacji przeciwciałem antyCD3 i antyCD28 oraz peptydami A β 1-42, 1-40 i 25-35 w grupie pacjentów z chorobą Alzheimera i grupie osób zdrowych w podeszłym wieku.
Określenie charakterystyki fenotypowej limfocytów hodowanych z wyszczególnionymi stymulatorami.
3. Analiza poziomu interleukin IL-2, IL-4, IL-10, IL-6 oraz TNF i INF w surowicach oraz supernatantach po hodowli poddanej stymulacji przeciwciałem antyCD3 oraz peptydem amyloidu w grupie osób z AD i grupie kontrolnej.
4. Próba korelacji obserwowanych zmian w aktywności proliferacyjnej limfocytów CD4+ z parametrami wyszczególnionymi w profilu lipidowym.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Charakterystyka badanych grup

Źródłem badanych limfocytów była krew pełna bądź populacja komórek PBMC (peripheral blood mononuclear cells) izolowanych

- a) z krwi obwodowej **pacjentów z chorobą Alzheimera** ,
grupa 32 osób, w tym 23 kobiety i 9 mężczyzn
(średnia wieku : 74 lata \pm 10)
- b) z krwi obwodowej **osób zdrowych w podeszłym wieku**,
grupa 28 osób, w tym 22 kobiety i 6 mężczyzn
(średnia wieku : 67 \pm 7)

W ramach oceny stanu klinicznego w grupie osób zdrowych i pacjentów z AD wykonano podstawowe badania hematologiczne (morfologia krwi).

a) Osoby z chorobą Alzheimera (pacjenci Kliniki Psychiatrii Rozwojowej, Zaburzeń Psychotycznych i Wieku Podeszłego oraz Kliniki Chorób Psychiczych i Zaburzeń Nerwicowych Akademii Medycznej w Gdańsku) diagnozowane były według kryteriów ICD-10 i znalazły się w kategorii F00.0 (otępienie Alzheimera z wczesnym początkiem) lub F00.1 (otępienie Alzheimera z późnym początkiem) (Kraków – Warszawa 2000 wyd. II. ICD-10. Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych. Rewizja dziesiąta. Klasyfikacja zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania w ICD-10. Opisy kliniczne i wskazówki diagnostyczne.).

Badani byli pacjentami Kliniki Psychiatrii Rozwojowej, Zaburzeń Psychotycznych i Wieku Podeszłego oraz Kliniki Chorób Psychiczych i Zaburzeń Nerwicowych Akademii Medycznej w Gdańsku bądź też w przypadku lżejszych stanów pochodzili z przychodni przyszpitalnych.

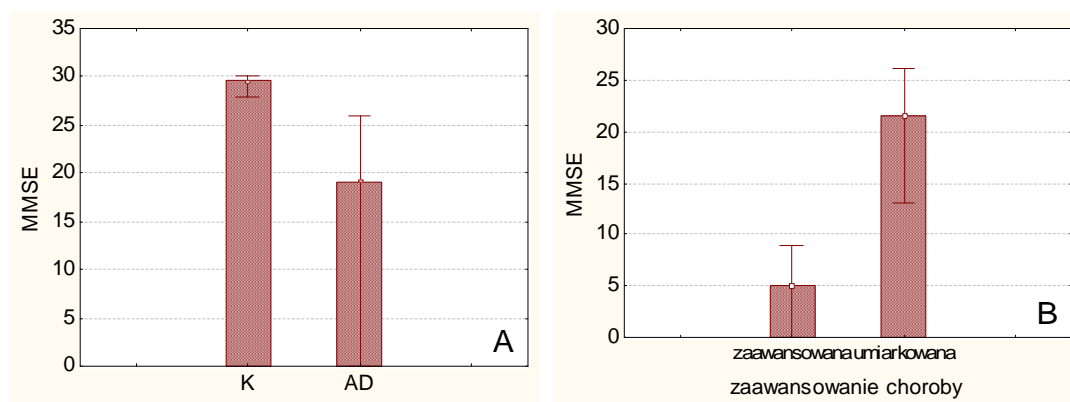
U wszystkich pacjentów wykonane zostało badanie obrazowe w postaci tomografii komputerowej głowy, co potwierdziło rozpoznanie. U wszystkich pacjentów przeprowadzono test MMSE w celu oceny zaawansowania choroby.

Autorka dziękuje lekarzom obu Klinik Psychiatrii Akademii Medycznej, a w szczególności doktorowi Krzysztofowi Sołtysowi oraz doktor Iwonie Trzebiatowskiej, za diagnostykę pacjentów z AD oraz udostępnienie charakterystyki klinicznej badanych osób.

b) Osoby zdrowe zostały wyselekcjonowane po wcześniejszym wywiadzie lekarskim wykluczającym te z chorobami autoimmunologicznymi, wykazujące cechy ostrego procesu zapalnego, trwającej infekcji, chorujące na cukrzycę i inne choroby układu dokrewnego, a także na nowotwory i/lub choroby przewlekłe układu krążenia, oddechowego i wydalniczego, bądź zażywające leki mogące wpływać na wyniki badań. W wywiadzie korzystano z wytycznych SENIEUR Protocol (Müller-Hermelink H.K. i wsp., 1984). Wśród wszystkich wolontariuszy przeprowadzono szczegółowy wywiad lekarski, wykonano test MMSE (Mini Mental State Examination), który umożliwia ocenę kilku wymiarów aktywności poznawczej (Lighthart G. J. i wsp., 1995) oraz test rysowania zegara, umożliwiający ocenę procesów wzrokowo – przestrzennych, apraksji konstruktywnej, zdolności planowania oraz myślenia abstrakcyjnego w celu wykluczenia osób z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi czy też potencjalnym początkiem choroby Alzheimera (Birge S.J. i wsp., 1993). Wszystkie przebadane osoby uzyskały wynik w teście MMSE powyżej 28 przy maksymalnej wartości testu 30 oraz prawidłowo wykonały test rysowania zegara.

Podziękowania swoje kieruje dla dr Anny Limon-Sztencer, pracującej w Klinice Psychiatrii Rozwojowej, Zaburzeń Psychotycznych i Wieku Podeszłego, która zajmowała się wykonaniem wyżej wyszczególnionych testów

Przeprowadzone wśród obu badanych grup testy MMSE pozwoliły potwierdzić brak zaburzeń poznawczych u osób stanowiących kontrolę oraz scharakteryzować osoby z chorobą Alzheimera pod względem zaawansowania choroby (Rys. 1).



Rys. 1 Wysoce znamienne różnice ($p < 0,01$) w liczbie punktów w teście MMSE pomiędzy grupą osób z AD a grupą kontrolną osób zdrowych (A) oraz podział pacjentów z AD pod względem zaawansowania choroby (B) (wykresy przedstawiają wartości mediany, wąsy wyznaczają wartość Max i Min, $N_K=28$; $N_{AD}=35$).

3.2 Ocena lipidogramu

Zbadano poziom cholesterolu z wyszczególnieniem HDL i LDL oraz poziom trójglicerydów w osoczu krwi.

Lipidogram wykonano według standardowych procedur z użyciem zestawu „Liquick Cor – CHOL 120” firmy CORMAY

Cholesterol LDL wyliczano ze wzoru Friedewalda ($LDL-CH = CH - HDL-CH - 1/5TG$).

3.3 Oznaczanie subpopulacji limfocytów z krwi pełnej

W obu grupach oznaczano fenotyp w komórkach spoczynkowych (*ex vivo*) pacjentów z chorobą Alzheimera oraz osób z grupy kontrolnej w porównywalnym wieku. W krwi określano procentową zawartość poszczególnych populacji komórek w puli wszystkich limfocytów. Badano populację limfocytów CD4+ i CD8+ z wyszczególnieniem populacji pozytywnych i negatywnych pod względem występowania antygenu CD28 na tych komórkach.

Określano odsetek komórek CD4+, na których powierzchni wykryto antygeny świadczące o ich aktywacji: HLA-DR, CD25, CD69 oraz CD95.

W pełnej krwi, pobranej do jałowych probówek z EDTA, oznaczano skład procentowy subpopulacji limfocytów T oraz zmiany ekspresji antygenów metodą cytometryczną, przy użyciu odpowiednich przeciwciał (FITC anti-CD3 (DAKO Cytomation, Dania), PE-Cy5 anti-CD4 (DAKO Cytomation, Dania), PE-Cy5 anti-CD8 (DAKO Cytomation, Dania), PE anti-CD28 (Becton Dickinson, USA), PE anti-CD25 (Becton Dickinson, USA), PE-anti-CD69 (Becton Dickinson, USA), PE-anti-CD95 (Becton Dickinson, USA), PE-anti-HLA-DR (Becton Dickinson, USA). Do 100µl krwi dodawano 5µl odpowiedniego przeciwciała i inkubowano 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. W celu zlizowania erytrocytów, do wyznakowanych komórek dodawano po 2ml roztworu lizującego (0,83% NH₄Cl, 0,1% KHCO₃) na 15 minut, a następnie komórki odwirowywano (wirowanie przy 2000 obr./min.) przez 5 minut (wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R) i przepłukiwano roztworem PBS. Komórki analizowano przy pomocy cytometru przepływowego FACScan (Becton Dickinson, USA).

Kontrolą izotypową stanowiła mieszanina sprzężonych z fluorochromami mysich immunoglobulin bez swoistości antygenowej (FITC/IgG1 + PE/IgG2a + PE-Cy5/IgG1, DAKO Cytomation, Dania).

3.4 Izolacja limfocytów z krwi pełnej

Krew pobierano na EDTA i przechowywano nie dłużej niż 2 godziny w temperaturze pokojowej. Krew rozcieńczano 2x buforem PBS i nakładano do próbek wirówkowych na warstwę HistopaqueTM 1077 (Sigma Chemical Co., USA), w proporcji 5: 1 (40ml krwi na 8 ml Histopaque), a następnie wirowano 30 minut, 2000 rpm. Komórki znajdujące się po wirowaniu pomiędzy warstwą Histopaque a osoczem, zbierano za pomocą pipety pasterowskiej, dwukrotnie przepłukiwano buforem PBS, a następnie liczone z użyciem kamery hematologicznej Burkera po czym zawieszano w kompletnym środowisku hodowlanym RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA) zawierającym 10% surowicy płodowej cielej (FCS, Sigma Chemical Co., USA), 2 mM L-glutaminy (Sigma Chemical Co., USA), 50 U/ml penicyliny oraz 50 µg/ml streptomycyny (Sigma Chemical Co., USA).

3.5 Ocena tempa proliferacji limfocytów

3.5.1 Zakładanie hodowli komórkowych

W celu oceny parametrów cyklu komórkowego stosowano metodę oceny proliferacji limfocytów z użyciem cytometrii przepływowej, określaną jako DCT (ang. dividing cell tracking) (Bryl E. 2004, Hasbold J., 1999). Barwnik fluoroescencyjny CFSE (ang. carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Sigma Chemical Co., USA) ma zdolność trwałego łączenia z wewnątrzkomórkowymi białkami cytoplazmatycznymi i ulega rozcieńczeniu w stosunku 1:2 przy każdym podziale komórkowym, co umożliwia w tej metodzie śledzenie podziałów komórkowych (Hasbold J., 1999) (Ryc.4). Przy równoczesnym śledzeniu fenotypu komórek, metoda ta pozwala na określenie liczby podziałów komórkowych, liczby komórek prekursorowych, czasu trwania pojedynczego cyklu komórkowego jak również czasu przejścia limfocytów T spoczynkowych z fazy G_0 do aktywnej fazy cyklu G_1 (Hasbold J., 1999).

Sterylnie, 24-dółkowe, hodowlane płytki plastikowe (Becton Dickinson, USA), pokrywano przeciwciałem anti-CD3 (BD Pharmingen USA, 1ng/1(ml) w stężeniu 1 μ g/ml i pozostawiano na 24 godziny w temperaturze 4⁰C w celu związania przeciwciała z powierzchnią plastiku (immobilizacji). Po tym czasie nadmiar przeciwciała usuwano, a dołki przepłukiwano zimnym buforem PBS. Tak przygotowane płytki były używane do hodowli PBMC.

Komórki PBMC nieznakowane lub znakowane CFSE (2 μ M) inkubowano przez 15 minut w ciemności i w temperaturze 37⁰C, a następnie zawieszano w kompletnym środowisku hodowlanym i przenoszono w ilości 2x10⁶ do dołków płytek hodowlanych uprzednio opłaszczonych przeciwciałem anti-CD3 (w stężeniu 1 μ g/ml) oraz do dołków nieopłaszczonych w których to komórki traktowane były jako niestymulowana kontrola.

Hodowane komórki były stymulowane za pomocą przeciwciał antiCD3 (125 ng/ml) lub mieszaniny antiCD3 i antiCD28 (62,5 ng/ml). Kontrolę stanowiły komórki nie poddane stymulacji, hodowane na tej samej płytce i w tych samych warunkach

(Rycina 2).

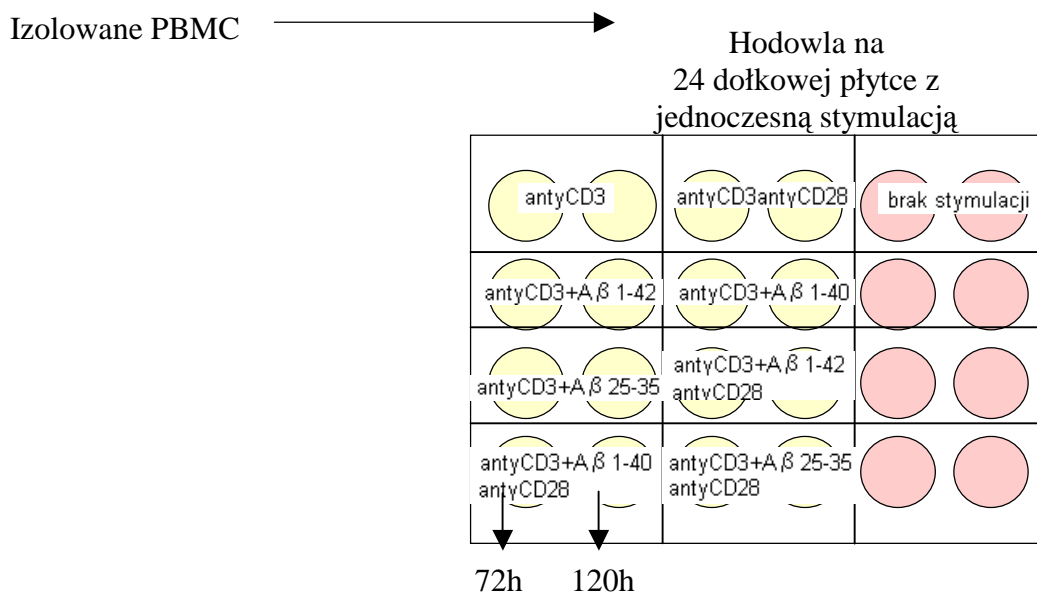
Komórki inkubowano w temperaturze 37⁰C, w atmosferze 5% CO₂ o 100% wilgotności. Całkowity czas hodowli to 120 godzin, a komórki pobierano z płytki po 72 i 120 godzinach, płukano, liczone, a następnie oceniano parametry cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej (DCT). Obliczenia dotyczące parametrów proliferacji na podstawie danych wykonywano programem „Progeny[®] 16.3” (autor J.M. Witkowski, AM Gdańsk, Bryl E., 2004). W celu odróżnienia populacji proliferujących limfocytów umożliwiającego ich dalszą analizę, po zakończeniu hodowli zawiesinę komórek znakowanych CFSE barwiono zewnątrzkomórkowo odpowiednimi kombinacjami przeciwciał PE-Cy5/anty-CD4 (DAKO Cytomation, Dania) PE/anty-CD28 (Becton Dickinson USA), PE-Cy5/anty-CD8 (DAKO Cytomation, Dania) i poddawano analizie cytometrycznej.

Dodatkowo komórki stymulowano peptydami β-amyloidu (1 ng/ml) w połączeniu z jednoczesną stymulacją antyCD3 i antyCD3antyCD28.

Użyte peptydy:

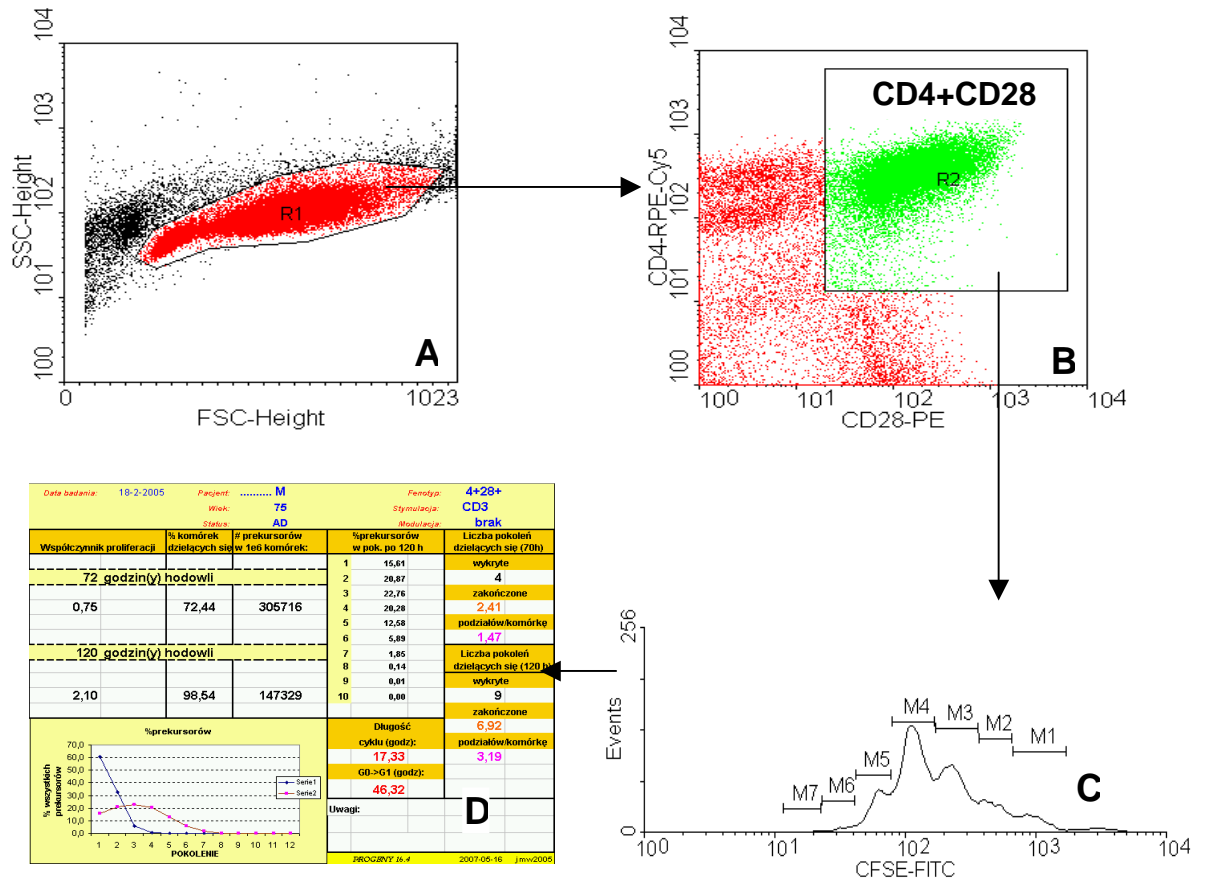
Aβ 1-42, 1-40 (Sigma Chemical Co., USA) – peptydy β-amyloidu

Aβ 25-35 (Sigma Chemical Co., USA) – peptyd stanowiący funkcjonalną domenę β-amyloidu, odpowiedzialny za efekt neurotroficzny i neurotoksyczny.



Rycina 2 Schemat ilustrujący schemat doświadczenia oraz wybrany model stymulacji komórek PBMC.

Po 72 oraz 120 godzinach komórki poddane hodowli pobierane z poszczególnych dołków były analizowane pod względem parametrów świadczących tempie proliferacji według schematu zilustrowanego na Rycinie 3.



Analiza parametrów cyklu komórkowego z użyciem programu Progeny 16.4jmw

Rycina 3. Do analizy parametrów cyklu komórkowego wybrano komórki o fenotypie CD4+CD28+, ze względu na centralne miejsce tych komórek w odpowiedzi komórkowej. Komórki, które miały być analizowane wybrankowano na wykresie typu dot plot (Rys.3A), a następnie wybrankowano komórki CD4+CD28+ (Rys. 3B). Po wykonaniu histogramu dla fluorescencji CFSE komórek CD4+CD28+ (Rys. 3C) dalszą prowadzono z użyciem programu Progeny (Rys. 3D).

3.5.2 Pomiary cytometryczne i analiza wyników

Dla każdej badanej próbki zbierano 20 tys. komórek używając oprogramowania CellQuest (BD, USA). Ekspresję powierzchniową antygenów badano metodą cytometrii przepływową używając cytometru FACScan (Becton Dickinson, USA).

Wyniki analizowano z użyciem programu komputerowego WinMDI w. 2.9. (J. Trotter, The Scripps Research Institute, USA).

3.6 Ocena poziomu cytokin typu Th1 i Th2

Poziom cytokin właściwych dla odpowiedzi typu Th1 oraz Th2 mierzono po 72 i 120 godzinach stymulacji za pomocą samego przeciwciała antyCD3 lub wspomnianego przeciwciała w kombinacji z peptydem A β 1-42 oraz w surowicy krwi z użyciem metody cytometrycznej CBA (cytometric bead array). Wybrany test pozwala zmierzyć stężenie IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF oraz INF- γ w wybranym płynie.

Test wykonano zgodnie z zaleceniami producenta zestawu (BDTM Human Th1/Th2 Cytokine Kit II; Becton Dickinson USA).

3.7 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu statystycznego Statistica wersja 7.1.(Stat Soft Inc., Tulsa, OK).

Dla wyników o rozkładzie normalnym użyto testów parametrycznych (test T-studenta), natomiast dla niespełniających założeń rozkładu normalnego użyto testów nieparametrycznych - test U Manna — Whitneya dla dwóch grup niezależnych oraz testu kolejności par Wilcoxon na porównaniu zmiennych zależnych.

Znamienności statystyczne przy porównaniu dwóch zmiennych niezależnych zaznaczono jako wartość p, natomiast przy porównaniach kilku zmiennych zależnych znamienności dla zachowania jasności obrazu zostały zaznaczona za pomocą gwiazdek (* p<0,05, ** p<0,001, *** p<0,0005).

4. WYNIKI

4.1 Zmiany fenotypowe limfocytów T pacjentów z chorobą Alzheimerą *ex vivo* w porównaniu z grupą osób zdrowych

W obu grupach oznaczano fenotyp limfocytów z krwi pełnej, w komórkach spoczynkowych (*ex vivo*) pacjentów z chorobą Alzheimerą oraz osób z grupy kontrolnej w porównywalnym wieku.

We krwi określano procentową zawartość poszczególnych populacji komórek w puli wszystkich limfocytów. Badano populację limfocytów CD4+ i CD8+ z wyszczególnieniem populacji pozytywnych i negatywnych pod względem występowania antygenu CD28 na tych komórkach.

Określano odsetek komórek CD4+, na których powierzchni wykryto antygeny świadczące o ich aktywacji: CD69, HLA-DR, CD25, oraz CD95.

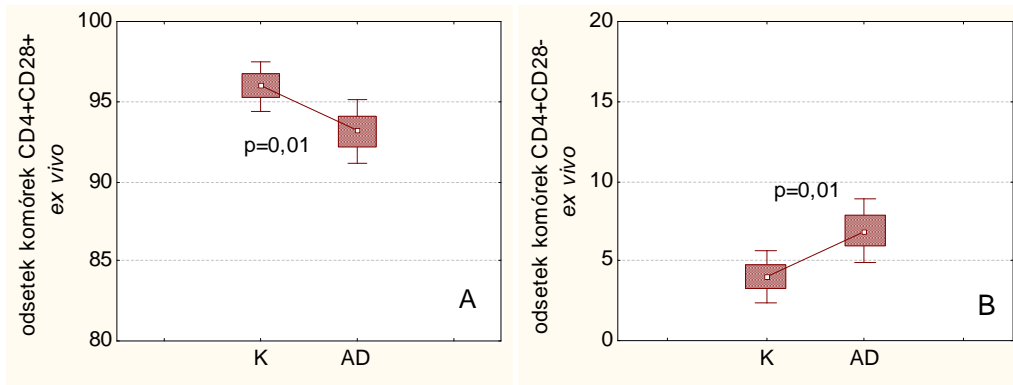
Badaniem fenotypu *ex vivo* objęto 32 osobową grupę osób z AD oraz 28 osób zdrowych w podeszłym wieku stanowiących grupę kontrolną.

4.1.1 Zmiany odsetka komórek CD28+ oraz poziomu ekspresji tego antygenu na limfocytach osób chorych z AD

Wśród limfocytów T określono udział poszczególnych populacji CD4+ i CD8+.

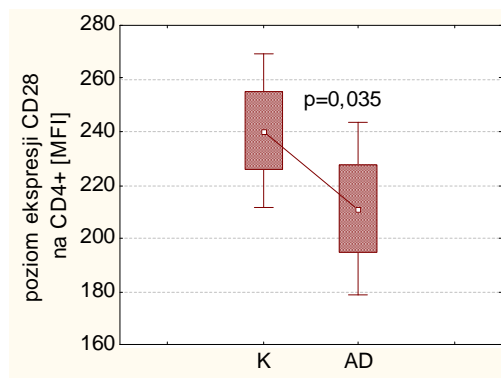
Nie stwierdzono znamiennych różnic pomiędzy obiema badanymi grupami dotyczących odsetka komórek CD3+CD4+.

W populacji CD4+ wykazano znamienne obniżony odsetek komórek pozytywnych pod względem występowania receptora CD28 u osób z AD (Rys. 1A) oraz znamienne podwyższony odsetek komórek pozbawionych tego antygenu w grupie chorych (Rys. 1B).



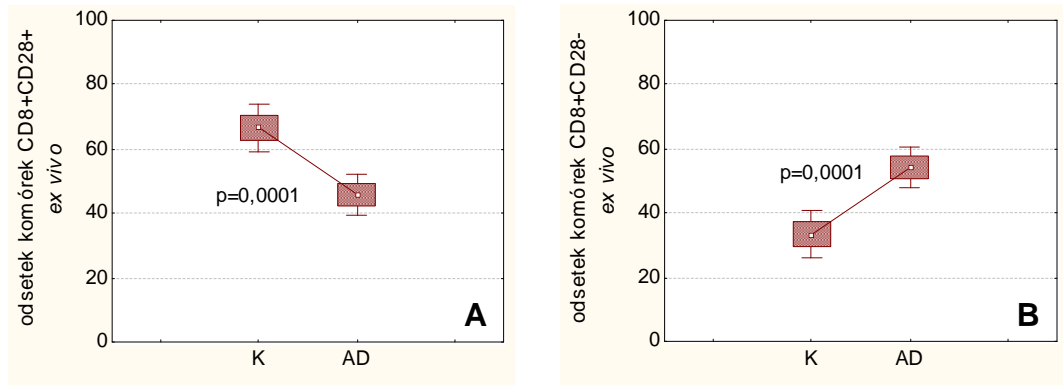
Rys. 1 Znamienne obniżenie odsetka komórek CD4+CD28+ (A) i podwyższenie CD4+CD28- (B) w populacji osób z AD w porównaniu z grupą kontrolną (na wykresach przedstawiono średnią, ramka przedstawia $\text{średnią} \pm \text{błąd standardowy}$, a wąsy $\text{średnią} \pm \text{odchylenie standardowe}$; zastosowano test T-studenta; $N_K=28$; $N_{AD}=34$).

Dodatkowo wykazano, że nie tylko komórek CD4+ pozytywnych pod względem CD28+ jest mniej w grupie osób z AD, ale również, że poziom ekspresji antygenu CD28 na komórkach CD4+ tych osób jest istotnie obniżony (Rys. 2).



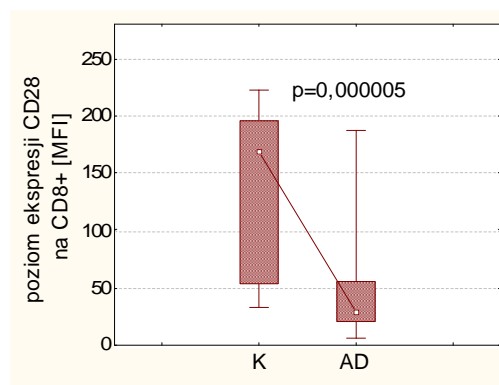
Rys.2 Obniżenie poziomu ekspresji antygenu CD28 na komórkach CD4+ osób z AD w porównaniu z grupą kontrolną (na wykresie przedstawiono średnią , ramka przedstawia błąd standardowy , a wąsy $\text{odchylenie standardowe}$; do oceny znamienności różnicy zastosowano test U-Manna Whitneya; $N_K=28$; $N_{AD}=35$).

Analogiczna analiza przeprowadzona dla populacji komórek CD8+ również nie wykazała istotnych zmian w odsetku komórek CD3+CD8+ pomiędzy obiema badanymi grupami. Po zbadaniu odsetka komórek CD28+ w obrębie populacji CD8+ stwierdzono ich znamienne obniżony odsetek u chorych (Rys. 3A), a co za tym idzie, znamienne podwyższony procent komórek CD8+CD28- w tej grupie w porównaniu z grupą kontrolną (Rys.3B).



Rys. 3. Znamienne obniżenie odsetka komórek CD28+ (A) i CD28- negatywnych (B) w grupie z AD (na wykresach przedstawiono średnią, ramka przedstawia średnią \pm błąd standardowy, a wąsy średnią \pm odchylenie standardowe; $N_K=28$; $N_{AD}=35$; zastosowano test T-Studenta).

Analiza mająca na celu porównanie poziomu ekspresji antygenu CD28 na komórkach CD8+ wykazała, że komórki pacjentów z AD charakteryzują się znamienne obniżonym poziomem tego antygenu w porównaniu z kontrolną grupą osób zdrowych (Rys. 4).

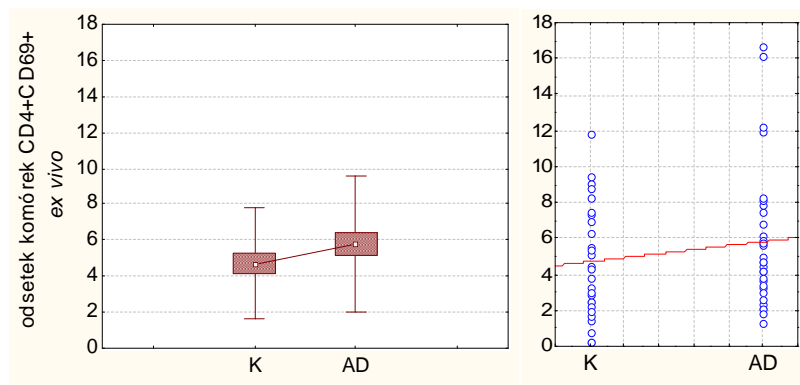


Rys.4 Obniżenie poziomu antygenu CD28 na komórkach CD8+ osób z AD w porównaniu z grupą kontrolną (na wykresie przedstawiono medianę, ramka przedstawia percentyle, a wąsy wartość Min-Max; zastosowano test U-Manna Whitney; $N_K=28$; $N_{AD}=35$).

4.1.2 Zmiany proporcji subpopulacji aktywowanych limfocytów CD4+ u osób z chorobą Alzheimera.

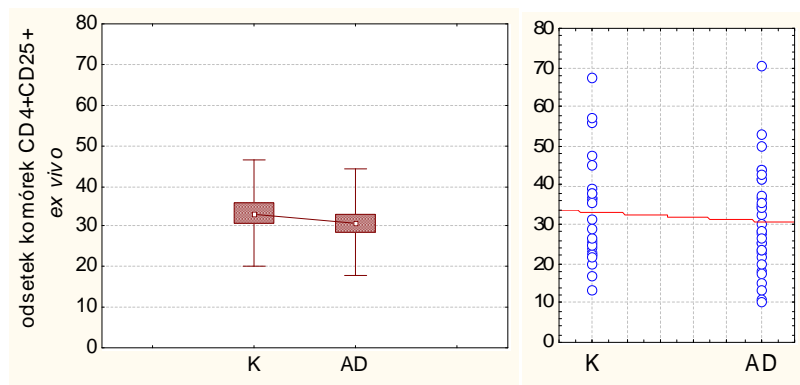
O aktywacji limfocytów T świadczy szereg antygenów pojawiających się na powierzchni tych komórek. Aby zbadać stopień aktywacji komórek CD4+ ex vivo, zbadano odsetek antygenów CD69, CD25, CD95 oraz HLA-DR na ich powierzchni.

Stwierdzono, że u chorych z AD odsetek aktywowanych limfocytów o fenotypie CD4+CD69+ jest niezamiennie podwyższony w porównaniu z grupą osób zdrowych (Rys. 5).



Rys. 5. Niezamiennie podwyższony odsetek komórek **CD4+CD69+** osób w grupie chorych z AD w porównaniu z grupą osób zdrowych oraz profil ekspresji receptora dla poszczególnych przypadków w badanych grupach (na wykresach przedstawiono średnią, ramka przedstawia średnią \pm błąd standardowy, a wąsy średnią \pm odchylenie standardowe; zastosowano test T-Studenta; $N_K=28$; $N_{AD}=35$).

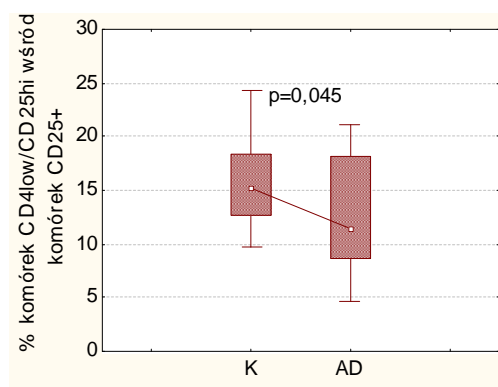
Różnicy pomiędzy chorymi a zdrowymi nie wykazano natomiast dla komórek CD4+CD25+, których odsetek jest porównywalny w badanych grupach (Rys. 6).



Rys. 6. Brak różnic w wartości odsetka komórek CD4+CD25 pomiędzy grupą z AD a osobami zdrowymi oraz profil ekspresji receptora dla poszczególnych przypadków w badanych grupach (na wykresach przedstawiono średnią, ramka przedstawia średnią \pm błąd standardowy, a wąsy średnią \pm odchylenie standardowe; $N_K=28$; $N_{AD}=35$).

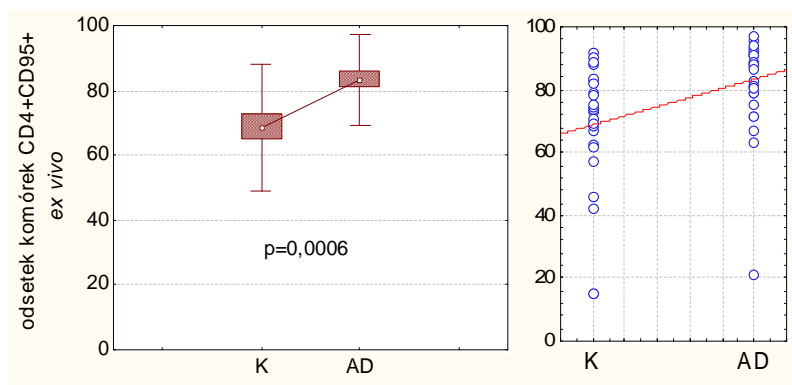
Populacja o fenotypie CD4+CD25+ uważana jest za heterogenną, jako że znajdują się wśród tych komórek nie tylko komórki aktywowane, ale również populacja komórek regulatorowych. Aby zbadać czy pomimo braku różnic w heterogenicznej populacji komórek CD4+CD25+, poziom komórek regulatorowych (Tregs), CD4lowCD25hi [Bryl i wsp. (Int Immunol 2008 w druku)] jest różny w obu badanych grupach wykonano analizę polegającą na porównaniu liczby komórek o fenotypie

CD4^{low}CD25^{high} limfocytów z bramki limfocytów CD4⁺CD25⁺, która wykazała znamienne obniżony odsetek komórek regulatorowych w grupie osób chorych (Rys. 7).



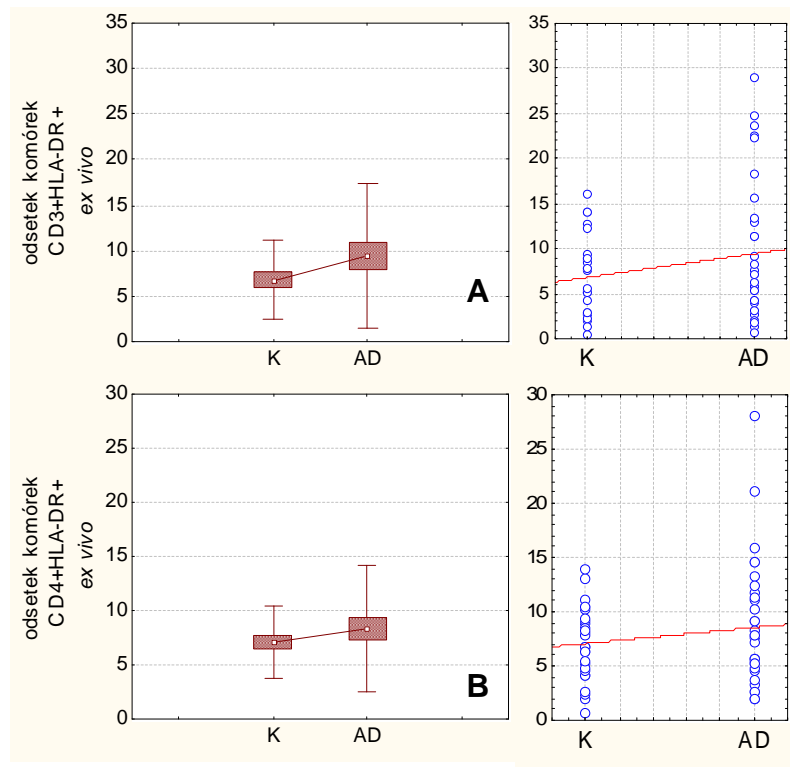
Rys. 7. Obniżenie odsetka komórek regulatorowych o fenotypie **CD4^{low}CD25⁺** w grupie osób z chorobą Alzheimera (na wykresie przedstawiono medianę, ramka przedstawia percentyle, a wąsy wartość Min-Max; N_K=28 N_{AD}=35)

W toku dalszej analizy komórek aktywowanych *ex vivo* wykazano wysoce znamienne podwyższony odsetek komórek o fenotypie CD4⁺CD95⁺, antygeny charakterystycznego dla aktywacji (Baryshnikov A., Y., 1997), u chorych z AD w porównaniu z grupą osób zdrowych w porównywalnym wieku (Rys. 8).



Rys. 8. Znamienne podwyższony odsetek komórek **CD4⁺CD95⁺**, markera aktywacji, z krwi pełnej osób z chorobą Alzheimera z grupą osób zdrowych oraz profil ekspresji receptora dla poszczególnych przypadków w badanych grupach (na wykresie przedstawiono średnią, ramka przedstawia średnią ± błąd standardowy SEM, a wąsy średnią ± odchylenie standardowe SD; N_K=28; N_{AD}=35).

Badanie odsetka komórek pozytywnych pod względem obecności antygeny HLA-DR wykazało nieznamienne podwyższony odsetek komórek pozytywnych zarówno dla populacji komórek CD3⁺ (Rys 9A) jak i CD4⁺ (Rys 9B) w populacji osób chorych.



Rys. 9 Porównanie wartości odsetka komórek pozytywnych pod względem obecności markera aktywacji **HLA-DR** , z krwi pełnej osób z chorobą Alzheimer z grupą osób zdrowych, na komórkach **CD3+** (A) oraz na komórkach **CD4+** (B) (na wykresach przedstawiono średnią, ramka przedstawia średnią \pm błąd standardowy, a wąsy średnią \pm odchylenie standardowe; $N_K=28$; $N_{AD}=35$).

4.2 Porównanie zmian fenotypu limfocytów T u osób zdrowych i chorych z AD w wyniku stymulacji przeciwciałem antyCD3 oraz mieszaniną przeciwciał antyCD3antyCD28

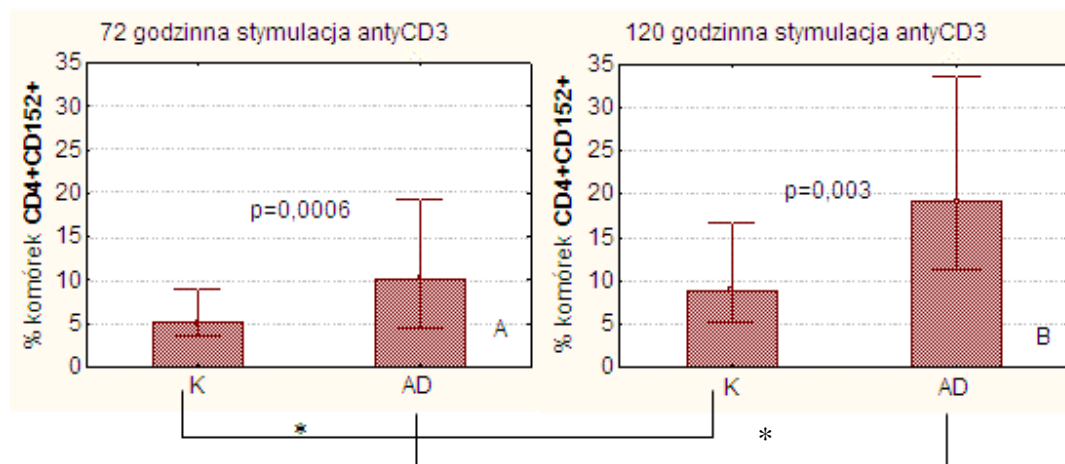
W związku z przedstawioną wyżej obserwacją wzrostu odsetka limfocytów T wykazujących cechy aktywacji we krwi osób chorych na AD, postanowiono porównać wielkość odpowiedzi tych komórek na stymulację immobilizowanym przeciwciałem antyCD3 lub mieszaniną przeciwciał antyCD3 i antyCD28. Stymulacji przeciwciałem antyCD3 użyto w założeniu, że istnieje możliwość dostarczenia dodatkowego sygnału przez znajdujące się w puli PBMC komórki prezentujące antygen, natomiast użycie stymulacji antyCD3 w połączeniu z antyCD28 miało na celu wzbudzenie maksymalnej, niezależnej od stymulacji aktywacji.

4.2.1 Porównanie zmian fenotypu limfocytów T u osób z AD i osób zdrowych związanych z aktywacją za pomocą przeciwciała antyCD3

Nie wykazano różnic w odsetkach komórek CD4+CD28+ oraz CD4+CD25+ po 72 i 120 godzinach stymulacji pomiędzy grupą osób chorych a zdrowymi. Podobnie nie znaleziono różnic w dynamice zmian liczebności obu tych populacji komórek mierzonej różnicą między procentem komórek ex vivo a wynikiem dla 72 i 120 godzin.

Badano również odsetek komórek CD4+ pozytywnych pod względem powierzchniowego występowania antygenu CD152. Receptor ten jest homologiem, a zarazem antagonistą CD28 jako, że obie te cząsteczki konkurują o miejsce wiązania tych samych ligandów CD80 i CD86. Choć rola CD152 w odpowiedzi immunologicznej nie została do tej pory jednoznacznie poznana, to uważa się, że jest to cząsteczka, której rola pomaga na negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej i wyhamowywaniu proliferacji limfocytów T.

Wykazano, że odsetek komórek CD4+CD152+ jest istotnie większy u chorych z AD w porównaniu z grupą zdrowych po 72 godzinnej stymulacji antyCD3, która to różnica utrzymywała się również po 120 godzinach. (Rys. 10). Badanie odsetka komórek CD4+CD152+ ex vivo wykazały, że jest on bliski zera i porównywalny w obu badanych grupach.



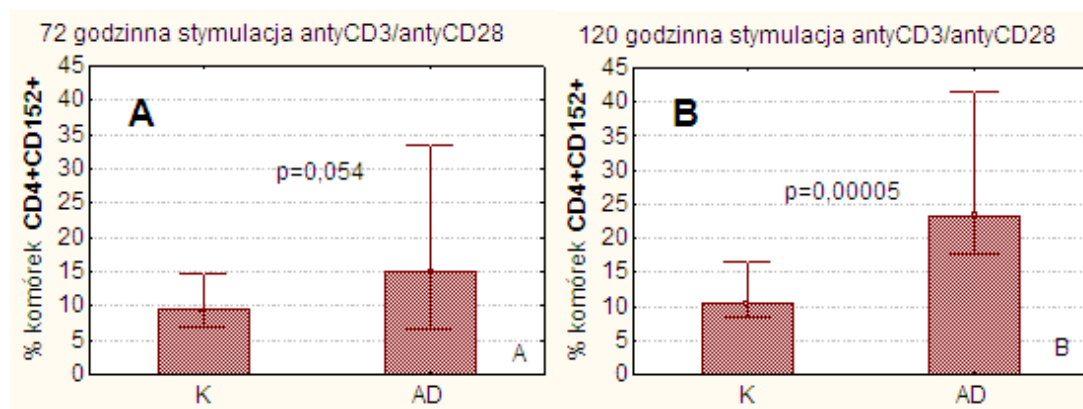
Rys. 10 Znamienne statystycznie podwyższenie odsetka komórek CD4+CD152+ w grupie osób z AD po 72 (A) i 120 godzinach (B) stymulacji antyCD3 (na wykresie przedstawiono medianę, wąsy wyznaczają percentyle; zastosowana test U-Manna Whitney, *- $p < 0,05$; $N_K = 15$; $N_{AD} = 15$).

Wykazano znamienne istotną różnicę dotyczącą wzrostu odsetka komórek CD4+CD152+ po 120 godzinach w porównaniu z 72 godzinami zarówno dla grupy osób z AD jak i grupy osób zdrowych.

4.2.2 Porównanie zmian fenotypu limfocytów T u osób z AD i osób zdrowych związanych z aktywacją za pomocą przeciwciała antyCD3 oraz antyCD28

W kolejnej części badań jedynie w przypadku odsetka komórek CD4+CD152+ zarówno po 72 jak i po 120 godzinnej stymulacji antyCD3antyCD28 wykazano różnicę w kierunku podwyższonego odsetka tych komórek w grupie osób chorych. Dla 72 godzin różnica znajdowała się na pograniczu znamienności statystycznej, natomiast po 120 godzinach była już wysoce znamienna. Odsetek komórek CD4+CD152+ ex vivo w obu badanych grupach był bliski zero i nie wykazywał żadnych różnic pomiędzy pacjentami z AD a osobami zdrowymi.

Nie wykazano znamienne istotnych różnic zarówno dla grupy osób z AD jak i grupy osób zdrowych porównując odsetek komórek CD4+CD152+ po 72 i 120 godzinach.

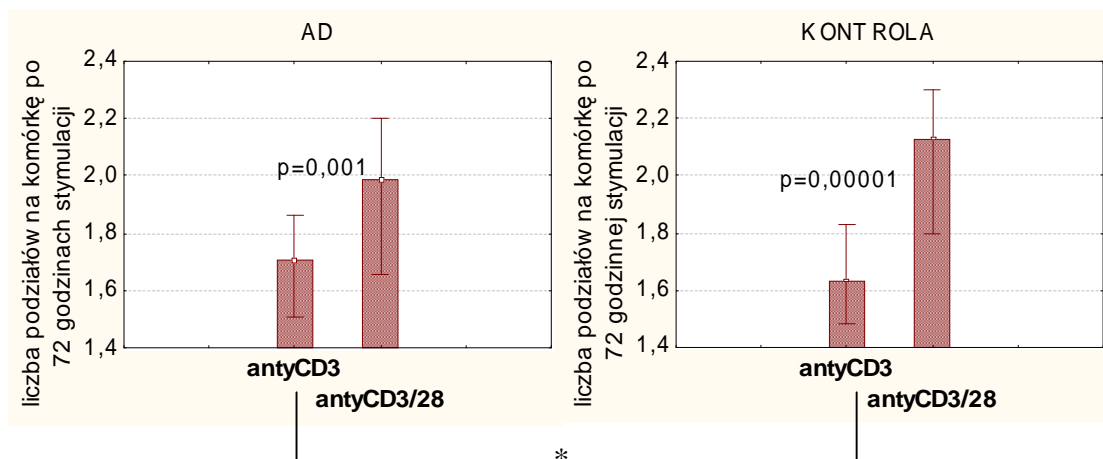


Rys. 11 Podwyższony odsetek komórek CD4+CD152+ w populacji osób z AD zarówno po 72 godzinnej stymulacji antyCD3antyCD28 (A) (różnica na pograniczu znamienności statystycznej) jak i po 120 godzinach hodowli (B) (wysoce znamienna różnica statystyczna) (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; zastosowano test U-manna Whitneya; $p < 0,05$; $N_K = 15$; $N_{AD} = 15$).

Dla pozostałych obserwowanych populacji limfocytów T o fenotypie CD4+CD28+, CD8+CD28+ i CD4+CD25+ nie wykazano różnic w odsetkach pomiędzy badanymi grupami. Nie stwierdzono też różnic w dynamice zmian proporcji w obrębie tych populacji porównując różnicę pomiędzy odsetkiem komórek ex vivo i po 72 i 120 godzinach stymulacji.

4.3 Porównanie dynamiki proliferacji limfocytów T u osób chorych z AD i grupie osób zdrowych zależnej od stymulacji przeciwciałem antyCD3 oraz mieszaniną przeciwciał antyCD3antyCD28

Stwierdzono, że stymulacja przeciwciałem antyCD3 z jednoczesną kostymulacją antyCD28 znacząco zwiększa liczbę podziałów na komórkę w populacji CD4+CD28+ w obu badanych grupach w porównaniu ze stymulacją samym antyCD3 (Rys. 12) jak i pozostałe parametry charakteryzujące dynamikę cyklu takie jak współczynnik proliferacji, liczba prekursorów oraz procent dzielących się komórek. Dodatkowo wykazano, że komórki CD4+CD28+ osób z AD wykazują znamienne wyższą liczbę podziałów na komórkę w wyniku 72 godzinnej stymulacji przeciwciałem antyCD3, która to różnica nie jest znamienna po 120 godzinach. W przypadku stymulacji antyCD3antyCD28 nie wykazano znamiennych różnic między obiema badanymi grupami.



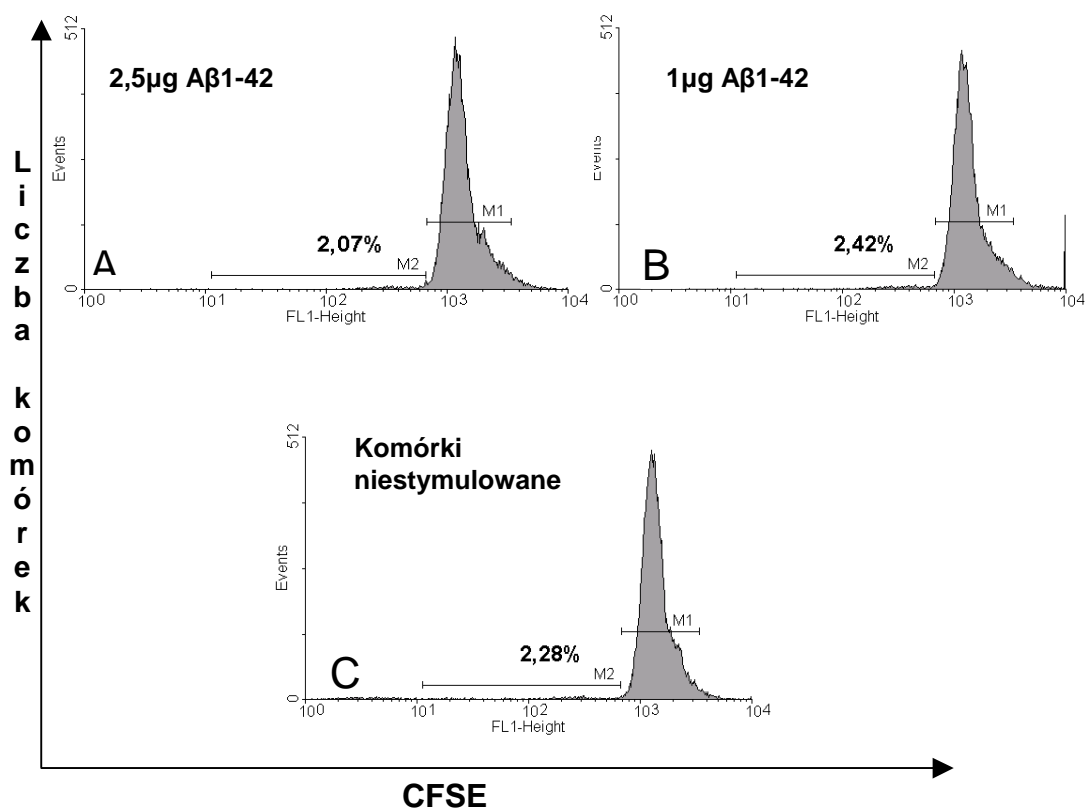
Rys. 12 Znamienne wyższa liczba podziałów na komórkę po 72 i 120 godzinnej stymulacji mieszaniną przeciwciał antiCD3/antiCD28 w porównaniu z pojedynczym przeciwciałem antiCD3 w przypadku obu badanych grup oraz znamienne wyższa liczba podziałów na komórkę CD4+CD28+ w wyniku stymulacji w grupie osób z AD (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; zastosowano test U-Manna Whitneya; $N_K=15$; $N_{AD}=15$; * - $p<0,05$).

Podobne wnioski przyniosły wyniki otrzymane po 120 stymulacji, po których podwójna stymulacja powodowała znamienne wyższą liczbę podziałów komórkowych w porównaniu ze stymulacją samym przeciwciałem antiCD3, jak również zwiększała pozostałe parametry cyklu. Tym niemniej po 120 stymulacji zarówno samym przeciwciałem antiCD3 jak i mieszaniną CD3CD28 nie wykazano już znamienych różnic.

4.4 Ocena efektu β -amyloidu na odpowiedź proliferacyjną limfocytów CD4+CD28+ oraz na fenotyp limfocytów T

W kolejnym etapie badań zadano pytanie czy obecność amyloidu wywołuje proliferację komórek CD4+CD28+ u osób zdrowych i chorych oraz czy modyfikuje efekt działania antiCD3 i antiCD3antiCD28.

Początkowa stymulacja, do której użyto jedynie peptydów A β , w stężeniach 1 μ g/ml oraz 2,5 μ g/ml na milion komórek, nie dostarczyła wyników pozwalających wnioskować o ich stymulującym efekcie na komórki.(zarówno w przypadku osób z AD jak i zdrowej grupy kontrolnej) (Rys. 13). Przetestowano wszystkie 3 peptydy, w stężeniach 2,5 μ g/ml oraz 1 μ g/ml na milion komórek, a przykładowe wyniki dla peptydu 1-42 zilustrowano na rysunku 24 (efekt wszystkich 3 peptydów był porównywalny).



Rys. 13 Przykładowe wyniki doświadczenia pilotowego polegającego na stymulacji komórek PBMC ($10^6/\text{ml}$), amyloidem $A\beta 1-42$ w stężeniu $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$ (A) oraz $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (B) w porównaniu z komórkami niestymulowanymi stanowiącymi kontrolę (C) (120 godzinna inkubacja; chory z AD – wynik reprezentatywny dla doświadczeń wykonanych dla 3 osób z AD i 3 zdrowych).

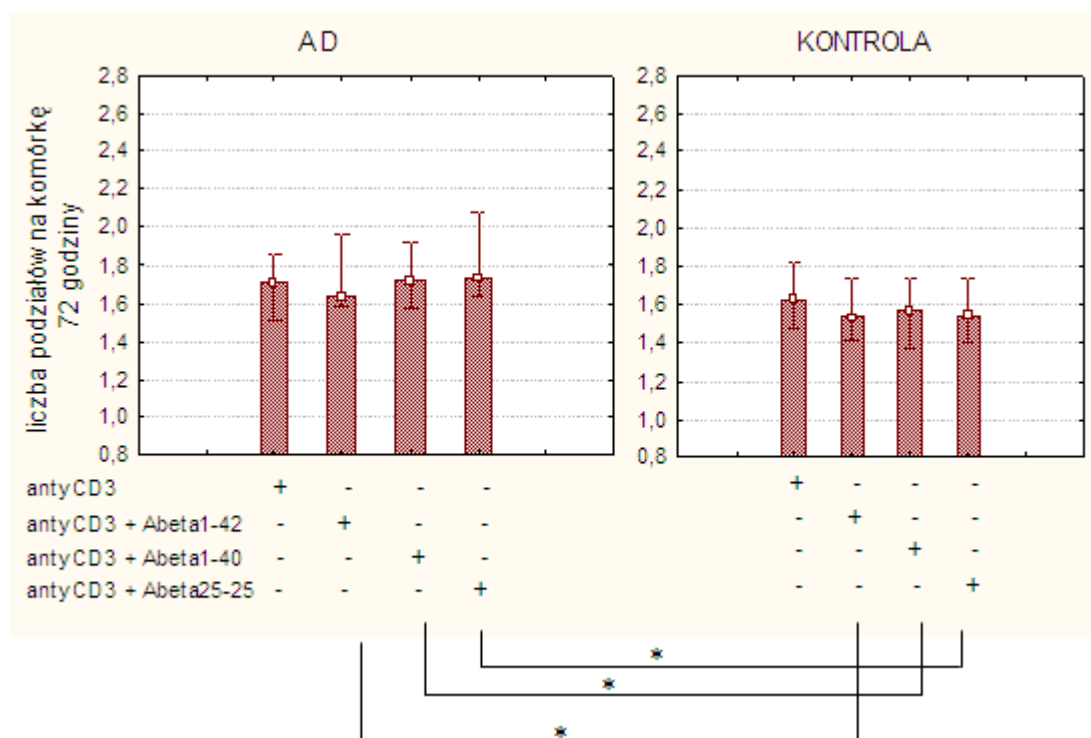
Po ustaleniu, że same β -amyloidy nie powodują proliferacji badanych komórek postanowiono sprawdzić, czy kontakt z β -amyloidem może modyfikować odpowiedź proliferacyjną indukowaną przeciwciałem antiCD3 bądź też mieszaną antiCD3antiCD28.

W kolejnych hodowlach używano stymulacji antiCD3 w kombinacji z β -amyloidami w stężeniu $1\mu\text{g}/\text{ml}$ na milion komórek (po wcześniejszych eksperymentach pilotowych wykazujących, że stężenie to modyfikuje efekt działania antiCD3 w stopniu porównywalnym ze stężeniem $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$).

Identyczny układ doświadczalny przyjęto dla stymulacji pełnej z użyciem mieszaniny przeciwciał antiCD3antiCD28, również stosując peptydy jako czynniki potencjalnie modyfikujące parametry cyklu komórkowego. Oba warianty doświadczeń zostały

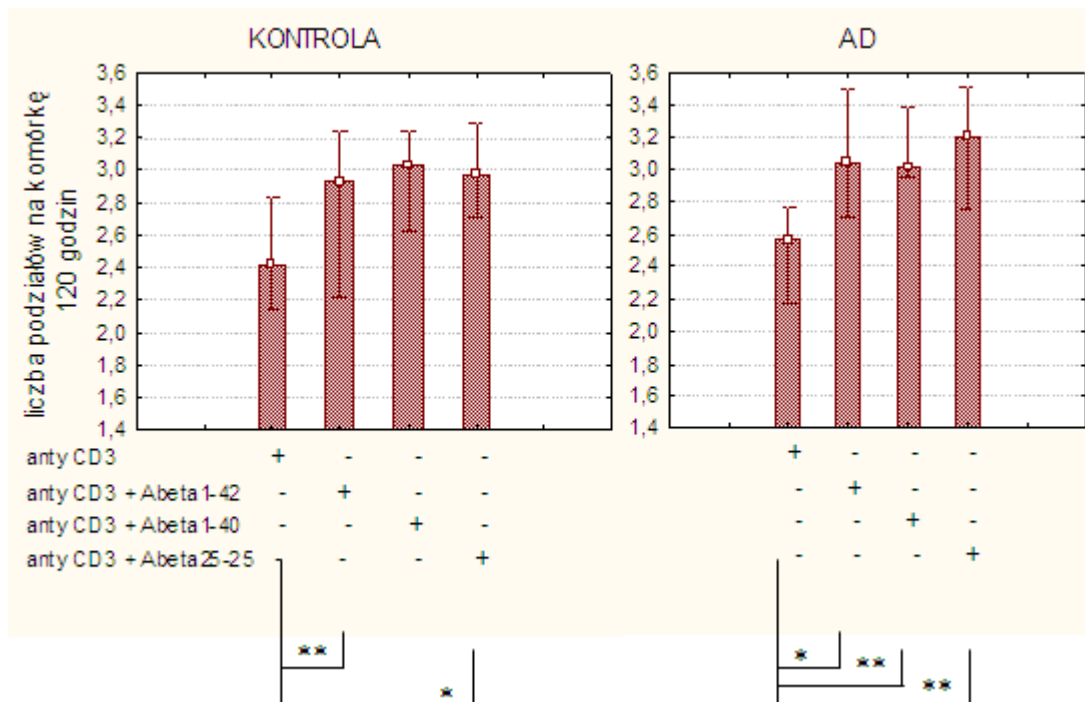
przeprowadzone na piętnastoosobowej grupie pacjentów z AD i równolicznej grupie osób zdrowych w podeszłym wieku.

Po 72-godzinnej stymulacji przeciwciałem antyCD3 wraz z poszczególnymi peptydami β -amyloidu, analizując zmiany w liczbie podziałów na komórkę, nie stwierdzono efektu modyfikującego peptydów (Rys. 14).



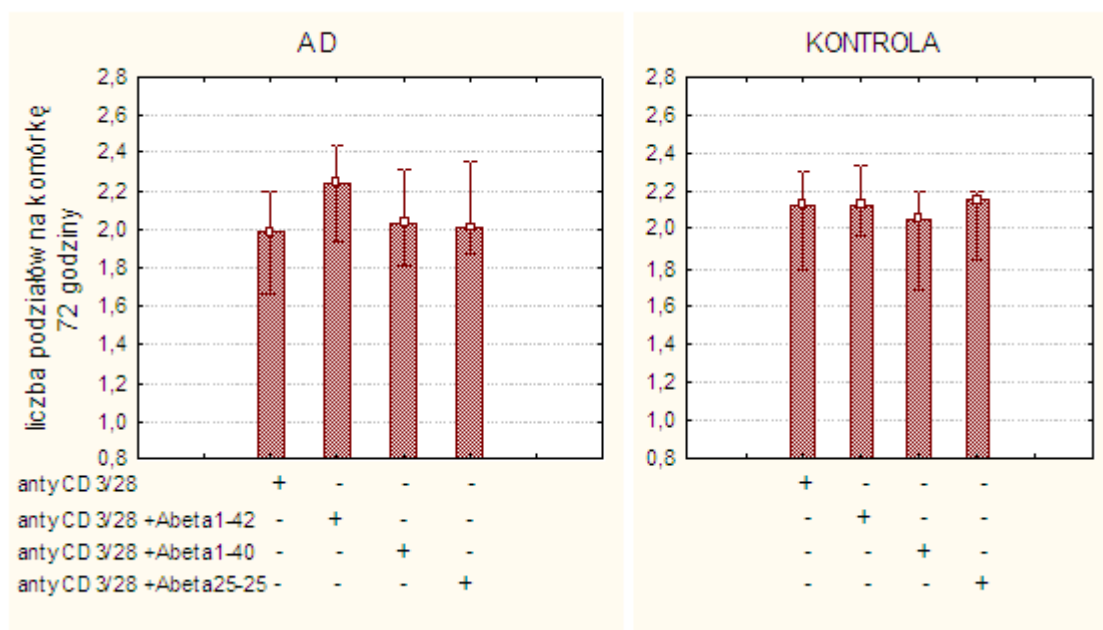
Rys. 14. Brak zmian w liczbie podziałów na komórkę w przypadku kostymulacji peptydami 1-42, 1-40 oraz 25-35 zarówno w grupie osób z AD jak i w przypadku grupy kontrolnej. Znamienna różnica w liczbie podziałów na komórkę pomiędzy grupą z AD a zdrowymi dotycząca stymulacji antyCD3 w połączeniu z peptydami 1-42, 1-40 i 25-35. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie różnice pomiędzy grupą chorych z AD a grupą kontrolną (*-p,0,05; N_K=15; N_{AD}=15)

Zmianę taką w przypadku analizowanego parametru zauważono natomiast po 120 godzinach, po którym to czasie zastosowanie peptydu β -amyloidu powodowało podwyższenie liczby podziałów w przypadku obu badanych grup. Nie stwierdzono natomiast różnic dotyczących liczby podziałów na komórkę pomiędzy obiema badanymi grupami.



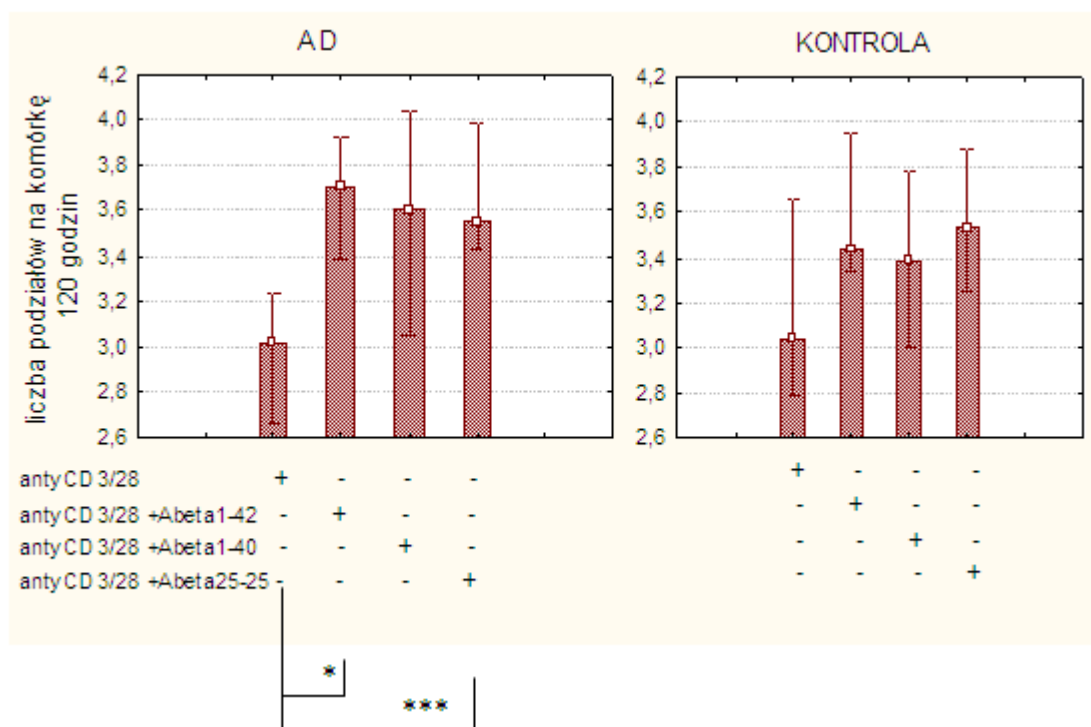
Rys. 15. Znamienne statystycznie podwyższenie liczby podziałów na komórkę wyniku modyfikacji działania przeciwciała antyCD3 za pomocą peptydów-amyloidu (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona, *- $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $p < 0,05$; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).

W przypadku porównania podwójnej stymulacji z użyciem antyCD3 i antyCD28 oraz poszczególnych peptydów β -amyloidu, po 72 godzinach nie stwierdzono żeby ich obecność powodowało zwiększenie liczby podziałów na komórkę potwierdzone znamiennością statystyczną (Rys. 16).



Rys. 16. Brak zmian w liczbie podziałów na komórkę w wyniku kostymulacji β -amyloidami 1-42, 1-40 oraz 25-35 w porównaniu z działaniem samej mieszaniny przeciwciał antyCD3/antyCD28 (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).

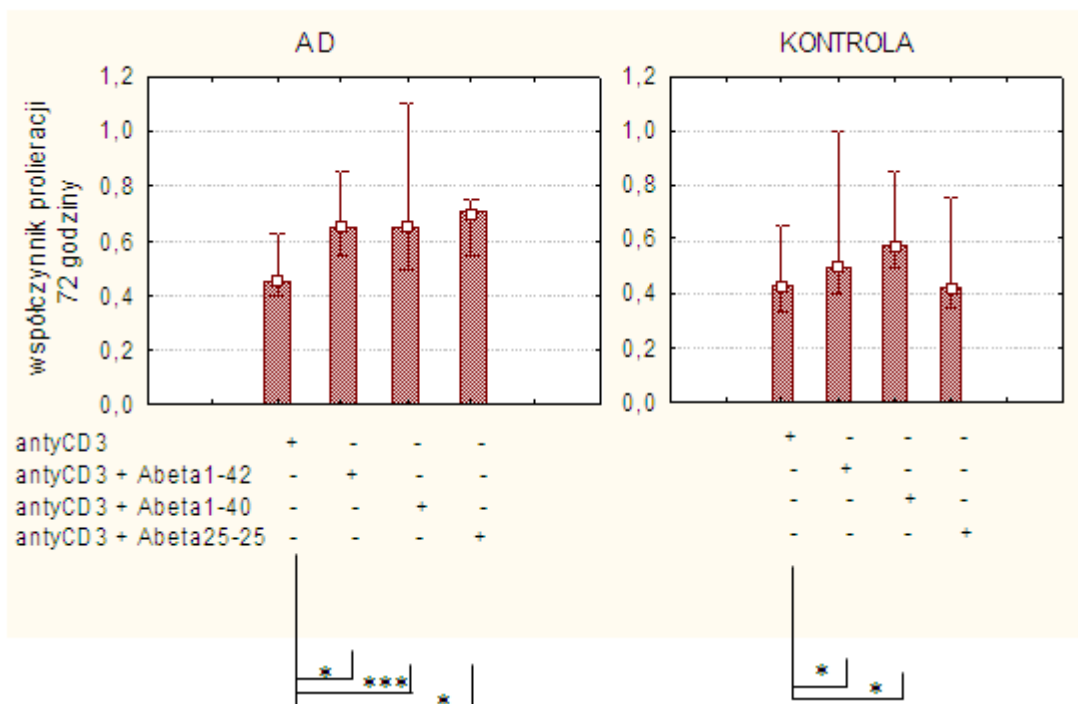
Efekt modyfikujący działania przeciwciał antyCD3/antyCD28 zauważono natomiast po 120 godzinach, ale znamienność statystyczną uzyskano jedynie w grupie osób chorych z AD, w której to działanie peptydów β -amyloidów 1-42 oraz 25-35 zwiększające liczbę podziałów na komórkę było znamienne statystycznie. W grupie osób zdrowych zaobserwowano natomiast tendencję w kierunku zwiększenia liczby podziałów na komórkę w wyniku działania peptydów 1-42, 1-40 i 25-35 natomiast nie została ona potwierdzona znamiennością statystyczną (Rys. 17).



Rys. 17 Znamienne podwyższenie liczby podziałów na komórkę w wyniku działania peptydów 1-42 i 25-35 jako kostymulatorów w porównaniu z samym antiCD3/antiCD28 w grupie osób z AD. Tendencja, nie potwierdzona statystycznie, do podwyższania liczby podziałów w grupie osób zdrowych przez peptydy β -amyloidów w porównaniu ze stymulacją samą mieszaniną przeciwciał antiCD3/antiCD28 (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxon $*-p<0,05$, $***p<0,001$; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).

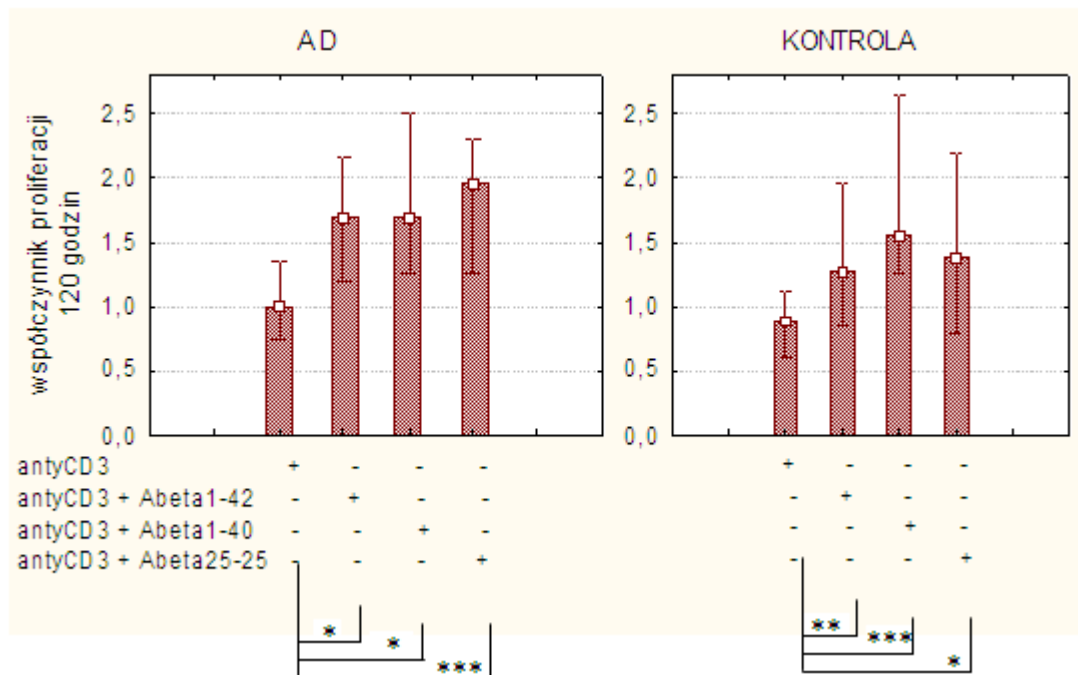
Jednocześnie z liczbą podziałów na komórkę, potencjalne działanie modulujące stymulację antiCD3 oraz antiCD3/antiCD28 śledzono na podstawie pozostałych parametrów cyklu komórkowego takie jak współczynnik proliferacji, procent komórek ulegającym podziałom, liczba prekursorów komórkowych.

Wykazano, że peptydy β -amyloidów już po 72 godzinach wpływają na podwyższenie współczynnika proliferacji w obu badanych grupach w porównaniu ze stymulacją samym przeciwciałem antiCD3 (Rys. 18). W przypadku osób z AD efekt modulujący polegający na podwyższeniu współczynnika proliferacji w stosunku do stymulacji przeciwciałem antiCD3 dotyczył wszystkich 3 badanych peptydów w grupie osób z AD, natomiast w grupie kontrolnej znamienność statystyczna została potwierdzona dla peptydów 1-42 oraz 1-40.



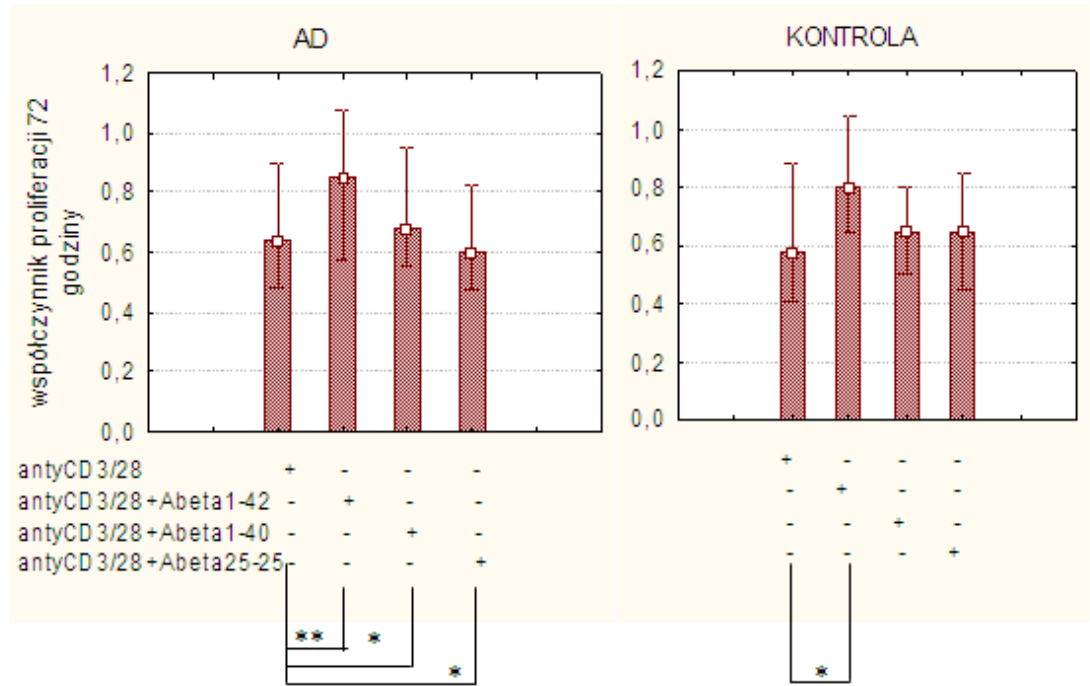
Rys. 18 Znamienne statystycznie podwyższenie współczynnika proliferacji w wyniku działania wszystkich peptydów β -amyloidu w porównaniu ze stymulacją samym przeciwciałem antyCD3 w grupie osób z AD i ten sam efekt w przypadku działania peptydu 1-42 i 1-40 w grupie osób zdrowych (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona; *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$, ***- $p = 0,001$; $N_K = 15$; $N_{AD} = 15$).

Po 120-godzinnej stymulacji efekt ten nie tylko utrzymywał się, ale też uległ znacznemu zwiększeniu. Po 5 dobach współczynnik proliferacji w przypadku komórek stymulowanych przeciwciałem antyCD3 i peptydami był znamienne wyższy w stosunku do stymulacji samym przeciwciałem zarówno w grupie chorych z AD jak i w grupie kontrolnej w przypadku wszystkich 3 badanych peptydów (Rys. 19)



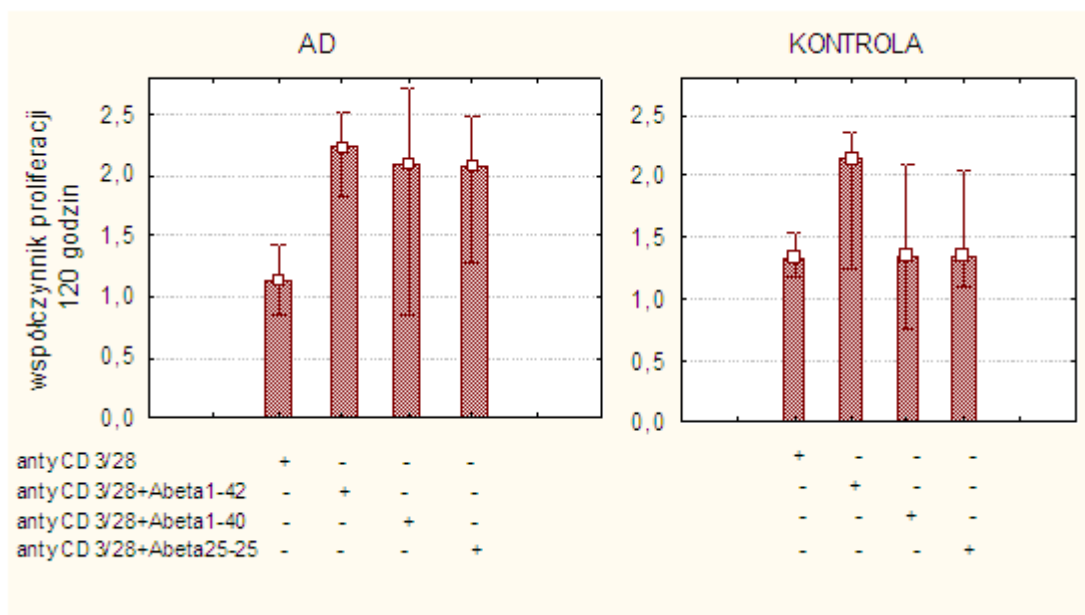
Rys. 19 Znamienne statystycznie podwyższenie współczynnika proliferacji w wyniku działania wszystkich peptydów β -amyloidu w porównaniu ze stymulacją samym przeciwciałem antiCD3 w grupie osób z AD i grupie kontrolnej w przypadku 3 badanych peptydów β -amyloidu (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcozona; *-p<0,05; **-p<0,01, ***-p=0,001; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).

W przypadku pełnej stymulacji uzyskanej za pomocą przeciwciał antiCD3/antiCD28 również stwierdzono, że peptydy β -amyloidów modyfikują współczynnik proliferacji komórek CD4+CD28+ znamienne go podwyższając w przypadku wszystkich trzech peptydów w grupie chorych oraz w przypadku peptydu 1-42 w grupie osób zdrowych (Rys. 20)



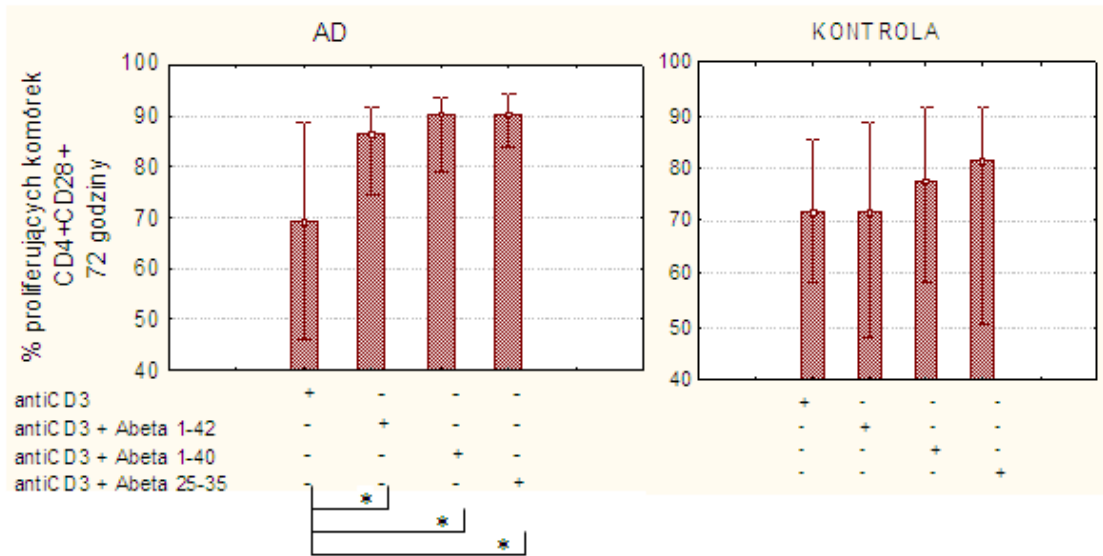
Rys. 20 Znamienne podwyższony współczynnik proliferacji w wyniku modulacji 72 godzinnej stymulacji antiCD3/antiCD28 przez wszystkie 3 peptydy β -amyloidów w grupie osób z AD oraz analogiczny efekt w przypadku peptydu 1-42 w grupie osób zdrowych (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona; *-p<0,05; **-p<0,01, ***-p=0,001; N_K=15; N_{AD}=15).

Po 120 godzinach, choć tendencja do podwyższania współczynnika proliferacji w porównaniu z samą stymulacją antiCD3/antiCD28 jest nadal wyraźna w grupie osób z AD oraz w grupie kontrolnej w przypadku peptydu 1-42, to różnice te okazały się nie być znamienne statystycznie (Rys. 21)

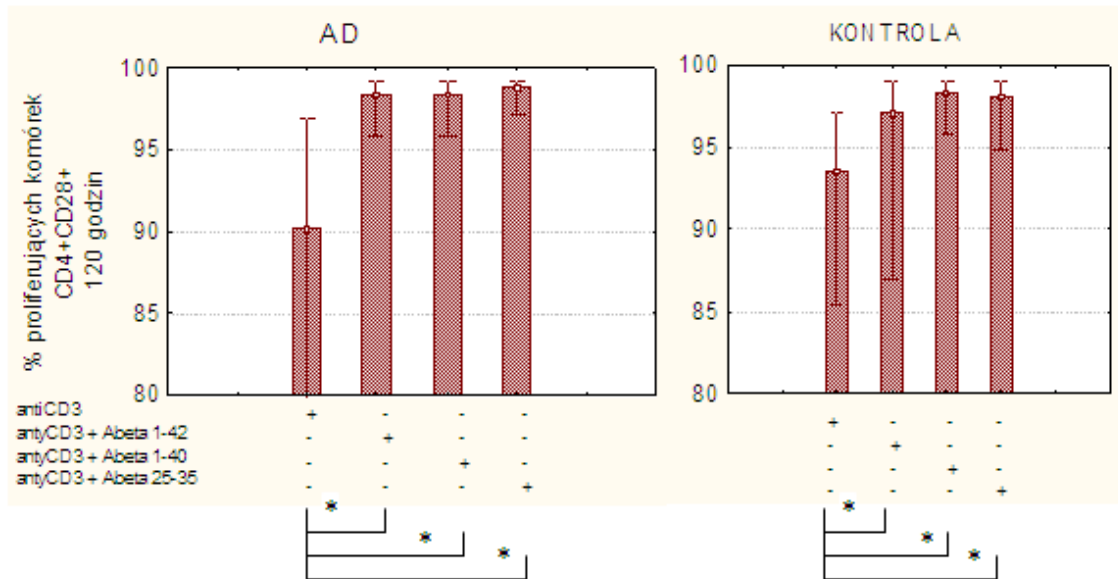


Rys. 21 Zachowana tendencja do podwyższenie współczynnika proliferacji przez peptydy β -amyloidów w porównaniu ze 120 godzinną stymulacją antyCD3/antyCD28 w obu badanych grupach, nie potwierdzona znamiennością statystyczną (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcozona; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).

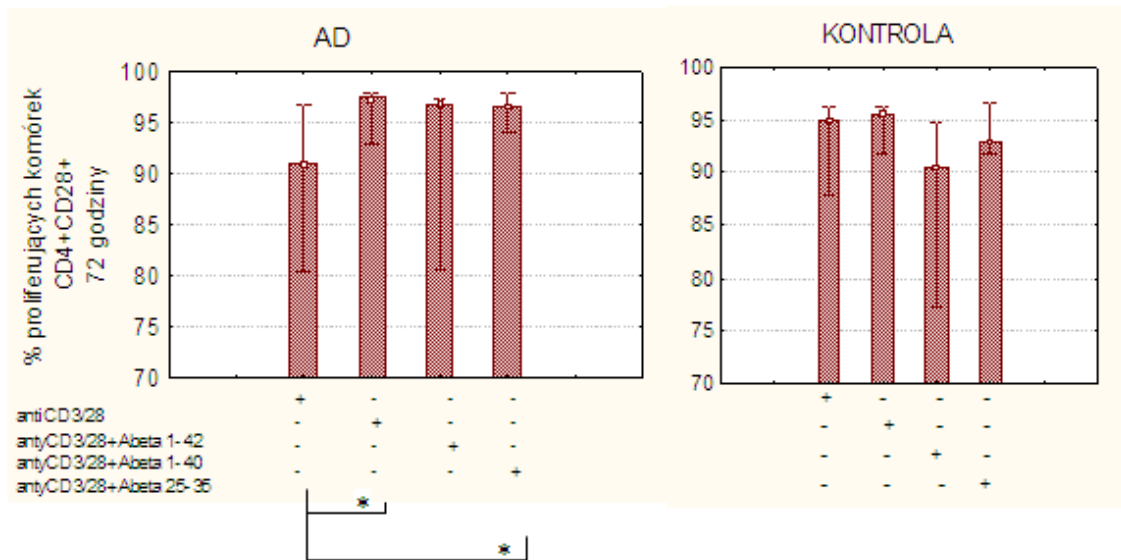
Wyniki świadczące o wpływie β -amyloidów, polegającym na podwyższeniu parametrów dynamiki cyklu komórkowego wykazano również w przypadku procenta dzielących się komórek dla stymulacji antyCD3 (Ryc. 22 i 23) oraz dla stymulacji antyCD3antyCD28 (Ryc. 24 i 25).



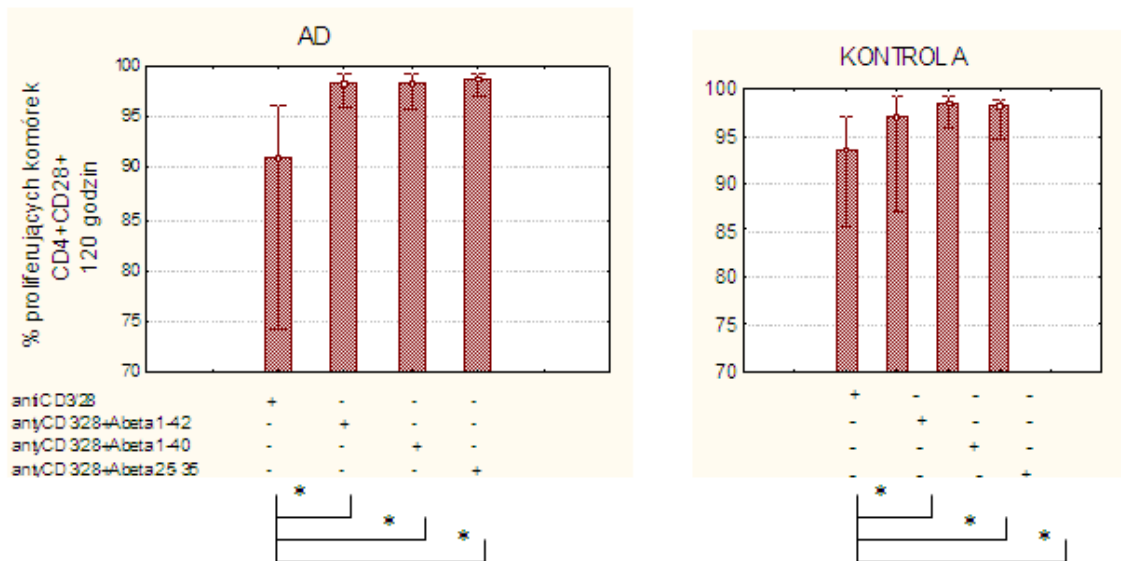
Ryc. 22 Znamienne podwyższony procent dzielących się komórek CD4+CD28+ w wyniku modulacji działania stymulacji antyCD3 przez β -amyloidy w grupie osób z AD oraz brak takiego efektu w grupie osób zdrowych po 72 godzinnej inkubacji. (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxon; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).



Ryc. 23 Znamienne podwyższony procent dzielących się komórek CD4+CD28+ w wyniku modulacji działania stymulacji antyCD3 przez β -amyloidy zarówno w grupie osób z AD jak i grupie kontrolnej osób zdrowych po 120 godzinnej inkubacji (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxon; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).



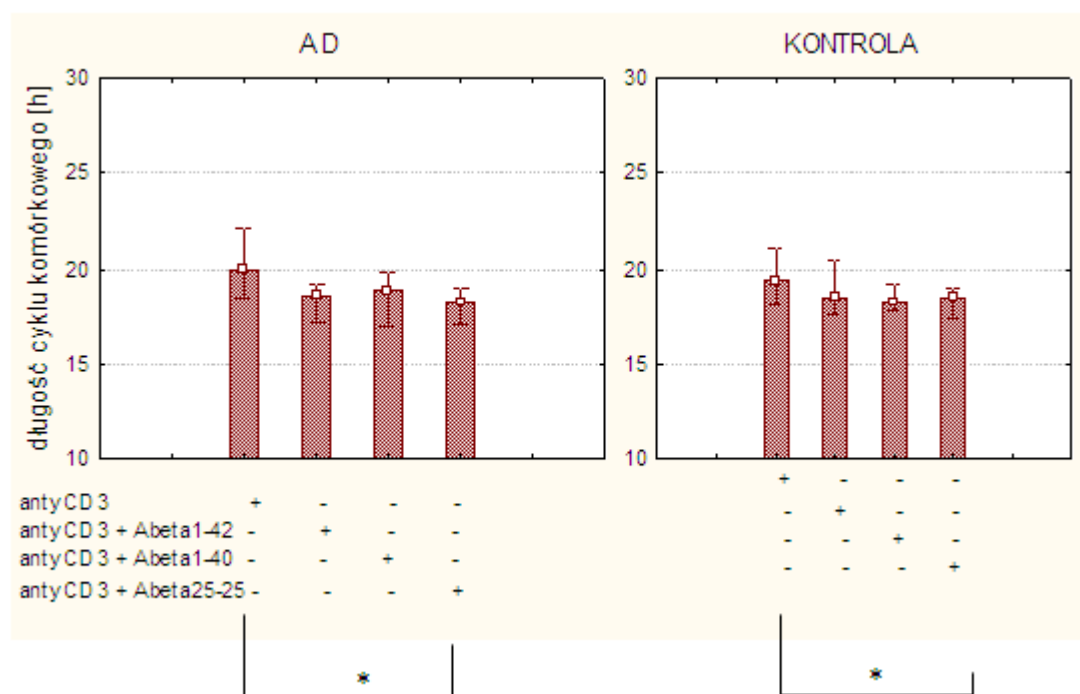
Ryc. 24 Znamienne podwyższony procent dzielących się komórek CD4+CD28+ w wyniku modulacji działania stymulacji antiCD3/ przez β -amyloid 1-42 i 25-35 w grupie osób z AD oraz brak takiego efektu w grupie osób zdrowych po 72 godzinnej inkubacji. (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).



Ryc. 25 Znamienne podwyższony procent dzielących się komórek CD4+CD28+ w wyniku modulacji działania stymulacji antiCD3/28 przez β -amyloidy w grupie osób z AD oraz grupie osób zdrowych po 120 godzinnej inkubacji. (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).

Postanowiono zbadać czy wcześniej omówiony wpływ peptydów β -amyloidów wiąże się ze zmianami w długości cyklu komórkowego oraz zmianami w czasie przejścia z fazy G0 do G1 limfocytów CD4+CD28+.

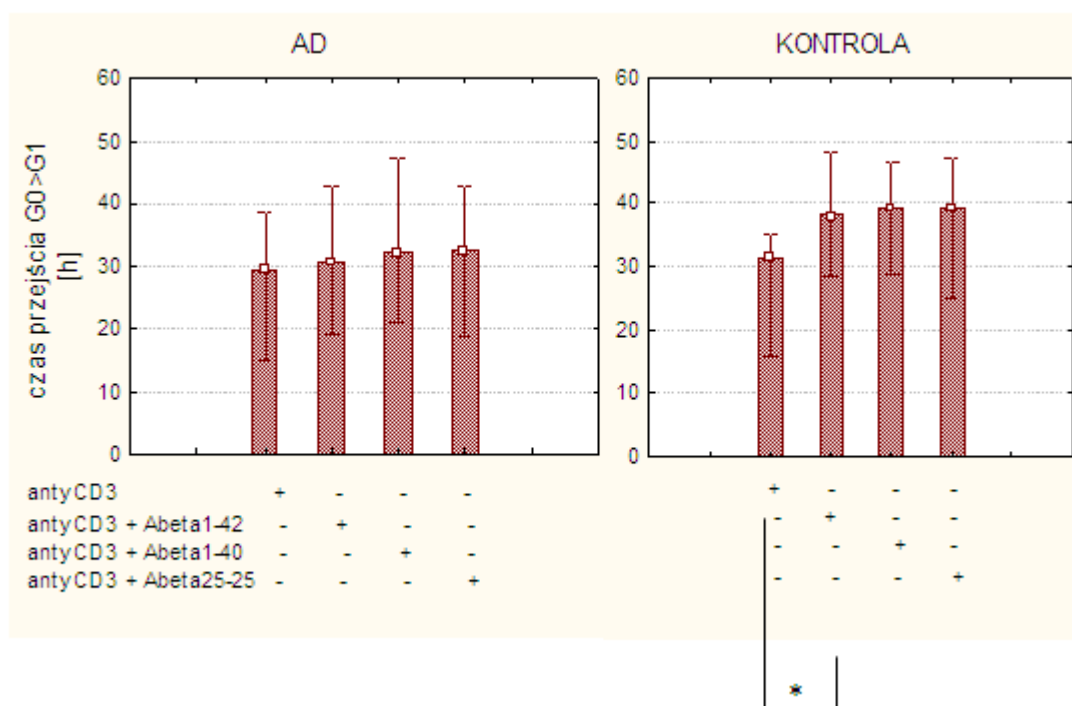
Analizując wpływ 3 peptydów na zmiany długości cyklu komórkowego w połączeniu ze stymulacją przeciwciałem antyCD3 stwierdzono znamienne statystycznie skrócenie cyklu w przypadku działania peptydu 25-35 w porównaniu ze stymulacją samym antyCD3 w obu badanych grupach, a modulacja peptydami 1-42 i 1-40 również dała efekt skrócenia długości cyklu komórkowego o około 2 godziny (porównanie średnich) zarówno wśród chorych z AD jak i w grupie kontrolnej (Rys. 26), choć nie został on potwierdzony znamiennością statystyczną.



Rys. 26 Skrócenie długości cyklu komórkowego w wyniku modulacji stymulacji antyCD3 przez peptyd 1-42 w obu badanych grupach oraz analogiczna tendencja w przypadku peptydów 1-40 i 25-35 (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona, *- $p < 0,01$; $N_K = 15$; $N_{AD} = 15$).

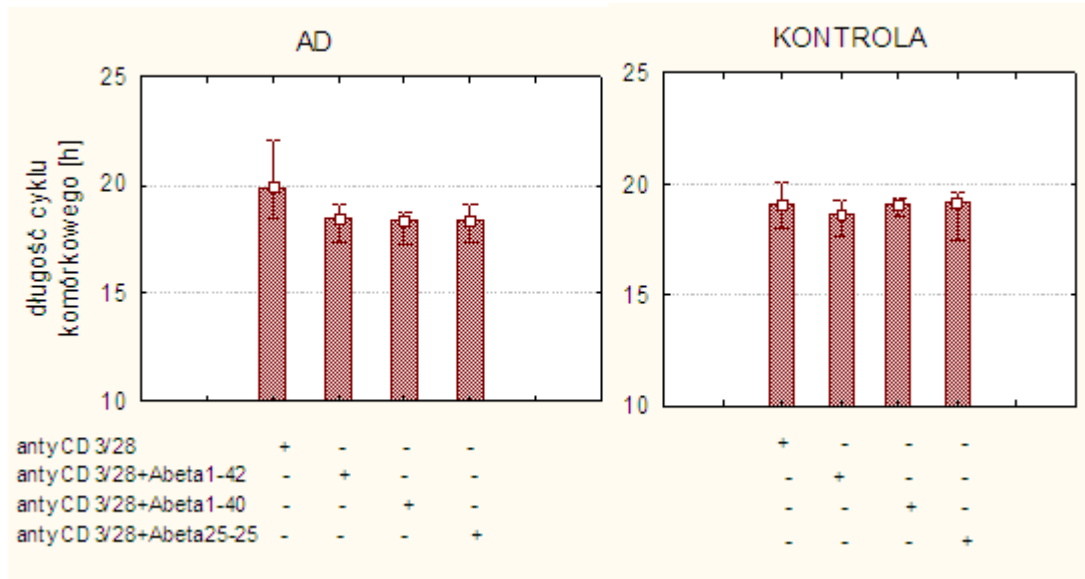
Natomiast czas przejścia z fazy G0 do G1 okazał się wydłużony pod wpływem peptydów jedynie w grupie osób zdrowych, gdzie parametr ten okazał się znamienne większy w rezultacie modulacji działania stymulacji antyCD3 przez A β 1-42, choć różnica ta jest również zauważalna w przypadku peptydów 1-40 i 25-35 mimo nie stwierdzenia znamienności statystycznej. Zmian takich nie zaobserwowano w grupie

osób z AD, w której to peptydy β amyloidu nie powodują zmian w długości przejścia z fazy G0 do G1 w porównaniu ze stymulacją samym przeciwciałem antyCD3 (Rys. 27).



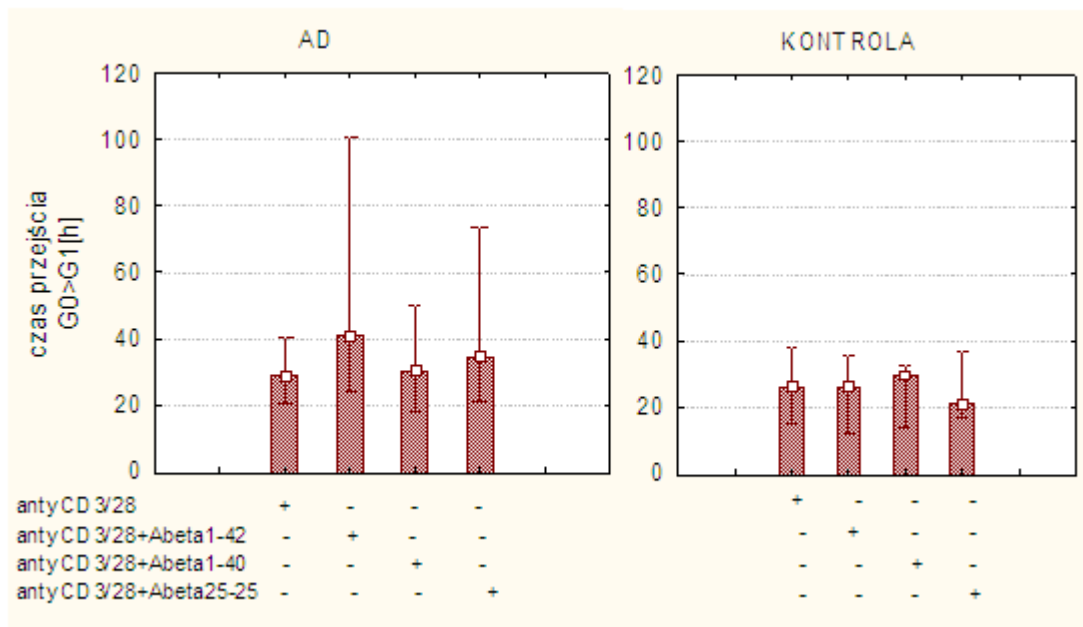
Rys. 27 Wydłużenie czasu przejścia z fazy G0 do G1 w wyniku działania peptydu 1-42 wraz z antyCD3 w porównaniu ze stymulacją samym przeciwciałem w grupie osób zdrowych oraz podobna tendencja w przypadku peptydów 1-40 i 25-35 w tej samej grupie (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona, *-p<0,05; N_K=15; N_{AD}=15).

W przypadku obserwacji potencjalnej modulacji efektu pełnej stymulacji (antyCD3/antyCD28) przez poszczególne peptydy β -amyloidów nie stwierdzono zmian w długości cyklu komórkowego potwierdzonych znamiennością statystyczną, tym niemniej widoczna jest tendencja do skrócenia cyklu komórkowego w obecności peptydów w obu badanych grupach (Rys. 28), podobnie jak miało to miejsce podczas stymulacji antyCD3.



Rys. 28 Nieznamienna statystycznie tendencja do skrócenia długości cyklu komórkowego w wyniku modyfikacji działania stymulacji antyCD3/antyCD28 przez peptydy β -amyloidów w grupie osób z AD nie zaobserwowana w grupie osób zdrowych (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona; $N_K=15$; $N_{AD}=15$)

Podobnie w przypadku działania peptydów 1-42, 1-40 i 25-35 na zmiany w długości czasu przejścia fazy G0 do G1 podczas stymulacji antyCD3/antyCD28 zmian o istotności statystycznej nie wykazano (Rys. 29)



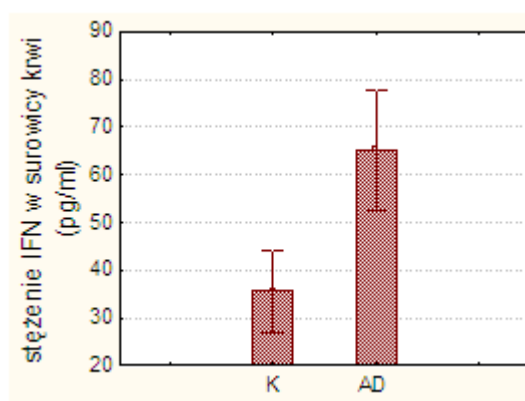
Rys. 29 Brak znamiennych statystycznie zmian w czasie przejścia z fazy G0 do G1 pod wpływem modyfikacji stymulacji antyCD3/28 przez β -amyloidy w obu badanych grupach (na wykresie przedstawiono medianę, a wąsy wyznaczają percentyle; wykorzystano test kolejności par Wilcoxona; $N_K=15$; $N_{AD}=15$).

4.5 Porównanie stężeń cytokin Th1/Th2 w surowicy krwi oraz w supernatantach z hodowli komórkowych stymulowanych przeciwciałem anty CD3 w kostymulacji z A β 1-42.

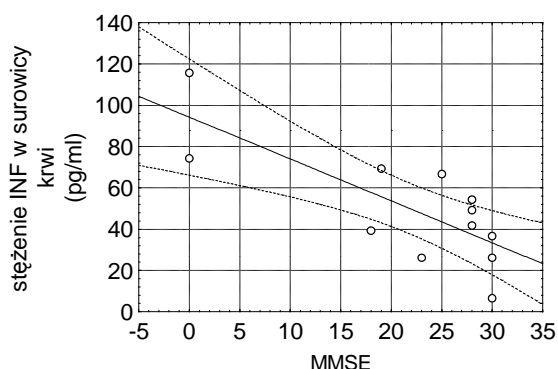
4.5.1 Stężenie cytokin Th1/Th2 w surowicy krwi osób z chorobą Alzheimera w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych

Badaniem objęto sześciuosobową grupę osób chorych oraz tak samo liczną grupę kontrolną, w których to grupach pojawiły się pewne znamienne statystycznie różnice pomimo ich małej liczebności. W początkowym etapie badano stężenia cytokin w surowicy krwi, pacjentów oraz osób z grupy kontrolnej.

Zaobserwowano tendencję do podwyższonego stężenia γ INF w surowicy krwi osób chorych z AD w porównaniu z grupą kontrolną (Rys 30), choć różnica ta nie okazała się być znamienna statystycznie.

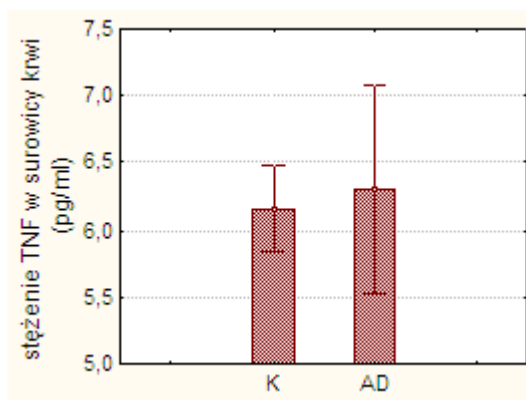


Rys. 30 Nieznamienne statystycznie tendencja w kierunku podwyższonego stężenia INF w surowicy chorych z AD ($p=0,07$) (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$).



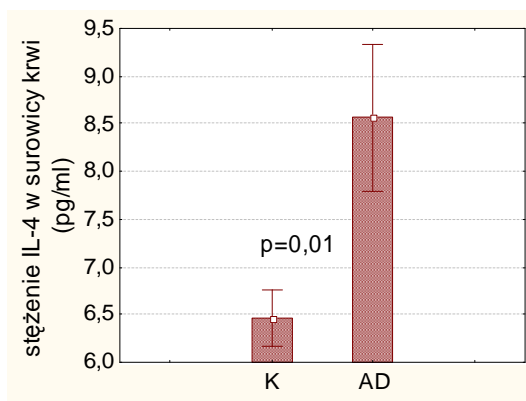
Rys. 31 Ujemna korelacja pomiędzy stężeniem INF w surowicy krwi, a punkcją w teście MMSE, potwierdzona znamiennością statystyczną. Korelację badano w grupie osób z AD wraz z grupą kontrolną osób zdrowych. $N_{AD}=6$, $N_K=6$.

Zbadano również poziom dwóch pozostałych cytokin produkowanych przez limfocyty Th1, TNF i IL-2, lecz w tym przypadku nie zauważono różnic pomiędzy badanymi grupami dla stężenia TNF w surowicy krwi (Rys. 32).



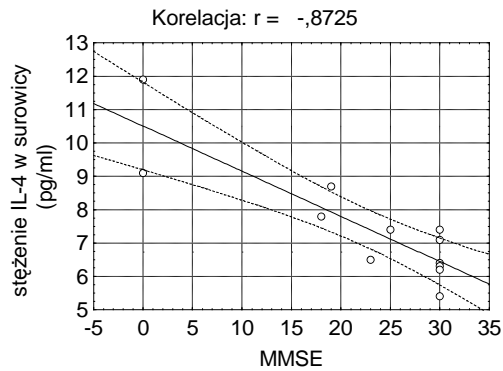
Rys. 32 Porównanie stężenia TNF w surowicy krwi osób z AD oraz osób zdrowych z grupy kontrolnej, które nie wykazało znamienych różnic pomiędzy grupami (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$).

Przy porównaniu stężeń cytokin z grupy Th2 wykazano znamienne podwyższonego poziomu IL-4 u chorych z AD w stosunku do grupy kontrolnej (Rys. 33).



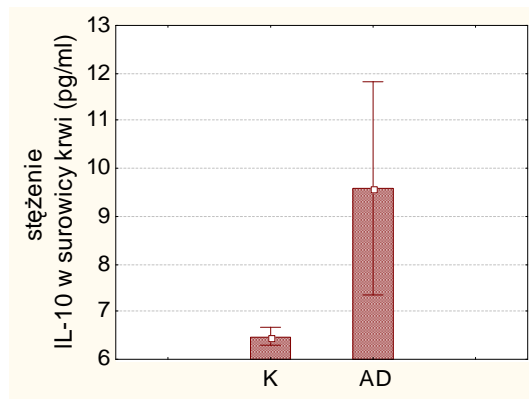
Rys. 33 Znamienne podwyższone stężenie IL-4 w surowicy krwi osób z chorobą Alzheimera w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$).

Wykazano również, że dla badanych grup, stężenie IL-4 we krwi koreluje z liczbą punktów uzyskaną w teście MMSE, czyli z zaawansowaniem choroby i że zależność ta jest odwrotnie proporcjonalna (Rys. 34)



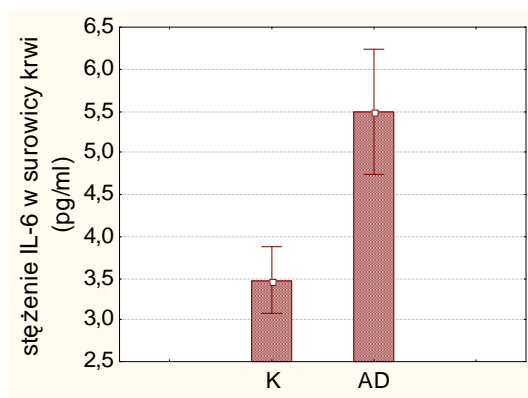
Rys. 34 Ujemna korelacja pomiędzy stężeniem IL-4 w surowicy krwi, a punkcją w teście MMSE, potwierdzona znamiennością statystyczną. Korelację badano w grupie osób z AD wraz z grupą kontrolną osób zdrowych. $N_{AD}=6$, $N_K=6$.

W przypadku IL-10 zaobserwowano różnicę na pograniczu znamienności statystycznej ($p=0,06$) pomiędzy grupą osób z AD w której stężenie tej cytokiny w surowicy krwi było znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych (Rys. 35).



Rys. 35 Podwyższony poziom IL-10 w surowicy krwi osób z AD w porównaniu z grupą osób zdrowych (różnica na pograniczu znamienności statystycznej ($p=0,06$) (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$)

Natomiast dla interleukiny prozapalnej IL-6, wykazano znamienne podwyższone stężenie w surowicy krwi osób z AD (Rys. 36).



Rys. 36 Znamienne wyższe stężenie IL-6 w surowicy krwi osób z chorobą Alzheimera w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$).

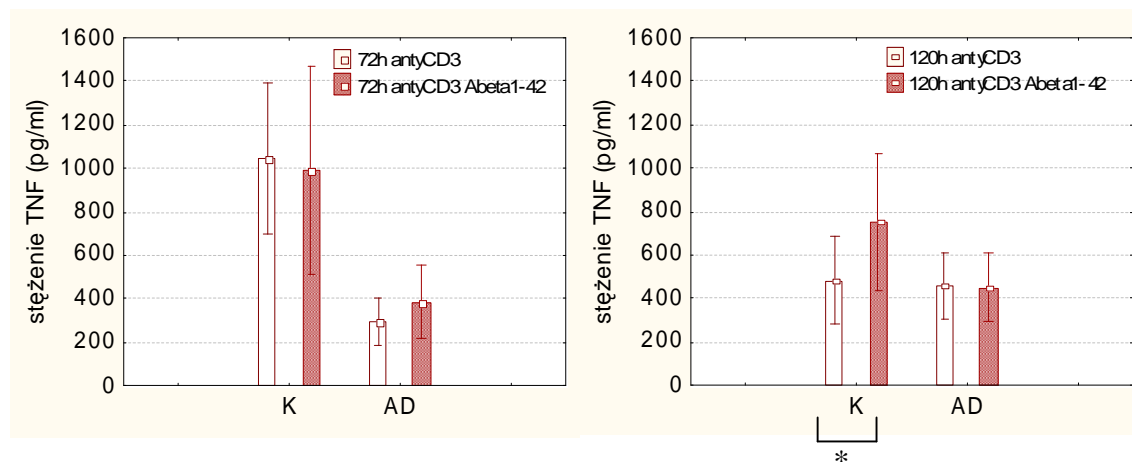
4.5.2 Porównanie poziomu produkcji cytokin Th1/Th2 w wyniku stymulacji przeciwciałem antyCD3 oraz modulacji tej stymulacji przez peptyd A β 1-42 w obu badanych grupach.

Znamienne różnice w dynamice cyklu komórkowego, jakie pojawiają się w wyniku modulacji stymulacji antyCD3 z użyciem β amyloidów, spowodowały, że postanowiono zbadać również czy w badanych grupach produkcja cytokin z grupy Th1/Th2 jest różna. Badano supernatanty hodowlane zbierane znad komórek stymulowanych przez 72 i 120 godzin samym przeciwciałem antyCD3 oraz powyższym przeciwciałem w kostymulacji z peptydem 1-42 i analizowano zmiany w produkcji poszczególnych cytokin z grup Th1/Th2.

Pomimo stosunkowo niewielkich grup badanych, wykazano pewne znamienności statystyczne, które różnią obie grupy pod względem produkcji cytokin.

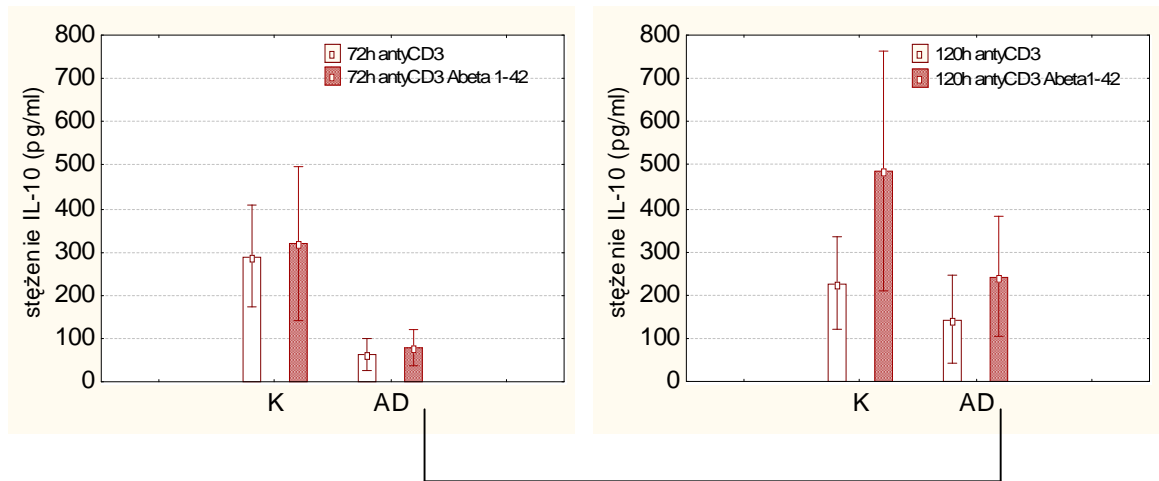
W przypadku stężenia TNF po 72 godzinach stymulacji nie stwierdzono różnic pomiędzy grupą chorych i zdrowych, co zaobserwowano zarówno w supernatantach znad hodowli stymulowanych tylko przeciwciałem antyCD3 jak i tych gdzie do kostymulacji użyto A β 1-42. Podobny wynik przyniosły obserwacje po 120 godzinach hodowli, po których to, nie wykazano statystycznie znamiennych zmian między grupami.

Warto jednak zauważyć, że po 72 godzinach, stężenie TNF w grupie z AD, zarówno w przypadku stymulacji samym antyCD3 jak i modyfikacji tej stymulacji przez A β , jest widocznie niższe w porównaniu z grupą kontrolną, choć obserwacja ta pozostaje nieznamienne statystycznie (Rys. 37).



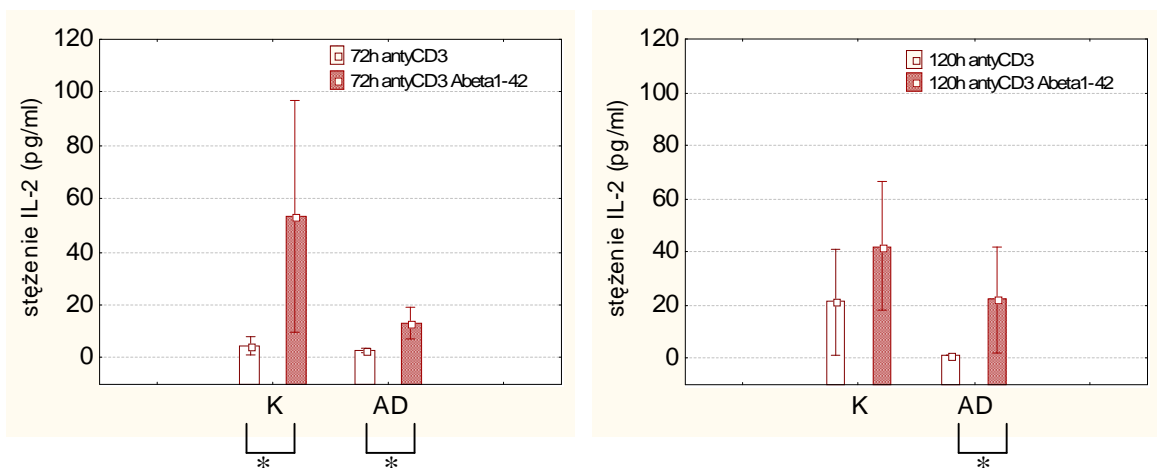
Rys. 37 Znamienne statystycznie podwyższenie stężenia TNF w supernatantach hodowli komórkowych stymulowanych antyCD4+amyloid- β 1-42 w porównaniu ze stymulacją samym antyCD3 po 120 godzinach w grupie osób zdrowych. (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$).

Podobnie w przypadku interleukiny 10, u osób z AD stężenie tej cytokiny w supernatancie zarówno po stymulacji antyCD3 jak i po stymulacji tym przeciwciałem oraz A β 1-42 jest niższe u osób chorych z AD, natomiast różnica ta nie wykazuje znamienności statystycznej. Natomiast po 120 godzinach hodowli w przypadku stymulacji antyCD3 + A β 1-42 zaobserwowano znamienne podwyższenie stężenia tej cytokiny w stosunku do wyniku po 72 godzinach hodowli (Rys. 38).



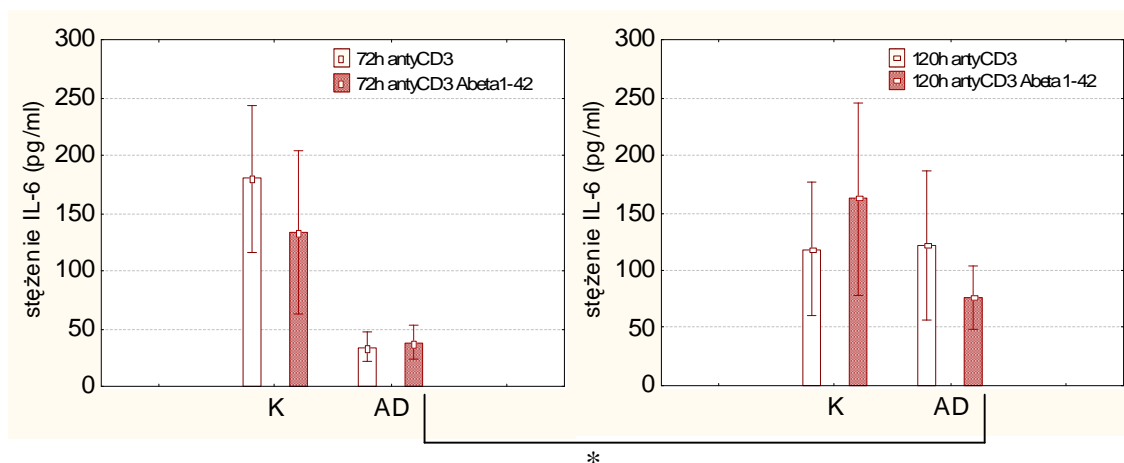
Rys. 38 Znamienne podwyższone stężenie IL-10 w supernatantach hodowli stymulowanych za pomocą przeciwciała antiCD3 i A β 1-42 po 120 godzinach w porównaniu z wynikiem po 72 godzinach w grupie osób z AD. (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$; $*-p<0,05$).

Produkcja interleukiny Il-2 związana jest ściśle z tempem proliferacji komórek, jako, że cytokina ta jest czynnikiem wzrostu limfocytów T. Wykazano, że modulacja stymulacji z użyciem amyloidu 1-42 powoduje zwiększoną produkcję Il-2 zarówno w grupie osób chorych z AD (72 i 120 godzin) jak i w grupie osób zdrowych (72 godziny) (Rys. 39).



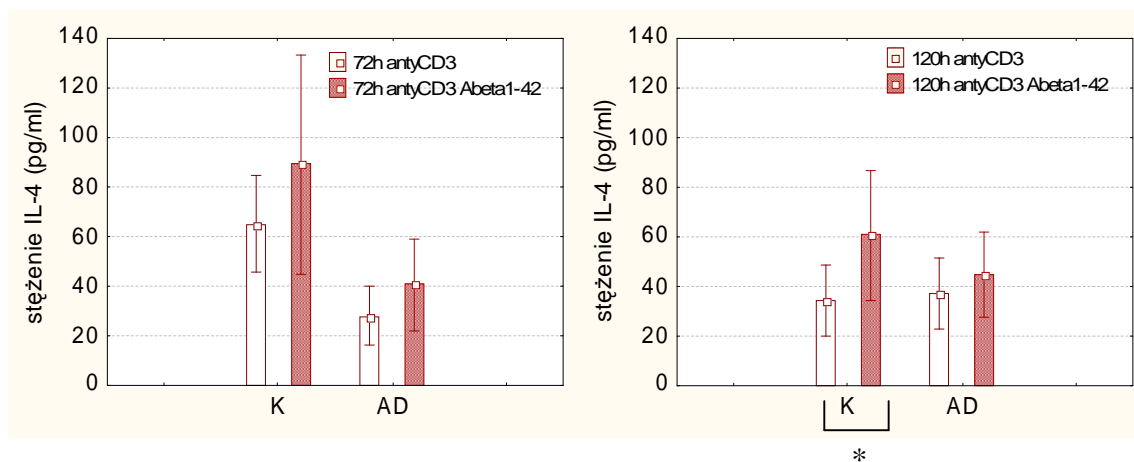
Rys. 39 Znamienne podwyższona produkcja Il-2 w wyniku modulacji stymulacji antiCD3 za pomocą β amyloidu 1-42 zarówno w grupie z AD po 72 i 120 godzinach jak również w grupie osób zdrowych po 72 godzinach. (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$; $*-p<0,05$).

W przypadku interleukiny Il-6, która należy do grupy cytokin odpowiedzialnych za inicjowanie odpowiedzi zapalnej, zauważono, że w grupie osób zdrowych jej stężenie jest wyższe, zarówno po stymulacji antyCD3 jak i antyCD3 i Aβ1-42 po 72 godzinach hodowli, czego nie potwierdzono jednak znacząco statystycznie. Różnica ta po 120 godzinach przestaje być zauważalna w efekcie stymulacji antyCD3, ale nadal utrzymuje się dla antyCD3 + Aβ1-42. Wykazano znaczącą różnicę w stężeniu Il-6 w grupie osób z AD pomiędzy 72 a 120 godzinami stymulacji antyCD3 + Aβ1-42.



Rys. 40 Znacząca różnica pomiędzy stężeniem IL-6 po 72 godzinach stymulacji antyCD3 + β amyloid a 120 godziną stymulacją w grupie chorych z AD (na wykresie przedstawiono średnią ± błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$; *- $p<0,05$).

Badając stężenie Il-4 w obu wariantach stymulacji (antyCD3 i antyCD3+Aβ1-42) po 72 i 120 godzinach hodowli, zauważono, że zarówno w grupie osób z AD jak i osób zdrowych modulacja stymulacji amyloidem β powoduje podwyższenie stężenia tej cytokiny w obu badanych grupach, lecz znacząco statystycznie wykazano jedynie dla grupy kontrolnej i hodowli 120 godzinnej (Rys. 41).



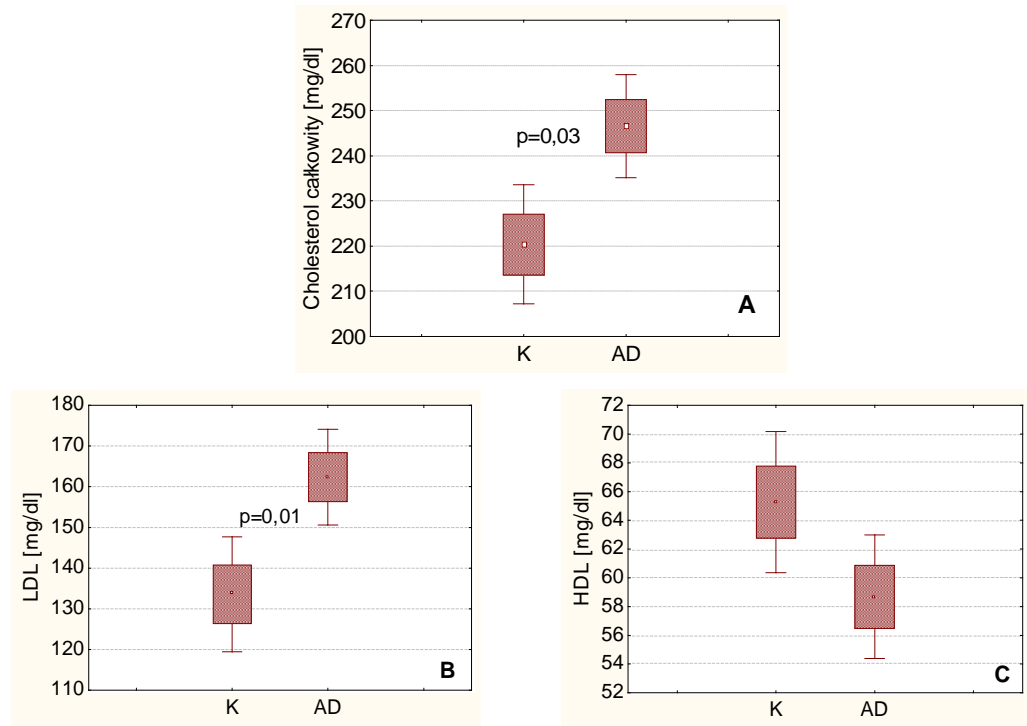
Rys. 41 Znamienne podwyższone stężenie IL-4 w wyniku modulacji stymulacji antiCD3 peptydem β -amyloidu 1-42, w supernatantach 120 godzinnych hodowli komórkowych, w grupie kontrolnej osób zdrowych (na wykresie przedstawiono średnią \pm błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta; $N_{AD}=6$, $N_K=6$; $*-p<0,05$).

4.6 Porównanie poziomu lipidów w surowicy krwi pacjentów z chorobą Alzheimera z grupą kontrolną osób zdrowych oraz próba korelacji tego parametru ze zmianami w cyklu komórkowym oraz poziomem cytokin

4.6.1 Porównanie poziomu lipidów w surowicy krwi pacjentów z chorobą Alzheimera z grupą kontrolną osób zdrowych

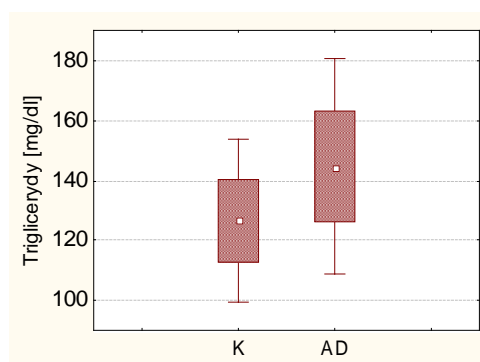
Zgodnie z przesłankami literaturowymi i danymi na temat hipercholesterolemii u pacjentów z chorobą Alzheimera, cała badana grupa była przebadana pod względem całkowitego poziomu cholesterolu, z wyszczególnieniem LDL i HDL oraz poziomem trójglicerydów.

Wyniki w tej części pracy potwierdzają wcześniejsze dane, świadczące o podwyższonym poziomie cholesterolu w grupie chorych (Rys. 42A). Wykazano, że wśród składowych tego parametru podwyższeniu, potwierdzonemu znamiennością statystyczną, ulega stężenie lipidów LDL (Rys. 42B), natomiast nie stwierdzono różnic dotyczących poziomu HLD, a wręcz jego obniżenie w grupie z AD (Rys. 42C).



Rys. 42 Znaczne podwyższenie poziomu całkowitego cholesterolu chorych z AD, potwierdzone znamiennością statystyczną, w porównaniu z grupą osób zdrowych (A). Składowa LDL powoduje znaczne podwyższenie poziomu cholesterolu i jest również znamienne wyższa w grupie chorych (B). Stężenie HLD w surowicy krwi osób z AD jest niezamiennie niższe w porównaniu z grupą kontrolną (na wykresie przedstawiono średnią, ramka przedstawia średnią \pm błąd standardowy, wąsy przedstawiają średnią \pm 1,96*błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta).

Nie stwierdzono natomiast zmian w stężeniu trójglicerydów w surowicy krwi, pomiędzy badanymi grupami, jednakże chorzy z AD wykazują nieco wyższe wartości tego parametru w porównaniu z grupą kontrolną (Rys. 43).

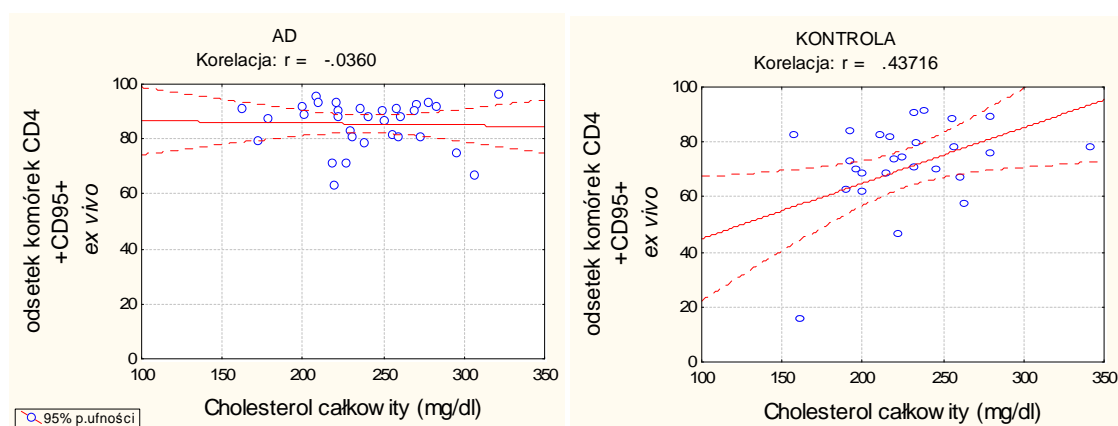


Rys. 43 Brak różnic w stężeniu trójglicerydów pomiędzy grupą osób z AD a grupą kontrolną osób zdrowych (na wykresie przedstawiono średnią, ramka przedstawia średnią \pm błąd standardowy, wąsy przedstawiają średnią \pm 1,96*błąd standardowy; wykorzystano test T-Studenta).

4.6.2 Próba powiązania zmian w postaci podwyższonego poziomu cholesterolu u osób chorych z AD z parametrami dynamiki cyklu komórkowego oraz produkcją cytokin w wyniku odpowiedzi na β amyloidy.

W pracy podjęto próbę skorelowania podwyższonego poziomu cholesterolu ze zmienionym fenotypem limfocytów T, ich odmienną intensywnością odpowiedzi proliferacyjnej na kostymulację z użyciem β amyloidów oraz produkcją cytokin.

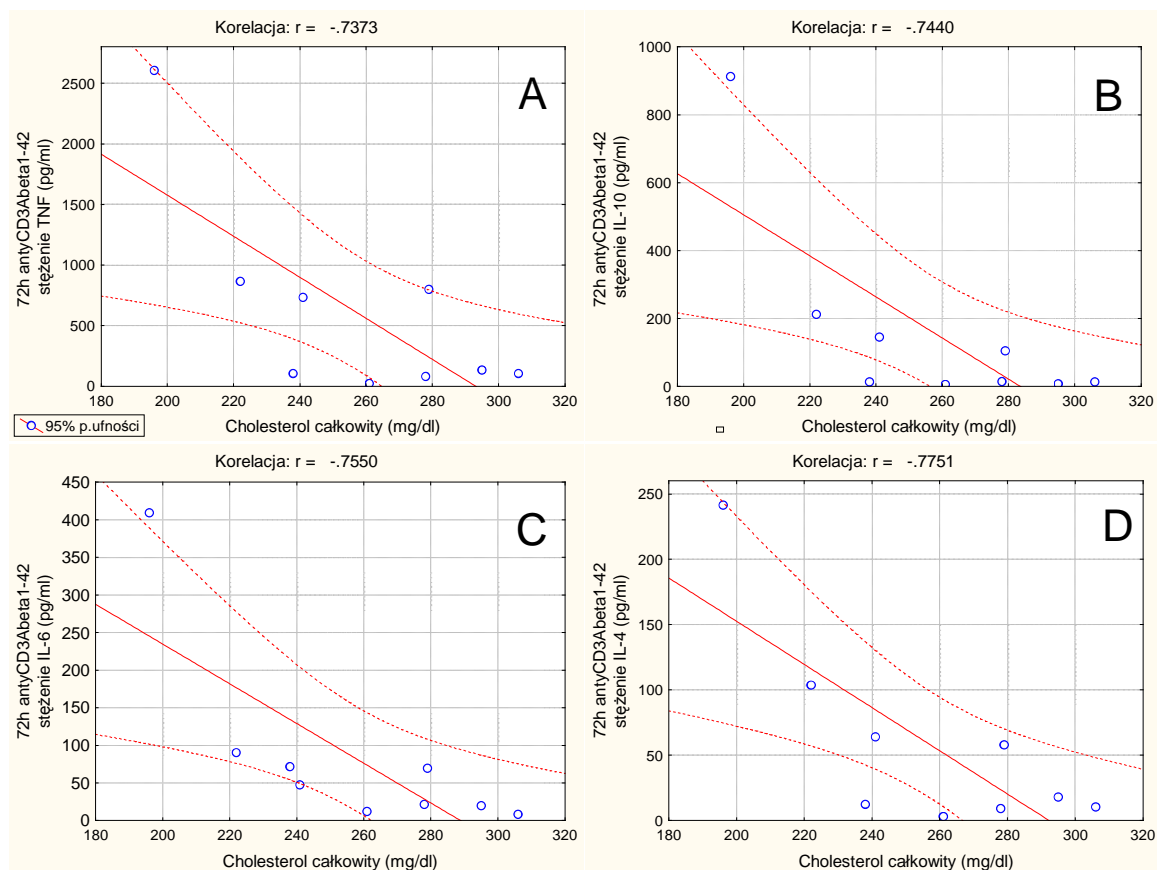
Stwierdzono, lecz jedynie w przypadku grupy kontrolnej, że poziom cholesterolu koreluje z odsetkiem komórek CD4+CD95+ (Rys. 44A), której to obserwacji nie potwierdzono dla chorych z AD (Rys. 44B).



Rys. 44 Korelacja potwierdzona znacząco statystycznie, pomiędzy odsetkiem komórek CD4+CD95+ a poziomem całkowitego cholesterolu w grupie kontrolnej osób zdrowych (A). Brak takiej zależności w grupie osób chorych z AD (B).

Nie stwierdzono żadnych korelacji świadczących o wpływie cholesterolu osoczowego na parametry dynamiki cyklu komórkowego limfocytów CD4+CD28+.

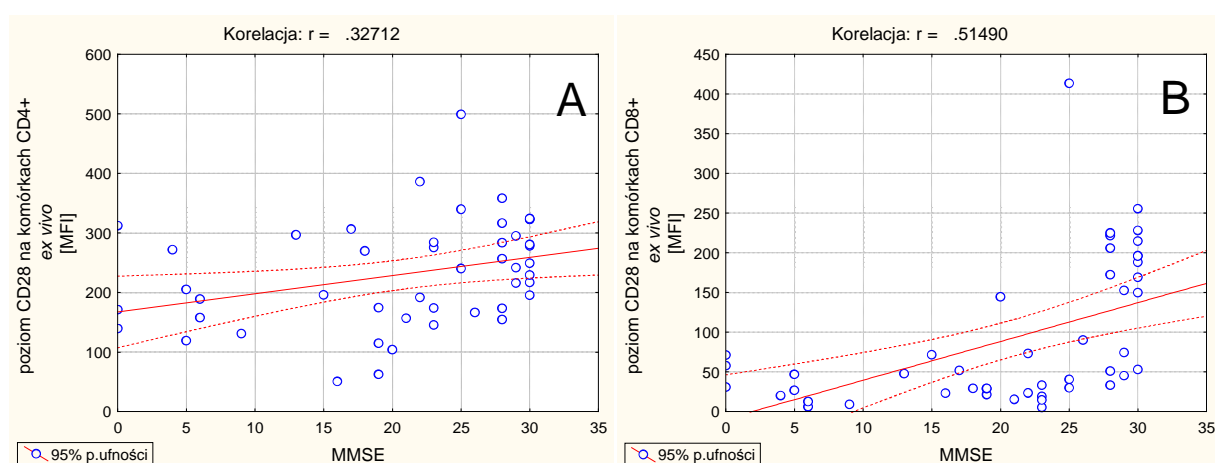
Wykazano natomiast wpływ całkowitego cholesterolu na stężenie cytokin. W przypadku zarówno grupy osób chorych jak i zdrowych osób stanowiących kontrolę potwierdzono ujemną korelację pomiędzy całkowitym stężeniem cholesterolu w osoczu a stężeniem TNF oraz IL-10, IL-6 i IL-4 (Rys. 45).



Rys. 45 Ujemna korelacja pomiędzy całkowitym stężeniem cholesterolu a stężeniem cytokin TNF (A), IL-10 (B), IL-6 (C) oraz IL-4 (D) w supernatantach po 72 godzinnej hodowli stymulowanej antiCD3 w kostymulacji z Aβ 1-42 w obu badanych grupach.

4.7 Analiza korelacji zaawansowania choroby Alzheimera z fenotypem limfocytów *ex vivo* oraz parametrami dynamiki cyklu komórkowego i stężeniem cytokin Th1/Th2 w osoczu i supernatantach hodowlanych.

Zbadano czy zaawansowanie choroby koreluje z parametrami immunologicznymi takimi jak fenotyp *ex vivo*, parametry cyklu komórkowego w poszczególnych rodzajach stymulacji oraz stężenie cytokin w surowicy oraz supernatantach stymulowanych hodowli komórkowych. Zauważono dodatnią korelację pomiędzy poziomem antygenu CD28 na komórkach CD4+ a punktacją uzyskaną w teście MMSE, zarówno w grupie kontrolnej jak i u osób z AD (Rys. 46 A). Podobne wyniki dotyczyły komórek CD8+, na których poziom CD28 korelował dodatnio z punktacją testu MMSE (Rys. 46 B).



Rys. 46 Znamienne statystycznie dodatnia korelacja pomiędzy poziomem antygenu CD28 na komórkach CD4+ (A) i CD8+ (B) u osób w obu badanych grupach.

Nie wykazano zależności pomiędzy zaawansowaniem choroby mierzonym testem MMSE a dynamiką proliferacji limfocytów CD4+CD28+ charakteryzowaną takimi parametrami jak liczba podziałów na komórkę, współczynnik proliferacji, procent dzielących się komórek oraz długość cyklu komórkowego i czas przejścia z fazy Go do G1.

W przypadku pomiaru stężeń cytokin zarówno w osoczu krwi jak i w supernatantach hodowli komórkowych wykazano zależność między punktacją MMSE jedynie dla interleukiny 4, dla których wykazano ujemną korelację (Rys. 34).

Analiza, której celem było zbadanie czy poziom cholesterolu koreluje z parametrami cyklu komórkowego, w szczególności z różną dynamiką proliferacji limfocytów CD4+CD28+ osób z grupy kontrolnej oraz chorych nie wykazała takiej zależności.

5. DYSKUSJA

Choroba Alzheimera należy do schorzeń neurodegeneracyjnych, powodujących upośledzenie funkcji poznawczych i zmiany w obrębie układu nerwowego, tym niemniej zaburzenia w obrębie układu immunologicznego oraz stan zapalny towarzyszący chorobie zostały w przeciągu ostatnich lat gruntownie udokumentowane przez liczne publikacje.

W niniejszej pracy analizowano zmiany fenotypowe limfocytów T *ex vivo*, w krwi pełnej oraz zmiany dynamiki proliferacji komórek CD4+CD28+ w odpowiedzi na stymulację przeciwciałem antiCD3 i mieszaniną antiCD3/antiCD28 jak również na stymulację przeciwciałem antiCD3 w połączeniu w peptydami będącymi fragmentami β amyloidu: 1-42, 1-40 oraz 25-35. Badano również stężenie cytokin Th1/Th2 w surowicy oraz w supernatantach hodowli stymulowanych antiCD3 oraz mieszaniną antiCD3 i β -amyloidu 1-42. Wyniki w niniejszej pracy składają się na konsekwentny obraz zmian dotyczący limfocytów T osób z chorobą Alzheimera, który w tak szerokim aspekcie nie był dotychczas analizowany.

5.1 Zmiany fenotypowe limfocytów T u chorych z AD oraz ich potencjalne znaczenie dla funkcjonalności komórek

W badaniach limfocytów *ex vivo* u chorych z AD stwierdzono obniżony odsetek komórek zarówno CD4+ jak i CD8+ pozytywnych pod względem obecności antygenu CD28 jak również obniżenie ekspresji receptora na powierzchni tych komórek. W literaturze jest niewiele danych na temat ekspresji CD28 na limfocytach CD4 i CD8. W publikacjach które badały ten aspekt, stwierdzono, że poziom antygenu CD28 na komórkach CD3+ u chorych z AD ulega znamiennej podwyższeniu (Lombardi V.R.M. i wsp., 1999), jednocześnie stwierdzając znamienne podwyższenie odsetek komórek CD4+, CD25+ czego w mojej pracy nie wykazałam. Inna praca potwierdza podwyższenie odsetek komórek CD8+CD28+ (Speciale L. i wsp., 2007). W tej pracy autorzy sugerują, że podwyższenie odsetka CD8+CD28+ wskazywać może na aktywację subpopulacji CD8+. W mojej pracy stwierdzono raczej obniżoną liczbę komórek CD4+ i CD8+ z czym wiąże się obniżony poziom antygenu CD28 na tych komórkach, co może być z kolei spowodowane ich stałym kontaktem z potencjalnym

antygenem jakim jest β -amyloid, wzmożoną proliferacją i tzw. 'proliferacyjną starością' związaną ze zwiększoną liczbą podziałów komórkowych (Pawelec G., 1995), którą to potwierdziłam dla populacji CD4+ stymulowanej przeciwciałem antyCD3.

Istnieje wiele doniesień na temat podwyższonej liczby limfocytów T wykazujących znamiona aktywacji u osób z AD, co potwierdziły również wyniki niniejszej pracy. Wykazałam tendencję, niepotwierdzoną znamiennością statystyczną, ale konsekwentną wśród populacji CD4+, do podwyższonego odsetka komórek CD69+ oraz HLA-DR+ u chorych, co stwierdzono również we wcześniej opublikowanych pracach (Ikeda T., 1991; Shalit F. i wsp., 1995). Potwierdziłam, że u pacjentów z AD znamienne wzrasta odsetek komórek CD4+CD95+, wynik, który pojawił się w wielu wcześniejszych pracach, których autorzy sugerują, że wskazuje on na zwiększony poziom apoptozy komórek CD4+ (Lombardi V.R. i wsp., 2004; Richarz E. i wsp., 2002), co może również wyjaśniać niezamiennie obniżony odsetek komórek CD4+, który wykazałam w swojej pracy. Dodatkowo CD95 jest uznawany za marker późnej aktywacji limfocytów T, co mogłoby świadczyć o tym, że komórki CD4+ pacjentów z chorobą Alzheimera są poddawane przewlekłej stymulacji, potencjalnie za pośrednictwem β -amyloidów, co wyjaśnia niezamienne zmiany w poziomie wczesnych markerów aktywacji, takich jak CD69, a znamienne dla CD95. Ponadto wyniki dotyczące populacji komórek T ex vivo wskazują na obniżony odsetek komórek regulatorowych CD4^{low}CD25^{high}, co pozostaje w sprzeczności z wcześniejszymi doniesieniami (Rosenkranz D., 2007). Należy jednak wspomnieć, że w powyższej pracy markerem populacji komórek regulatorowych było białko FoxP3 w komórkach CD4+ natomiast w mojej pracy stwierdziłam obniżenie odsetka komórek o niskiej ekspresji CD4 i wysokiej CD25, nie badając przy tym poziomu wyżej wspomnianego białka, co jest uprawnioną metodą wyznaczania populacji komórek regulatorowych według danych literaturowych (Baecher-Allan C.M. i wsp., 2006).

Podobne zmiany polegające na obniżeniu odsetka populacji komórek regulatorowych definiowanej jako CD4^{low}CD25^{high} wykazano w chorobie Parkinsona (Baba Y. i wsp., 2005), co może dowodzić, że zjawisko takie ma miejsce nie tylko w chorobie Alzheimera, ale też w innych schorzeniach neurodegeneracyjnych.

Powyższe dane sugerują aktywację komórek CD4+, przy jednocześnie obniżonym odsetku komórek CD4+ i CD8+ noszących na swojej powierzchni antygen CD28.

Analogiczne zmiany fenotypowe zaobserwowano w starzeniu, udowadniając, że zmniejszeniu ulega liczebność populacji komórek CD4+CD28+ i CD8+CD28+ (Goronzy J.J, i wsp. 2003) oraz, że limfocyty CD4 u ludzi w podeszłym wieku wykazują znamiona aktywacji (Pawelec G., 1998), co wiąże się najprawdopodobniej z procesem zapalnym, zjawiskiem, które jak potwierdzono w wielu pracach, towarzyszy starzeniu (Gurven M. i wsp. 2008).

Wykazano zarówno w przypadku stymulacji samym przeciwciałem antyCD3 jak i mieszaniną antyCD3/antyCD28, że odsetek komórek CD4+CD152+ wśród chorych jest znamienne podwyższony w zestawieniu z wynikami dla grupy kontrolnej.

Antygen CD152 jest cząsteczką białkową pojawiającą się na limfocytach w momencie aktywacji (Mueller i wsp. 2000), konkurującą z CD28 o wiązanie ligandów B7.1 i B7.2 na komórkach APC, tym niemniej w niniejszych badaniach nie wykazałam różnic w odsetku komórek CD4+CD28+ pomiędzy grupą z AD a osobami zdrowymi w podeszłym wieku, które okazałyby się znamienne statystycznie.

5.2 Zmiany dynamiki proliferacji komórek CD4+CD28+ u osób z AD i zdrowych w odpowiedzi na modyfikację stymulacji antyCD3 i antyCD3/antyCD28 przez β amyloidy.

Do chwili obecnej zaledwie kilka zespołów zajmowało się badaniami nad potencjalnymi zmianami dynamiki proliferacji limfocytów T u pacjentów z chorobą Alzheimerera, a co za tym idzie istnieje stosunkowo niewiele doniesień na ten temat.

Wszystkie dane dotyczące tego zagadnienia zostały uzyskane z użyciem techniki wykorzystującej inkorporację znakowanej tymidyny jako sposób pomiaru proliferacji komórek. Dodatkowo ze względu na wspomnianą technikę badano całą populację komórek T, bez zróżnicowania na populację CD4 i CD8.

W mojej pracy wykazałam różnice w dynamice proliferacji dla komórek CD4+CD28+ stymulowanych antyCD3 przez 72 godziny (po 120 godzinach nie zaobserwowano tego efektu). Natomiast nie wykazałam takich różnic dla stymulacji w tempie proliferacji mieszaniną antyCD3/antyCD28 mierzonych między innymi liczbą podziałów na komórkę, współczynnikiem proliferacji czy długością cyklu komórkowego pomiędzy grupą z AD a kontrolą w postaci zdrowych ochotników, co potwierdzają doniesienia we wcześniejszych publikacjach (Monsoego A. i wsp., 2003). Obserwacja ta jest spójna z wcześniej opisanym aktywowanym fenotypem limfocytów T osób z AD. Już ex vivo

limfocyty chorych z AD wykazują znamiona wcześniejszej aktywacji. W wyniku stymulacji samym przeciwciałem anty CD3 i ewentualnym sygnałem dostarczanym ze strony komórek znajdujących się wśród PBMC (takich jak np. monocyty), limfocyty CD4+CD28+ chorych reagują silniej niż te od osób zdrowych.

Nie stwierdziłam natomiast żeby same peptydy β -amyloidu 1-42, 1-40 oraz 25-35, stymulowały badane przeze mnie komórki do proliferacji. W niektórych wcześniejszych pracach taki efekt amyloidów został wykazany (Monsoego A. i wsp. , 2003, Trieb K. i wsp., 1995).

Od momentu wynalezienia szczepionki stosowanej u chorych z AD oraz jej zgubnych efektów dla niektórych pacjentów (około 8%), u których efektem jej podania była silna odpowiedź zapalna prowadząca do aseptycznego zapalenia opon mózgowych i mózgu, zaczęto bardziej intensywnie badać obwodową odpowiedź limfocytów T, które mogły być potencjalnymi sprawcami takiego stanu.

Istnieją badania udowadniające, że krążące limfocyty T są w stanie rozpoznawać peptydy będące produktami metabolizmu białka APP oraz reagować na nie. Taką odpowiedź w postaci zwiększonej proliferacji komórek T mierzonej z użyciem metody inkorporacji znakowanej tymidyny wykazano zarówno w populacji młodych jak i starszych osób zdrowych, ale nie potwierdzono tego efektu u osób z AD (Trieb K. i wsp., 1995).

W dość szerokim ujęciu zagadnienie reaktywności limfocytów T w odpowiedzi na β -amyloid zostało zaprezentowane w pracy Monsoego pochodzącej z 2003 roku (Monsoego A. i wsp., 2003). Wykazano w niej, że limfocyty T osób zdrowych oraz chorych z AD nie mają zróżnicowanego tempa proliferacji w odpowiedzi na stymulację antyCD3/antyCD28 oraz na GA (octan glatirameru), peptydu stosowanego w tym przypadku jako niespecyficzny stymulator limfocytów T. Stwierdzono natomiast reakcję komórek T na peptydy 1-42 i 1-40, z zaznaczeniem, że ten pierwszy jest bardziej immunogeny. Podobnie jak wcześniejsze badania, te również mierzyły intensywność proliferacji metodą inkorporacji znakowanej tymidyny.

W wynikach opisywanych w niniejszej pracy nie potwierdzono żeby same β -amyloidy były w stanie wywoływać odpowiedź proliferacyjną limfocytów CD4+CD28+. Podobne wyniki pojawiły się wcześniej (Baril L. i wsp., 2004) i mówiły o braku odpowiedzi ze strony komórek T na amyloidy, choć pomiar proliferacji został wykonany z użyciem inkorporacji znakowanej tymidyny.

Pomimo szeregu publikacji podejmujących temat ewentualnych zmian w kinetyce proliferacji limfocytów T osób chorych z AD, zarówno pod wpływem niespecyficznego dla tego schorzenia symulantów jak i charakterystycznych dla AD amyloidów, brak jest spójnych danych, które składałyby się na jednolity obraz takich modyfikacji w układzie immunologicznym.

Badania koncentrujące się na potencjalnym stymulującym wpływie β amyloidów prowadzone są od ponad 10 lat i dotyczyły oprócz monitorowania limfocytów również komórek dendrytycznych i linii komórkowych.

Jedne z najwcześniejszych doświadczeń odnosiły się do komórek dendrytycznych i stawiały sobie za cel odpowiedź na pytanie czy mogą one przetwarzać β amyloid. Analizując obrazy z mikroskopu elektronowego oraz produkcję TNF α i powierzchniową ekspresję CD18, CD11a i CD11b nie stwierdzono żadnych zmian pod wpływem peptydu 25-35 (Schmitt T. L. i wsp., 1996). Należy jednak podkreślić, że badania prowadzone były na komórkach dendrytycznych z krwi obwodowej osób zdrowych, o średniej wieku 23 lata, a do tego w bardzo mało licznej grupie (6 osób).

W tym samym czasie prowadzono badania na linii komórkowej wywodzącej się ze szczurzego guza chromochłonnego kory nadnerczy (PC12), które wykazały, że już w nanomolarnych stężeniach fragment β amyloidu 1-42, 1-40 jak również część 25-35, w swoich monomerycznych formach, są w stanie stymulować podziały komórkowe, przy czym pomiar proliferacji przeprowadzony został przez liczenie komórek oraz badanie stężenia białka w supernatantach komórkowych (Luo Y., 1996).

W moich badaniach nie stwierdziłam, żeby komórki CD4+CD28+ osób chorych z AD i osób z grupy kontrolnej reagowały w zróżnicowany sposób na stymulację mieszaniną przeciwciał antyCD3/antyCD28 podobnie jak w opisywanej wcześniej pracy. Natomiast nie potwierdziłam stymulującego efektu β amyloidów, który wywoływałby reakcję proliferacyjną badanych przeze mnie komórek. Może się to wiązać z wybraną przeze mnie techniką pomiaru (Rozdział 4.5.1), która nigdy wcześniej nie była używana w tego rodzaju badaniach, a która oprócz pomiaru szeregu parametrów cyklu komórkowego (liczba podziałów na komórkę, współczynnik proliferacji, długość cyklu komórkowego, czas przejścia fazy G0 do G1) umożliwia jednocześnie śledzenie fenotypu komórek.

W wybranym przez mnie modelu doświadczalnym wykazałam natomiast modulację odpowiedzi określonych fenotypowo komórek T (CD4+CD28+) stymulowanych antyCD3 oraz antyCD3 w połączeniu z antyCD28 przez β -amyloidy.

Według przedstawionych przeze mnie wyników badane amyloidy (1-42, 1-40, 25-35) modulują stymulację przeciwciałem antyCD3 dopiero po 120 godzinach hodowli. Podobną prawidłowość wykazano dla modulacji stymulacji antyCD3/antyCD28 przez peptydy 1-42 i 25-35 jednakże dotyczyła ona jedynie grupy osób chorych z AD, a nie wykazała znamionności statystycznej w przypadku osób zdrowych.

Natomiast współczynnik proliferacji znamienne wzrasta w obu badanych grupach pod wpływem kostymulacji antyCD3 oraz antyCD3/antyCD28 z użyciem stosowanych peptydów, co jest bardziej zauważalne w grupie z AD.

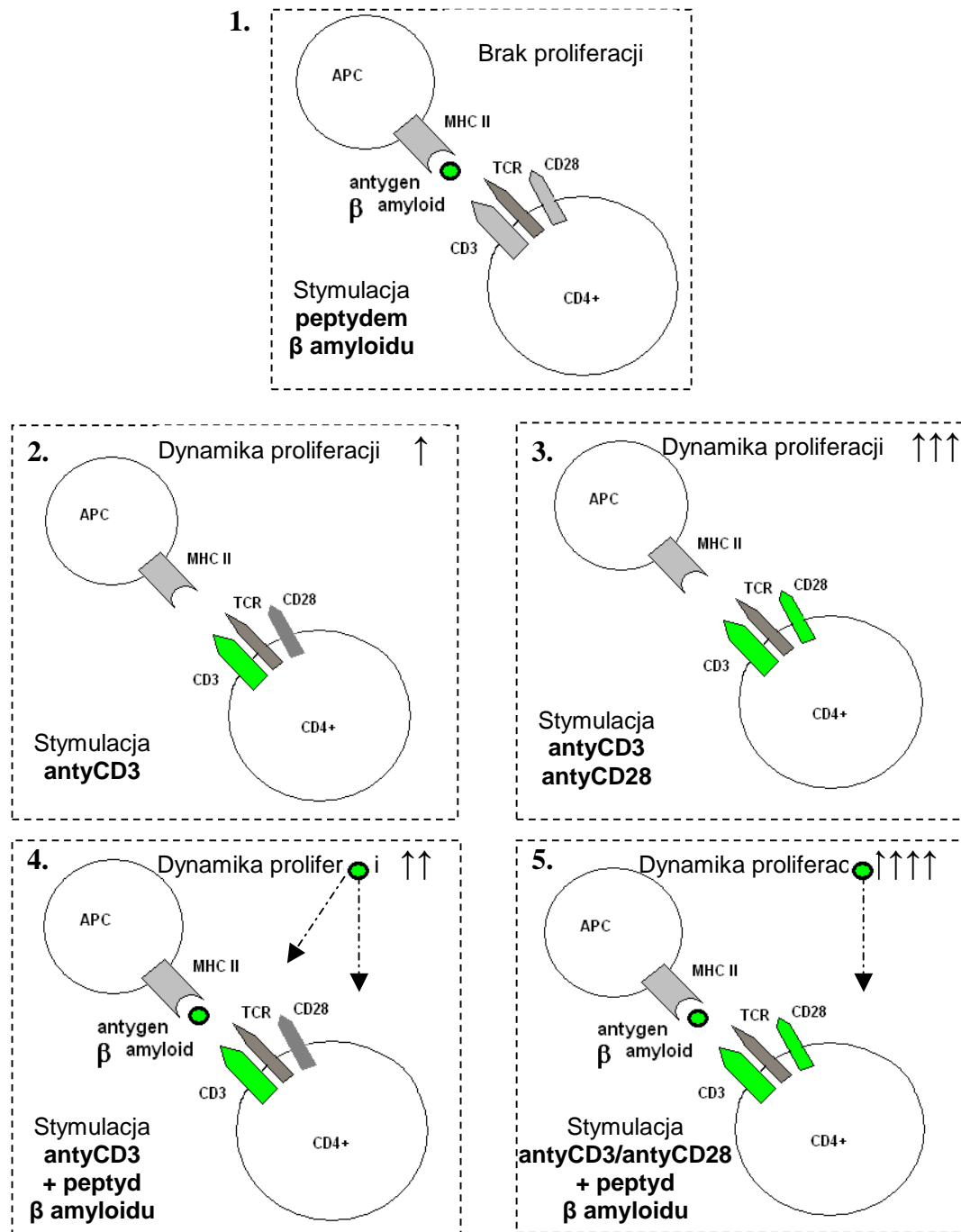
Analizując procent proliferujących komórek stymulowanych antyCD3 stwierdziłam, że po 72 godzinach wzrasta on pod wpływem wszystkich 3 peptydów jedynie w grupie osób z AD, natomiast po 120 godzinach modulacja ta obserwowana jest również u zdrowych. Podobnie w przypadku stymulacji antyCD3/antyCD28 zmiany świadczące o modulującym tempie proliferacji efekcie peptydów po 72 godzinach zauważalne są tylko w grupie chorych, natomiast po 120 godzinach efekt ten obserwować też można w przypadku komórek zdrowych ochotników. Wcześniejszy efekt modulacji (następujący już po 72 godzinach), odpowiedzi proliferacyjnej stymulowanych limfocytów CD4+CD28+ u chorych z AD może być konsekwencją stanu aktywacji tych komórek już na wstępie, potencjalnie spowodowanym dostępnością β amyloidu, który może działać jako antygen.

Wykazano też zmiany w długości cyklu komórkowego, który ulega skróceniu w wyniku modulacji stymulacji przez β amyloid (Rys. 26), natomiast długość przejścia z fazy G0 do G1 okazała się być wydłużona tylko dla grupy zdrowych w przypadku amyloidu 1-42.

Należy zaznaczyć, że na nie uzyskanie znamionności statystycznej świadczącej o modulacji kinetyki cyklu komórkowego przez badane peptydy w wielu przypadkach wpłynęły duże rozrzuty wyników wewnątrz porównywanych grup, tym niemniej na przedstawionych wykresach można zauważyć konsekwentne trendy w kierunku zwiększania liczby podziałów na komórkę, podwyższania współczynnika proliferacji i skracania cyklu komórkowego pod wpływem wykorzystanych peptydów.

Potwierdzono, więc, że peptydy β -amyloidów i to zarówno te wchodzące w skład blaszek starczych (1-42 i 1-40) jak i toksyczny 25-35 są w stanie (przynajmniej in vitro) zmieniać dynamikę proliferacji stymulowanych limfocytów CD4+CD28+ zarówno w grupie osób z AD jak i u zdrowych ludzi w podeszłym wieku w badanym modelu doświadczalnym.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń sugerują, że β amyloidy mogą działać jako kostymulatory, ale same nie wywołują stymulacji limfocytów do proliferacji (Rycina 5).



Rycina 5. Model przedstawiający zależność pomiędzy kinetyką proliferacji limfocytów CD4+CD28+ mierzoną liczbą podziałów na komórkę oraz współczynnikiem proliferacji, a rodzajem stymulacji. Intensywność stymulacji została przedstawiona za pomocą strzałek. Na zielono zaznaczono stymulowane bezpośrednio receptory lub udział antygeny - peptydu β amyloidu.

W pracy nie stwierdzono żeby same β amyloidy działały jako stymulator podziałów komórkowych limfocytów CD4+CD28+. Potencjalny efekt pobudzenia odpowiedzi proliferacyjnej w wykorzystanym układzie doświadczalnym mógłby polegać na przetwarzaniu peptydu β -amyloidu przez komórki APC oraz późniejszej prezentacji antygeny. Brak stymulacji może się wiązać ze zbyt małą liczbą komórek specyficznych w stosunku do tego antygeny. Wyniki udowadniają natomiast, że peptydy 1-42, 1-40 oraz 25-35 modulują proliferację stymulowanych komórek CD4+CD28+, zwiększając ją. Taki mechanizm, zdaje się nie być związany z samą prezentacją antygeny, jako że po stymulacji receptorów zarówno CD3 jak i CD28 mieszaniną skierowanym przeciwko nim przeciwciał, powyższy efekt jest nadal obserwowany. Może on być natomiast spowodowany mechanizmem pośrednim polegającym na zmienionej funkcjonalności kanałów wapniowych, co zostało potwierdzone dla komórek mikrogleju (McLarnon J.G., 2005) jak również dla limfocytów (Eckert A., 1997) bądź kanałów potasowych (Gu Q.B. 2004). Obserwowany efekt może być też wynikiem działania cytokin, których produkcja ulega zmianie pod wpływem β amyloidów, co wykazano dla IL-2, której stężenie w wyniku modulacji stymulacji antyCD3 przez peptyd 1-42 ulega znaczącemu zwiększeniu (Rys. 39).

5.3 Różnice w stężeniu cytokin Th1/Th2 w surowicy krwi oraz w supernatantach hodowli stymulowanych antyCD3 i β amyloidem 1-42 oraz ich powiązanie ze zmianami dynamiki cyklu komórkowego

Wiele publikacji podejmuje temat różnic dotyczących stężenia cytokin zarówno w surowicy jak i płynie mózgowo rdzeniowym chorych z AD w porównaniu ze zdrowymi w podeszłym wieku, jednakże jak zostało wspomniane we wstępie dane na ten temat pozostają sprzeczne.

W mojej pracy stwierdzono, że w surowicy krwi chorych z AD dochodzi do podwyższenia stężenia IL-4, co zostało potwierdzone znacząco statystycznie, natomiast w przypadku INF γ , IL-6 i IL-10 pozostało tendencją niepotwierdzoną statystycznie. W literaturze istnieją publikacje, które dokumentują podwyższone stężenie cytokin prozapalnych w surowicy pacjentów w porównaniu z grupą zdrowych (Beloosesky Y. i wsp., 2002), tym niemniej istnieją również takie, w których różnic takich nie potwierdzono (Bonotis K., 2008).

W związku z efektem amyloidu, który jako kostymulant powoduje podwyższenie parametrów proliferacji w obu badanych grupach w stosunku do stymulacji jedynie przeciwciałem antyCD3, zbadano również stężenie poszczególnych cytokin Th1 i Th2 w supernatantach po hodowli. Jako, że wśród 3 badanych peptydów, według wcześniejszych doniesień (Monsoego A. i wsp., 2003) najbardziej immunogennym jest 1-42, a w pracy tej stwierdzono, że wszystkie 3 modulują proliferację pod wpływem wcześniejszej stymulacji w porównywalny sposób, do pomiarów stężenia cytokin wybrano supernatanty po hodowli z antyCD3 i Aβ1-42.

Wcześniejsze publikacje badały stężenie cytokin wynikające z odpowiedzi komórek PBMC na różne stymulanty. W wyniku stymulacji PHA (fitohemaglutynina) obserwowano znamienne podwyższony poziom IL-2 oraz INF- γ u chorych z AD w porównaniu z grupą kontrolną (Huberman M. i wsp., 1994), Podobne wyniki uzyskała grupa, która do stymulacji PBMC użyła LPS (lipopolisacharyd) i wykazała, że w wyniku tej stymulacji w grupie chorych obserwowany jest znamienne wyższy poziom IL-1beta, IL-6, TNF-alfa i IL-10 (Lombardi V. R., 1999). Jedyna praca, w której jako stymulant stosowano peptydy amyloidów, jednakże nie na samych komórkach PBMC chorych z AD, a liniach się z nich wywodzonych, mówiła, że obserwować tu można zarówno profil cytokin charakterystyczny dla Th1 jak i dla Th2. W innej pracy jasno postuluje się obniżenie odpowiedzi typu Th1 na rzecz podwyższenia poziomu cytokin właściwych dla Th2 (Town T. i wsp., 2002) jednakże ta praca została przeprowadzona na myszach immunizowanych z użyciem peptydów β amyloidów.

W pracy wykazano, że peptyd 1-42 powoduje podwyższoną produkcję IL-2 w stosunku do pomiarów w supernatantach komórek stymulowanych tylko przeciwciałem antyCD3 bez amyloidu. We wcześniejszych publikacjach nie badano produkcji IL-2 pod względem jej modulacji przez amyloid. W pracy, w której badano profil cytokin wydzielanych pod wpływem LPS, w tym stężenie IL-2 wykazano jedynie, że u osób z AD produkcja jest większa, których to zmian pomiędzy grupami nie wykazałam, zarówno dla stymulacji samym przeciwciałem antyCD3 jak i antyCD3 z peptydem 1-42.

Zaobserwowano, że pod wpływem peptydu 1-42 istnieje tendencja do wzrostu produkcji IL-10 oraz IL-4 zarówno w grupie osób z AD jak i zdrowych, czego jednak nie potwierdzono znamiennością statystyczną, natomiast dla TNF nie zaobserwowano żadnych wyraźnych tendencji. Prawdopodobnym jest, że pod wpływem β amyloidu, komórki limfocytów uruchamiają mechanizmy uczestniczące w procesie zapalnym,

które zaraz potem kompensowane są przez mechanizmy mające na celu zapobieganie temu procesowi. Stąd w wyżej opisanych wynikach brak wyraźnej odpowiedzi, czy pod wpływem peptydu 1-42 limfocyty wykazaną pro czy antyzapalny profil produkcji cytokin.

5.4 Próba powiązania podwyższonego poziomu cholesterolu u osób z AD ze zmianami fenotypu oraz kinetyki proliferacji komórek T.

W grupie osób z chorobą Alzheimera wykazałam podwyższony poziom całkowitego cholesterolu oraz LDL w surowicy krwi w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi w szeregu wcześniejszych prac (Borroni B. i wsp., 2006, Sjögren M. i wsp., 2006). Dotychczas nie podjęto jednak próby powiązania hipercholesterolemii w AD ze zmianami w układzie immunologicznym.

Udowodniono, że podwyższony poziom cholesterolu wiąże się z nasiloną odpowiedzią typu Th2 ze strony limfocytów T (Robertson A. K. L., 2004). Taka obserwacja wydaje się być z kolei zgodna z wynikami mówiącymi o przewadze cytokin właściwych dla profilu Th2 limfocytów T, pod wpływem peptydu 1-42 (Town T., 2002, Agadjanyan M.G. i wsp., 2006). W moich badaniach pomimo znamienne podwyższonego stężenia całkowitego cholesterolu we krwi, nie wykazałam żeby któryś z profilów wydzielanych cytokin, Th1 bądź Th2 miał przewagę. Wykazałam natomiast zależność pomiędzy poziomem cholesterolu a procentem komórek CD4+CD95+ w grupie kontrolnej osób zdrowych. Wraz ze wzrostem poziomu cholesterolu w populacji komórek CD4+ zwiększeniu ulega odsetek tych, które na swojej powierzchni posiadają receptor CD95. Zwiększona obecność tego antygenu, będącego receptorem dla białka FasL, które jest inicjatorem apoptozy, może świadczyć o większej podatności tych komórek na uleganie procesowi 'programowanej śmierci'. Zjawiska takiego nie obserwujemy u osób z AD, u których zarówno całkowite stężenie cholesterolu jak i sam odsetek komórek CD4+CD95+ są znamienne wyższe. Taka sytuacja może wskazywać, że powyżej pewnych wartości stężenia cholesterolu (bardziej typowych dla osób chorych na AD) jego wpływ na odsetek komórek CD4+CD95+ przestaje być zauważalny, a wysokie stężenia cholesterolu nie mają wpływu na zwiększanie odsetka tych komórek.

Nie zaobserwowano żadnych korelacji pomiędzy stężeniem cholesterolu, a parametrami cyklu komórkowego. Może być to wynikiem tego, że nie badano samych trawek

lipidowych będących strukturami związanymi z receptorami powierzchniowymi na limfocytach T, a jedynie poziom cholesterolu w surowicy, który to nie ma przełożenia na funkcję tych struktur i ich związek z sygnalizacją komórek T.

6. PODSUMOWANIE

W świetle przedstawionych w tej pracy wyników można stwierdzić, że limfocyty T pacjentów z chorobą Alzheimera wykazują już na samym wstępie pewien poziom aktywacji czego nie obserwuje się u osób zdrowych. Znamionami tego faktu są zarówno zmiany fenotypowe dotyczące zwiększonego procenta komórek CD4+, które mają na swojej powierzchni antygeny aktywatorowe, jak i fakt, że w wyniku stymulacji przeciwciałem antyCD3 tempo proliferacji komórek CD4+CD28+ u chorych jest znamienne wyższe w porównaniu z grupą osób zdrowych. Konsekwencją tych zmian może być również wcześniejsza reakcja na modulację stymulacji przeciwciałem antyCD3 przez peptydy β amyloidów, która u chorych ma miejsce już po 72 godzinach natomiast w grupie osób zdrowych jest zauważalna dopiero po 120 godzinach.

Limfocyty CD4+ oraz CD8+ pacjentów z chorobą Alzheimera wykazują obniżony odsetek komórek pozytywnych pod względem receptora CD28. Taka obserwacja może być związana ze starzeniem proliferacyjnym tych komórek, które, być może przez stały dostęp do antygeny jakim jest β amyloid, bądź też w wyniku mniej bezpośredniego mechanizmu, ulegają większej liczbie podziałów komórkowych wykazując oznaki typowe dla komórek 'starych' pod względem swojej historii proliferacyjnej.

W pracy wykazano, że w obu badanych grupach, β amyloidy działają jako modulatory odpowiedzi proliferacyjnej wcześniej stymulowanych komórek CD4+CD28+, a nie jako mitogeny. Nie ma jednak jasności jaki mechanizm stoi za tym zjawiskiem. Odpowiedzialne za ten stan rzeczy mogą być cytokiny, takie jak IL-2, która, jak udowodniono w tej pracy, pod wpływem modulacji stymulacji przez β amyloidy, jest wydzielana w zwiększonym stężeniu.

Potwierdzono, tak jak miało to miejsce w szeregu wcześniejszych doniesień, zwiększone stężenie całkowitego cholesterolu w surowicy krwi osób z AD, które udało się skorelować z podwyższonym odsetkiem komórek CD4+CD95+ oraz zmniejszoną produkcją cytokin, co może wpływać na kondycję układu odpornościowego osób chorych. Wiadomym jest, że hipercholesterolemia jaką potwierdzono w chorobie Alzheimera, może sama w sobie być przyczyną upośledzenia funkcji układu odpornościowego (Martens G.W., 2008).

7. WNIOSKI

1. Limfocyty CD4+ osób z chorobą Alzheimera wykazują fenotyp aktywacyjny
2. Peptydy β amyloidów nie wykazują same w sobie mitogennego działania na limfocyty CD4+CD28+ zarówno osób chorych z AD jak i osób zdrowych
3. Peptydy β amyloidów wykazują działanie modulujące tempo proliferacji zaktywowanych limfocytów CD4+CD28+ oraz powodują podwyższając produkcję IL-2
4. W surowicy osób chorych z AD stwierdza się podwyższone stężenie LDL oraz całkowitego cholesterolu, co koreluje ze zmianami w funkcjonowaniu limfocytów T

8. LITERATURA

Barcikowska M., Bilikiewicz A., 2004. Choroba Alzheimerera w teorii i praktyce klinicznej. Lublin 2004, wyd. 1

Selkoe D.J., Citron M, Diehl T.S., Gordon G., Biere A.L., Seubert P., 1996. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(23):13170-5.

Saitoh T., Li H.L., Roch J.M., Sundsmo M., Otero D., Sisodia S., Thomas R. 1997 Defective neurite extension is caused by a mutation in amyloid beta/A4 (A beta)protein precursor found in familial Alzheimer's disease. J Neurobiol. (5):469-80.

Wang B., Yang L., Wang Z., Zheng H., 2007. Amyloid precursor protein mediates presynaptic localization and activity of the high-affinity choline transporter. Proc Natl Acad Sci USA 104 (35):14140-5.

Neve R. L., McPhie D. L., Chen Y., 2000. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. Brain Research 886: 54-66

Johnston J. A., Liu W. W., Todd S. A., Coulson D. T., Murphy S., Irvine G. B., Passmore A. P., 2005. Expression and activity of beta-site amyloid cleaving enzyme in Alzheimer's disease. Biochem Soc Trans. 33: 1096-1100.

Citron M., Diehl T.S., Gordon G., Biere AL, Seubert P, Selkoe DJ. 1996. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. Proc Natl Acad Sci U S A. 12;93(23):13170-5.

Mattson M.P. 1992. Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry. Exp Gerontol. 27(1):29-49.

Maccioni R.B., Rojo L.E., Fernández J.A., Maccioni A.A., Jimenez J.M., 2008. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res.*39(1):1-16.

Poirier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P., Gauthier S. 1998. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.* 18;342(8873):697-9.

Strittmatter W.J. Schmechel D.E., Saunders A.M., Crain B.J., Hulette C.M., Joo S.H., Pericak-Vance M.A., Goldgaber D., Roses A.D. 1993 Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(20):9649-53.

Cruts M., van Duijn C.M., Backhovens H., Van den Broeck M., Wehnert A., Serneels S., Sherrington R., Hutton M., Hardy J., St George-Hyslop P.H., Hofman A., Van Broeckhoven C. 1998. Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study. *Arch Neurol.* 55(7):964-8.

Barcikowska M., Żekanowski C., Styczyńska M., Peptońska B., Gabryelewicz T., Religa D., Ilkowski J., Kijanowska-Haładyna B., Kotapka-Minc S., Mikkelsen S., Pfeffer A., Barczak A., Łuczywek E., Wasiak B., Chodakowska-Zebrowska M., Gustaw K., Łaczkowski J., Sobów T., Kuźnicki J. 2003. Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer's disease in Poland. *Exp Neurol.* :184(2):991-6.

Maat-Schieman M.L., Rozemuller A.J., van Duinen S.G., Haan J., Eikelenboom P., Roos R.A. 1994. Microglia in diffuse plaques in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis(Dutch). An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53(5):483-91.

- Kasper M., Albrecht S., Grossmann H., Grosser M., Schuh D., Müller M. 1995
 Monoclonal antibodies to surfactant protein D: evaluation of immunoreactivity in
 normal rat lung and in a radiation-induced fibrosis model. *Exp Lung Res.* 1995
 21(4):577-88.
- Paresce D.M., Ghosh R.N., Maxfield F.R. 1996. Microglial cells internalize aggregates
 of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron.*
 17(3):553-65.
- Strittmatter W.J., Roses A.D. 1995. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl
 Acad Sci U S A.* 1995 May 23;92(11):4725-7.
- Gaskin F., Finley J., Fang Q., Xu S., Fu S.M. 1993. Human antibodies reactive with
 beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *J Exp Med.*
 1;177(4):1181-6.
- Grubeck-Loebenstien B. Schmitt T.L., Steger M.M., Pavelka M. 1997.
 Interactions of the Alzheimer beta amyloid fragment (25-35) with peripheral blood
 dendritic cells. *Mech Ageing Dev.* 94(1-3):223-32.
- Schmitt T.L., Steiner E., Trieb K., Grubeck-Loebenstien B.
 Amyloid beta-protein(25-35) increases cellular APP and inhibits the secretion of APPs
 in human extraneuronal cells. *Exp Cell Res.* 1997 234(2):336-40.
- Finch C. E., Morgan T. E., 2007. Systemic inflammation, ApoE alleles, and Alzheimer
 disease: a position. *Curr Alzheimer Res.* 4(2): 185-189
- Togo T., Akiyama H., Iseki E., 2002. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's
 disease and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 124, 83-92

Wiśniewski H. M., Frąckowiak J., Mazur-Kolecka B., 1995. In vitro production of beta-amyloid In smooth muscle cells isolated from amyloid angiopathy-affected vessels. *Neurosci Lett.* 183:120-123

Frąckowiak J., Mazur-Kolecka B., Wiśniewski H. M., Potempska A., Carrol R. T., Emmerling M. R., Kim K. S., 1995. Secretion and accumulation of Alzheimer's beta-protein by cultured vascular smooth muscle cells from old and young dogs. *Brain Res.* 676(1):225-30

Casoli T., Di Stefano G., Grossi Y., Balietti M., Fattoretti P., Bertoni-Freddari C. 2007. Release of beta-amyloid from high-density platlets: implications for Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 1096: 170-178

Irizarry M. C., 2004. Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx* 1(2): 226-234

Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D., Sinha S., Schlossmacher M., Whaley J., 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, 359(6393):268-269

Tan J., Town T., Abdullah L., 2002a. CD45 isoform alternation in CD4+ T cells as a potential diagnostic marker of Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 132, 164-172

Lombardi V. R., Fernandez-Novoa L., Etcheverria I., Seoane S., Cacabelos R., 2004. Association between APOE epsilon4 allele and increased expression of CD95 on T cells from patients with Alzheimer's disease. *Methods Find. Clin. Pharmacol.* 26, 523-529

Lombardi V. R., Garcia M., Rey L., Cacabelos R., 1999. Characterization of cytokine production, screening of Lymphocytes subset patterns and In vitro apoptosis In healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. *J. Neuroimmunol.* 97, 163-171

Nath A., Hall E., Tuzova M., 2003. Autoantibodies to amyloid beta-peptide (Abeta) are increased in Alzheimer's disease patients and Abeta antibodies can enhance neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development. *Neuromol. Med.* 3, 29-39

Gruden M., Davudova T. B., Malisauskas M., 2004. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta (25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 18, 165-171

Mruthinti S., Buccafusco J. J., Hill W. D., 2004. Autoimmunity in Alzheimer's disease: increased levels of circulating IgGs binding Abeta and RAGE peptides. *Neurobiol. Aging* 25, 1023-1032

Monsoego A., Zota V., Karni A., Krieger J. I., Bar-Or A., Bitan G., Hudson A. E., Sterling R., Selkoe D. J., Weiner H. L., 2003. Increased T cell reactivity to amyloid β protein in older humans and patients with Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.*, 112:415-422

Linton P. J., Haynes L., Klinman N. R., Swain S. L., 1996. Antigen-independent changes in naive CD4 T cells with aging. *J. Exp. Med.* 184, 1891-1900

Peterson D. A., DiPaolo R. J., Kanagawa O., Unanue E. R., 1999. Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11, 453-462

Shalit F., Sredni B., Stern L., Kott E., Huberman M., 1994. Elevated interleukin-6 secretion levels by mononuclear cells of Alzheimer's patients *Neurosci. Lett.* 174, 130-132

Huberman M., Sredni B., Stern L., Kott E., Shalit F., 1995. IL-2 and IL-6 secretion in dementia: correlation with type and severity of disease. *J. Neurol. Sci.* 130, 161-164

Grubeck-Loebenstien B., Marx F, Blasko I, Pavelka M, 1998. The possible role of the immune system in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 33(7-8):871-81.

Salveti M., Giubilei F., Antonini G., Montesperelli C., Sepie-Monti M., Cannoni S., Pichi A., Tisei P., Casini A. R., Buttinelli C., Prencipe M., Salvetti M., Ristori G., 2003. T cell response to Amyloid- β to mitochondrial antigens in Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*; 16: 35-38

Tranoy E., Baril L., Nicolas L., Croisile B., Crozier P., Hessler C., Sassolas A., McCormick J B., 2004. Immune response to A β -peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neuroscience Letters*, 355: 226-230

Grubeck-Loebenstien B., Trieb K., Ransmayr G., Sgonc R., Lassmann H., 1996. APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 4: 541-547

Monsoego A., Zota V., Karni A., Krieger J. I., Bar-Or A., Bitan G., Hudson A. E., Sterling R., Selkoe D. J., Weiner H. L., 2003. Increased T cell reactivity to amyloid β protein in older humans and patients with Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.*, 112:415-422

Schenk D., Barbour R., Dunn W., 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177

Janus C., Pearson J., McLaurin J., 2000. A beta peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in models of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979-982

Morgan D., Diamond D. M., Gottschall P. E., 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 112, 415-422

Pfeifer M., Boncristiano S., Bondolfi L., 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science* 298, 1379

Nicoll J. A., Wilkinson D., Holmes C., Steart P., Markham H., Weller R. O., 2003. Neuropathology of human Alzheimer's disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* 448-452

Wisniewski T., Zlokovic BV, Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, McComb JG, Frangione B, Ghiso J. 1994. Brain uptake of circulating apolipoproteins J and E complexed to Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 205(2):1431-7.

Togo T., Akiyama H., Iseki E., 2002. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* 124, 83-92

Tuppo E. E., Arias H. R., 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37: 289-305

McGeer E. G., McGeer P. L., 1999. Brain inflammation in Alzheimers disease and the therapeutic implications. *Curr. Pharm. Des.* 5, 821-836

Beloosesky Y., Salman H., Bergman M., Besser H., Djaldetti M., 2002. Cytokine levels and phagocytic activity in patients with Alzheimer's disease. *Gerontology*, 48: 128-132

Sala G., Galimberti G., Canevari C., Raggi M E., Isella V., Facheris M., Appollonio I., Ferrarese C., 2003. Peripheral cytokine release in Alzheimer's patients: correlation with disease severity. 24:909-914

Rogers J., Lue L. F., 2001. Microglial chemotaxis, activation and phagocytosis of β -amyloid as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 39, 333-340

Huberman M, Shalit F, Roth-Deri I, Gutman B, Brodie C, Kott E, Sredni B., 1994. Correlation of cytokine secretion by mononuclear cells of Alzheimer patients and their disease stage. *J Neuroimmunol.* 52(2):147-52.

Town T., Vendrame M., Patel A., 2002. Reduces Th1 and enhanced Th2 immunity after immunization with Alzheimer's beta-amyloid (1-42). *J. Neuroimmunol.* 132, 49-59

Ghochikyan A, Mkrtychyan M, Petrushina I, Movsesyan N, Karapetyan A, Cribbs DH, Agadjanyan MG. 2006. Prototype Alzheimer's disease epitope vaccine induced strong Th2-type anti-Abeta antibody response with Alum to Quil A adjuvant switch. *Vaccine.* 24(13):2275-82.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ.* 322(7300):1447-51.

Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptak U, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R. 2002. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res.* 36(1):27-32.

Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lütjohann D, Moore C, Svetlik D. 2003. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 60(4):510-5.

Simons M., Keller P., Dichgans J, Schulz J. B., 2001. Cholesterol and Alzheimer disease: is there a link? *Neurology* 57 (7): 1089-1093

Simons K, Eehalt R, Michel B, De Pietri Tonelli D, Zacchetti D, Keller P. 2002., Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun.* 26;293(1):30-7.

Simons M., Keller P., De Stropper B., Beyreuther K., Dotti C G., Simons K., 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of β amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA:* 95: 6460-6464

Lee S. J., Liyanage U., Bickel P E., Xia W., Lansbury P. T., Kosik K., 1998. A detergent-insoluble membrane compartment contains A β in vivo. *Nat Med* 4: 730-734

Boulliot C., Prochianz A., Rougon G., Alliquant B., 1996. Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in membrane fraction with caveolae-like properties. *J Biol Chem* 271: 7640-7644

Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE., 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 27;252(3):711-5.

Fülöp T Jr., Larbi A, Douziech N, Dupuis G, Khalil A, Pelletier H, Guerard KP, 2004. Age-associated alterations in the recruitment of signal-transduction proteins to lipid rafts in human T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 75(2):373-81.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. 2000 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):31-9.

Dopico AM, Tigyi GJ. 2007 A glance at the structural and functional diversity of membrane lipids. *Methods Mol Biol.* 400:1-13.

Simons K., Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 160(1):113-23. Epub 2003 Jan 6.

Müller-Hermelink HK Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B., Steinmann GG. 1984. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev.* 28(1):47-55.

Ligthart GJ Izaks GJ, Gussekloo J, Dermout KM, Heeren TJ., 1995. Three-year follow-up of Mini-Mental State Examination score in community residents aged 85 and over. *Psychol Med.* 25(4):841-8.

Birge SJ, Watson YI, Arfken CL., 1993. Clock completion: an objective screening test for dementia. *J Am Geriatr Soc.* 41(11):1235-40.

Bryl E., Witkowski JM,2004. Paradoxical age-related cell cycle quickening of human CD4(+) lymphocytes: a role for cyclin D1 and calpain. *Exp Gerontol.* 39(4):577-85.

Hasbold J, Gett AV, Rush JS, Deenick E, Avery D, Jun J, Hodgkin PD. 1999. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol.* 77(6):516-22.

Baryshnikov A. Y., Polosukhina E. R., Zabolina T. N., Zabolina N. I., Lazarewa N. I., Lukashina M. I., Shiskin Y. V., Chinarjova I. V., Tenuta M. R., Metelitsa I. S. Kadagidze Z. G., 1997. Fas (APO-1/CD95) Antigen: New activation marker for evaluation of the immune status. *Russ J Immunol* 2: 115-120

Lombardi VR, García M, Rey L, Cacabelos R. 1999. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. *Neuroimmunol.* 97(1-2):163-71.

Speciale L, Calabrese E, Saresella M, Tinelli C, Mariani C, Sanvito L, Longhi R, Ferrante P. 2007 Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging.* 28(8):1163-9.

Pawelec G., Adibzadeh M, Pohla H, Rehbein A, 1995 Long-term culture of monoclonal human T lymphocytes: models for immunosenescence? *Mech Ageing Dev.* 83(3):171-83.

Ikeda T., Yamamoto K., Takahashi K., Hamada M., 1991. Immune system-associated antigens on the surface of peripheral blood lymphocytes in patients with Alzheimer's disease. *Acta Psychiatr Scand* 83: 444- 448

Shalit F., Sredni B., Brodie C., Kott E., Humberman M., 1995. T lymphocyte subpopulations and activation markers correlate with severity of Alzheimer's disease. *Clin Immunol Immunopathol* 75: 246-250

Lombardi G., Setterblad N, Blancheteau V, Delaguillaumie A, Michel F, Bécart S, Acuto O, Charron D, Mooney N. 2004. Cognate MHC-TCR interaction leads to apoptosis of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.*75(6):1036-44.

Richartz E., Noda S., Schott K., Günthner A., Lewczuk P., Bartels M., 2002. Increased Serum Levels of CD95 in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 13: 178-182

Rosenkranz D., Weyer S., Tolosa E., Gaenslen A., Leyhe T., Gasser T., Stoltze L., 2007. Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 188: 117-127.

Baecher-Allan CM, Hafler DA. 2006., The purification and functional analysis of human CD4+CD25high regulatory T cells. *Curr Protoc Immunol.* Rozdział 7: 7.4B.

Baba Y., Kuroiwa A., Uitti R. J., Wszolek Z. K., Hamada T., 2005. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 11: 493-498

Goronzy JJ, Vallejo AN, Bryl E, Klarskov K, Naylor S, Weyand CM,. 2002. Molecular basis for the loss of CD28 expression in senescent T cells. *J Biol Chem.* 277(49):46940-9.

Gurven M, Kaplan H, Winking J, Finch C, Crimmins EM. 2008 Aging and inflammation in two epidemiological worlds. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63(2):196-9.

Mueller D.L., Baril L., Nicolas L., Croisile B., Crozier P., Hessler C., Sassolas A., McCormick J B., Trannoy E, 2000. T cells: A proliferation of costimulatory molecules. *Curr Biol* 10: 227-30., 2004. Immune response to A β -peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neuroscience Letters* 355: 226-230

Monsoego A., Zota V., Karni A., Krieger J. I., Bar-Or A., Bitan G., Hudson A., Sterling R., Selkoe D. J., Weiner H. L., 2003. Increased T cell reactivity to amyloid β in older humans and patients with Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 112: 415-422.

Trieb K., Ransmayr G., Sgonc R., Lassmann H., Grubeck Loebenstein B., 1995. APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 17: 541-547

Schmitt T. L., Stager M. M., Pavelka M., Grubeck-Loebenstein B., 1996. Interactions of the Alzheimer β amyloid fragment (25-35) with peripheral blood dendritic cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 94:223-232

Luo Y., Sunderland T., Roth G. S., Wolozin B., 1996. Physiological levels of β -amyloid peptide promote PC12 cell proliferation. *Neuroscience Letters* 217:125-128

McLarnon JG, Choi HB, Lue LF, Walker DG, Kim SU., 2005. Perturbations in calcium-mediated signal transduction in microglia from Alzheimer's disease patients. *J Neurosci Res.* 1;81(3):426-35.

Eckert A, Förstl H, Zerfass R, Hennerici M, Müller WE., 1997. Free intracellular calcium in peripheral cells in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 18(3):281-4.

Gu Q.B, Zhao J.X., Fei J, Schwarz W., 2004. Modulation of Na(+), K(+) pumping and neurotransmitter uptake by beta-amyloid. *Neuroscience.* 126(1):61-7.

Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S. 2008. Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol.* 193(1-2):183-7

Town T., Vendrame M., Patel A., 2002. Reduces Th1 and enhanced Th2 immunity after immunization with Alzheimer's beta-amyloid (1-42). *J. Neuroimmunol.* 132, 49-59

- Borroni B, Grassi M, Costanzi C, Archetti S, Caimi L, Padovani A. 2006. APOE genotype and cholesterol levels in lewy body dementia and Alzheimer disease: investigating genotype-phenotype effect on disease risk. *Am J Geriatr Psychiatry*.(12):1022-31.
- Sjögren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P, Skoog I. 2006. Cholesterol and Alzheimer's disease--is there a relation? *Mech Ageing Dev*. 127(2):138-47.
- Robertson AK, Zhou X, Strandvik B, Hansson GK. 2004. Severe hypercholesterolaemia leads to strong Th2 responses to an exogenous antigen. *Scand J Immunol*. 59(3):285-93.
- Agadjanyan MG., Ghochikyan A, Mkrtychyan M, Petrushina I, Movsesyan N, Karapetyan A, Cribbs DH, 2006 Prototype Alzheimer's disease epitope vaccine induced strong Th2-type anti-Abeta antibody response with Alum to Quil A adjuvant switch. *Vaccine*. 24(13):2275-82.
- Martens GW, Arian MC, Lee J, Ren F, Vallerskog T, Kornfeld H. 2008 Hypercholesterolemia Impairs Immunity to Tuberculosis. *W druku*

9. STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera (AD) będąca najczęstszą przyczyną otępienia wśród ludzi w podeszłym wieku, związana jest z odkładaniem złogów białkowych tzw. β -amyloidu w określonych obszarach mózgu, co powoduje charakterystyczne neurodegeneracyjne zmiany i objawy.

Zmiany w układzie immunologicznym, jakimi są między innymi stan zapalny czy aktywacja komórek układu odpornościowego, należą do obrazu tej choroby i wiążą się z obecnością konglomeratów białkowych β -amyloidu. W związku z poważnymi nadziejami jakie pojawiły się kilka lat temu na konstrukcję szczepionki, której zadaniem miałyby być zaangażowanie komórek układu odpornościowego do eliminacji wadliwych peptydów, badania nad ewentualnymi zmianami funkcjonowania limfocytów T pod wpływem β -amyloidu nabrały niebagatelnej znaczenia.

Pomimo wcześniejszych prób oceny zmian zarówno fenotypu jak i zmian tempa proliferacji jakim potencjalnie ulegają limfocyty T pod wpływem kontaktu z β -amyloidem, doniesienia pozostają ze sobą sprzeczne i nie tworzą spójnego obrazu tej zależności.

W niniejszej pracy postawiono sobie za cel wykrycie ewentualnych zmian w fenotypie limfocytów CD4⁺ osób z AD w porównaniu z grupą kontrolną, analizę aktywności proliferacyjnej tych komórek pod wpływem β -amyloidów bądź też efektu modulującego wcześniejszą stymulację wykazywanego przez te peptydy. Dodatkowo badano poziom cytokin IL2, IL-4, IL-10, TNF i γ INF, zarówno w surowicy krwi jak i w supernatantach hodowlanych komórek PBMC stymulowanych jedynie przeciwciałem antyCD3, bądź tymże przeciwciałem oraz β -amyloidem. Dla wszystkich osób z chorobą Alzheimera oraz z grupy kontrolnej zdrowych w podeszłym wieku zbadano poziom cholesterolu w surowicy i badano czy koreluje on ze zmienionymi parametrami komórek CD4⁺ osób z AD.

Do wykonania powyższych badań posługiwano się głównie cytometrią przepływową; i do monitorowania tempa proliferacji komórek CD4⁺CD28⁺ zastosowano technikę Dividing Cells Tracing (DCT) oraz do pomiaru poziomu cytokin w surowicy krwi oraz w supernatantach hodowlanych - metodę Cytometric Bead Array (CBA).

Wykazano, że komórki CD4+ osób z AD, już ex vivo wykazują fenotyp świadczący o ich aktywacji (m. in. zwiększony odsetek komórek CD95+) i że znamienne obniżeniu ulega odsetek komórek zarówno CD4+ jak i CD8+ pozytywnych pod względem ekspresji powierzchniowej receptora CD28, a procent komórek regulatorowych CD4+CD25^{high} jest obniżony. Nie wykazano bezpośredniego mitogennego wpływu peptydów 1-42, 1-42 oraz 25-35. Stwierdzono natomiast, że są one w stanie modulować odpowiedź proliferacyjną komórek CD4+CD28+, która ulega podwyższeniu, w momencie kiedy komórki są jednocześnie stymulowane przeciwciałem antyCD3 bądź mieszaniną antyCD3antyCD28. W supernatantach tak stymulowanych komórek PBMC nie stwierdzono znaczących różnic w stężeniach cytokin prozapalnych pomiędzy grupą z AD a zdrowymi, które wskazywałyby za wzmożoną odpowiedź zapalną u pacjentów. Wykazano natomiast, że modulacja stymulacji antyCD3 przez peptydy β -amyloidu powoduje zwiększoną produkcję IL-2 co jest spójne z obserwacją dotyczącą zwiększanie tempa proliferacji przez te peptydy.

Wykazano, że u chorych z AD modulacja parametrów cyklu komórkowego przez β -amyloid obserwowana jest już po 72 godzinach podczas, gdy u zdrowych taką znamienne statystycznie zmianę widać po 120 godzinach.

Potwierdzono również wcześniejsze doniesienia mówiące o podwyższonym poziomie cholesterolu w surowicy krwi chorych z AD, które korelowały z niektórymi zmianami obserwowanymi dla komórek układu odpornościowego.

Powyższe wyniki tworzą spójny obraz zmian jakim ulegają komórki CD4+ chorych z AD. Podsumowując wykazano, że limfocyty CD4+ osób chorych już ex vivo charakteryzują się fenotypem aktywacyjnym w porównaniu z komórkami osób zdrowych, prawdopodobnie w związku z ekspozycją na β -amyloid i/lub cytokiny.

Nie stwierdzono natomiast żeby β -amyloidy mogły mieć bezpośredni mitogenny wpływ na limfocyty CD4+CD28+. Mogą one natomiast zmieniać tempo proliferacji komórek stymulowanych antyCD3 czy antyCD3antyCD28 czyli działać na nie w sposób nieswoiście modulujący.

10. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of dementia among the elderly. It is caused by β -amyloid deposition in certain parts of the brain, which is the source of neurodegeneration.

It has been commonly acknowledged for the past few decades that immune system is playing a vital role in AD, causing inflammatory response to β -amyloid or activated cells phenotype connected with its presence. Due to some serious hopes about the success of vaccine that would engage immune system cells to eliminate β -amyloid plaques the investigations on immune system changes in AD became especially important.

Nevertheless the results concerning T cells phenotype, stimulatory role of β -amyloids on the T cells and the balance in cytokine secretion are inconsistent and do not create a credible picture of β -amyloid influence on the immune system.

Therefore in this work we aimed to assess the *in vivo* changes of the phenotype of CD4⁺ cells, together with subsequent investigations on proliferation rate of these cells stimulated either with β -amyloid peptides, antiCD3 and antiCD28 or both of these.

Additionally the levels of produces cytokines (IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, THN, INF) were evaluated in blood serum as well as in culture supernatants after stimulation with antiCD3 alone or in combination with β peptides. For the group of AD patients and the group of healthy volunteers cholesterol levels were measures and were later correlated with the changes in the T cells function.

We used flow cytometry to check the *ex vivo* phenotype of the cells, measure proliferation rate with the use of DCT method and evaluate the concentration of Th1 and Th2 interleukins.

We found that CD4+ T cells exhibit an activated phenotype in comparison with healthy control cells, having more CD95+ cells positive in CD4+ population and some statistically insignificant changes in increased CD4+HLA-DR+ and CD4+CD69+ percentage. We noticed a lowered proportion of CD28+ cells in CD4+ and CD8+ cells of AD patients, as well as regulatory cells (CD4+CD25+).

We didn't confirm that β -amyloid peptides can have a stimulatory effect on T cells. What we see is that they can act rather as modulators of proliferative response enhancing it.

The above results taken together form a consistent mechanism in which β -amyloid stimulates the immune system and causes such changes like inflammation.