

Gdański Uniwersytet Medyczny

Trójmiejska Akademicka Zwierzętarnia Doświadczalna

Centrum Badawczo-Usługowe

mgr Anna Żyłko

Analiza właściwości tolerogennych limfocytów T
regulatorowych w przeszczepach narządowych w świetle
ich wykorzystania jako terapii zmniejszającej ryzyko
odrzutu alop przeszczepów

Rozprawa doktorska

Promotor:

prof. dr hab. Piotr Trzonkowski

Katedra i Zakład Immunologii Medycznej

Praca finansowana ze środków:

Narodowego Centrum Nauki, grant: UMO-2011/01/B/NZ6/00322

Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, grant: STRATEGMED1/233368/1/NCBR/2014

Pragnę serdecznie podziękować:

Promotorowi pracy Panu prof. dr hab. n. med. Piotrowi Trzonkowskiemu za wszechstronną pomoc, okazaną życzliwość i wsparcie oraz cenne wskazówki podczas wykonywania pracy oraz przygotowywania rozprawy;

Pani dr Jolancie Paradziej-Łukowicz za inspirację do podjęcia badań, umożliwienie mi pracy oraz pomoc przy jej realizacji;

Pani dyrektor Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej lek. wet. Grażynie Peszyńskiej-Sularz za pomoc, życzliwość i wsparcie;

Pani dr Anie Wardowskiej za uczestnictwo i pomoc w etapach wykonywania pracy, ogromne wsparcie merytoryczne i praktyczne;

Koleżankom z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej, z którymi mam przyjemność pracować: Marioli, Irenie, Kasi, Iwonie, Ani i Agnieszce, a szczególnie Monice Dmochowskiej i Beacie Muszyńskiej za pomoc w części doświadczalnej oraz cenne uwagi.

Spis treści:

1. Wstęp

1.1 Postępy transplantologii

1.2 Mechanizmy immunologiczne w transplantologii

1.2.1 Główny kompleks zgodności tkankowej MHC i jego antygeny

1.2.1.1 Antygeny MHC

1.2.2 Rodzaje przeszczepów

1.2.2.1 Mechanizmy i tempo odrzutu przeszczepu

1.2.2.2 Dobór dawcy w zakresie zgodności tkankowej

1.2.3 Immunosupresja

1.3 Indukcja tolerancji immunologicznej

1.3.1 Tolerancja immunologiczna centralna i obwodowa

1.3.2 Limfocyty T regulatorowe

1.4 Transplantologia eksperymentalna – model przeszczepu skóry u zwierząt

2. Cele pracy

3. Materiały i metody

3.1 Ogólny schemat doświadczenia – założenia

3.2 Badania *in vivo*

3.2.1 Zwierzęta

3.2.2 Utrzymywanie zwierząt

3.2.3 Procedury *in vivo* wykorzystane w pracy

3.2.3.1 Iniekcja splenocytów 1-dniowym oseskom mysim

3.2.3.2 Model alogenicznego przeszczepu skóry

3.2.3.3 Iniekcja dożylna wybranych subpopulacji komórek regulatorowych

3.2.4 Materiały podstawowe i aparatura

3.2.4.1 Odczynniki i materiały zużywalne

3.2.4.2 Aparatura wykorzystywana w pracy

3.3 Badania *in vitro*

3.3.1 Materiały podstawowe i aparatura

3.3.1.1 Odczynniki i materiały zużywalne

3.3.1.2 Aparatura wykorzystywana w pracy

3.3.3 Izolacja splenocytów

3.3.3.1 Metoda magnetycznego sortowania komórek

3.3.4 Analiza aktywności wybranych subpopulacji komórek regulatorowych

3.3.5 Analiza statystyczna

4. Wyniki

4.1 Alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją splenocytów dawcy u biorcy C57BL/6

4.1.1 Indukcja tolerancji po urodzeniu

4.1.2 Indukcja tolerancji po urodzeniu splenocytami mieszańców F1 C57BL/6 x BALB/c

4.1.3 Indukcja tolerancji po urodzeniu subpopulacjami splenocytów mieszańców F1C57BL/6xBALB/c

4.2 Alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją splenocytów dawcy u biorcy NIH III

4.2.1. Indukcja tolerancji u myszy NIH III

4.3. Subpopulacje

4.3.1 FoxP3 (doświadczenia z mieszańcami F1 C57BL/6xBALB/c)

4.3.2 Subpopulacje Treg/Tconv (doświadczenia z mieszańcami F1 C57BL/6xBALB/c)

4.3.3. Subpopulacje FoxP3+ (doświadczenia z myszami NIH III)

4.3.4. Subpopulacje Treg/Tconv (doświadczenia z myszami NIH III)

5. Wnioski

6. Dyskusja

7. Streszczenie

9. Bibliografia

1. Wstęp

1.1 Postępy transplantologii

Transplantologia jest współcześnie jedną z najprężniej rozwijających się gałęzi medycyny zarówno doświadczalnej jak i klinicznej. Obie dziedziny rozwinęły się w sposób znaczący w przeciągu ostatnich kilku dekad. Świadczy o tym nie tylko ciągły wzrost liczby pacjentów ze skrajną niewydolnością narządową utrzymywanych przy życiu dzięki przeszczepom nerek, wątroby, serca czy płuc, ale także coraz lepsze zrozumienie mechanizmów warunkujących akceptację przeszczepu alogenicznego. Rozwój technik chirurgicznych oraz wykorzystanie terapii immunosupresyjnej doprowadziły do istotnego przedłużenia przeżycia przeszczepu. Wprowadzenie leczenia immunosupresyjnego pozwoliło znacznie obniżyć liczbę przeszczepianych organów traconych w wyniku odrzucania ostrego, pojawiającego się w ciągu kilku do kilkunastu miesięcy po zabiegu transplantacyjnym. Nasza wiedza o mechanizmach immunologicznych w transplantologii jest jednak nadal niewystarczająca aby skutecznie leczyć odrzucanie przewlekłe, a tym samym zapewnić długie (kilkudziesięcioletnie) przeżycie przeszczepionej tkanki, a pacjentowi względny komfort życia. Biorcy przeszczepów są obecnie obligatoryjnie poddawani leczeniu immunosupresyjnemu w celu obniżenia ryzyka odrzucenia przeszczepu czy wytworzenia reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. graft versus host disease – GvHD). Z immunosupresją związane jest natomiast ograniczenie aktywacji układu odpornościowego, a co za tym idzie częstsza zapadalność na choroby o podłożu infekcyjnym czy choroby nowotworowe. Zgłębienie mechanizmów immunologicznych odpowiedzialnych za wywołanie stanu tolerancji immunologicznej oraz próba wykorzystania tej wiedzy w klinice to obecnie główna siła napędowa dla rozwoju transplantologii XXI wieku.

Na całym świecie od wielu lat prowadzi się badania nad modyfikacjami aktywności układu immunologicznego w celu wyeliminowania szkodliwej immunosupresji przy jednoczesnym trwałym przyjęciu przeszczepu. Dzięki zastosowaniu wiedzy o tolerancji immunologicznej udaje się znacząco przedłużyć przeżycie przeszczepów. Indukcja

limfocytów T regulatorowych (Treg) pozwala zminimalizować reakcję GvHD. Terapeutyczne zastosowanie limfocytów Treg u pacjentów w początkowym stadium cukrzycy typu I oraz po przeszczepach narządowych jest obecnie w fazie badań klinicznych jako metoda immunosupresji (102). Oczywistym jest, że zjawisko tolerancji obserwowane w badaniach podstawowych jak i klinicznych nie jest warunkowane przez jeden określony mechanizm. Poza immunoregulacją wykorzystującą limfocyty T regulatorowe istotną rolę odgrywają inne zjawiska takie jak delecja klonalna, anergia czy ignorancja. Niemniej jednak, rola komórek Treg wydaje się być wyjątkowo ciekawa, a w kontekście prowadzonych w ostatnich latach badań, jedną z najistotniejszych. W modelach *in vitro* wykazano, iż limfocyty T regulatorowe mają wpływ na rozwinięcie jak i przebieg reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (103, 104). Badania te pozwoliły również ustalić, co jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za supresję komórek cytotoksycznych (limfocytów Tc i komórek NK). Opisano supresyjny wpływ limfocytów Treg na aktywność komórek NK i oddziaływania międzykomórkowe warunkowane aktywnością Treg (103).

Dokładne zgłębienie mechanizmów warunkujących stan tolerancji immunologicznej z udziałem limfocytów T regulatorowych jest jednak niezbędne dla zwiększenia efektywności powyższej i podobnych jej terapii immunosupresyjnych.

1.2 Mechanizmy immunologiczne w transplantologii

1.2.1 Główny kompleks zgodności tkankowej MHC i jego antygeny.

Główny kompleks zgodności tkankowej MHC (ang. major histocompatibility complex) znajduje się w krótkim ramieniu chromosomu 6 i obejmuje 3 regiony (klasy), zajmując łącznie ok. 4 mln par zasad, czyli ponad 0,1% całego genomu. Struktura i funkcje tego układu są podobne u ludzi i wszystkich gatunków zwierząt, co umożliwia prowadzenie badań molekularnych MHC u jednego gatunku z zastosowaniem sond molekularnych uzyskanych z DNA innego gatunku. Ludzkie antygeny leukocytarne – HLA (ang. human leukocyte antigens) znajdują się na powierzchni wszystkich komórek

jądrzastych w tym leukocytów i stanowią główną składową układu zgodności tkankowej człowieka. Zgodność w obrębie antygenów HLA między biorcą a dawcą przeszczepu wpływa pozytywnie na przeżycie przeszczepu alogenicznego.

Główny układ zgodności tkankowej MHC został odkryty w badaniach nad genetycznym tłem przyjmowania lub odrzucania przeszczepu u myszy. Bodźcem do podjęcia tych badań było odkrycie przez Landsteinerja grup krwi systemu AB0 oraz wyjaśnienie zjawiska aglutynacji krwinek czerwonych biorcy pod wpływem surowicy krwi dawcy. Poszukiwania antygenów odpowiedzialnych za przyjęcie przeszczepu, doprowadziły do wykrycia grup (klas) antygenów oznaczonych I, II i III.

Klasyczne cząsteczki klasy I kodowane są przez 3 loci – HLA-A, -B i -C, natomiast cząsteczki kontrolowane przez loci HLA-E, -F i -G należą do nieklasycznych cząsteczek klasy I. Geny klasy II HLA znajdują się w pięciu podklasach: DQ, DR DP, DOB/DNA i DM przy czym trzy pierwsze kodują klasyczne cząsteczki klasy II. Podklasa DOB/DNA, determinuje syntezę nieklasycznych cząsteczek klasy II. Locus DM jest nieco inny niż pozostałe, bowiem jego sekwencja jest w takim samym stopniu podobna do genów klasy I, jak i do genów klasy II. Cząsteczka MHC kodowana przez ten locus odgrywa szczególną rolę w prezentacji antygenów, co potwierdza fakt, iż komórki nie wykazujące ekspresji tej cząsteczki mają upośledzoną zdolność prezentacji antygenów. Dotychczas wykryto 267 alleli klasy I HLA, 314 alleli klasy II i 40 alleli klasy III. Wysoka liczba alleli wynika z ogromnego polimorfizmu genów MHC. Ponadto w obrębie HLA wykryto także kilkanaście pseudogenów, nie podlegających transkrypcji (np. HLA klasy II - DPB2 i DPA2) oraz geny kodujące inne białka, m.in. geny dla 21-hydroksylazy (CYP21), białek szoku cieplnego 70 (HSP70) i dwa geny dla czynnika martwicy nowotworu (TNFA i TNFB). Ponieważ MHC zawiera wiele genów a układ ten cechuje ogromny polimorfizm, w populacji istnieje bardzo duża liczba różnych haplotypów. Mechanizm dziedziczenia układu zgodności tkankowej jest taki jak w przypadku jednej pary alleli. Potomek otrzymuje od każdego rodzica po jednym chromosomie z każdej pary chromosomów homologicznych, a wraz z nim – haploidalny genotyp MHC (haplotyp). Polimorfizm oznacza obecność licznych alleli genów kodujących różne antygeny MHC, znajdujących się w tym samym locus.

Szczególnie wysokim polimorfizmem charakteryzują się geny klasy Ia i II, w przeciwieństwie do genów klasy Ib i III.

Drogę do poznania MHC człowieka uitorowały badania na myszach, których układ zgodności tkankowej został odkryty jako pierwszy. Większość antygenów MHC myszy wpływa na reakcję odrzucenia alop przeszczepu. W jego skład wchodzi zespół genów leżących obok siebie w chromosomie 17 i obejmuje kilka regionów w obrębie kompleksu H-2, kodujących zarówno cząsteczki MHC klasy I (Ia) jak i cząsteczki klasy II oraz regiony Qa i Tla określane wspólnie mianem regionu TLA, kodujący nietypowe cząsteczki klasy I (Ib) (56). Geny leżące w obrębie kompleksu H-2 odznaczają się bardzo wysokim polimorfizmem. Na kompleks H-2 składają się regiony K S i D (MHC klasy I i III) oraz subregiony I-A i I-E (MHC klasy II). W regionie TLA, obejmującym nieklasyczne cząsteczki MHC klasy I (Ib), znajduje się większość genów MHC myszy. Badania transplantacyjne są możliwe jedynie dzięki szczepom wsobnym, czyli takim, które przez min. 20 pokoleń lub więcej były hodowane systemem kojarzenia brat z siostrą lub rodzic z potomstwem, a ich współczynnik wsobności wynosił 0,99. Współczynnik chowu wsobnego, inaczej współczynnik inbredu, to miara homozygotyczności określająca prawdopodobieństwo tego, że dwa allele danego locus u określonego osobnika są identyczne. Współczynnik ten może kształtować się w zakresie od 0 do 1, a szybkość jego wzrastania zależy od intensywności chowu. Każdy szczep wsobny charakteryzuje się homozygotycznością i posiada unikalny haplotyp MHC. Haplotyp to zestaw sprzężonych ze sobą alleli różnych genów umiejscowionych w jednym chromosomie, dziedziczony po jednym z rodziców. I tak haplotyp H-2 to kombinacja alleli w obrębie określonego kompleksu H-2. Stopień zgodności/niezgodności genetycznej dawcy i biorcy wpływa na mechanizm odrzutu. Znajomość haplotypów i ich zgodność bądź niezgodność genetyczna warunkuje właściwy dobór dawcy i biorcy, a co za tym idzie powodzenie transplantacji. Im więcej wspólnych antygenów MHC, im większa zgodność haplotypów tym większe prawdopodobieństwo udanego przeszczepu i odwrotnie. Z drugiej strony, nawet niewielka różnica w zakresie antygenów MHC może prowadzić do szybkiego odrzucania przeszczepionego narządu. Niemniej jednak, różne haplotypy mają dość różną reaktywność na przeszczepioną niezgodną tkankę. Wybór szczepu C57BL/6 na biorcę przeszczepu w niniejszym projekcie jest związany z tym, iż haplotyp H2^b

uważany jest za wyjątkowo dobrego respondera, co potwierdziły badania nad genetycznymi różnicami mysich szczepów wsobnych. Zaobserwowane różnice w reakcji immunologicznej na antygen (TG)-A-L dowodzą, że jedynie myszy o haplocybie H2^b charakteryzują się wysoką reaktywnością na antygen (TG)-A-L, podczas gdy pozostałe haplotypy H2^{a, k, u, s, f, q} uważa się za niskoreaktywne (55, 70). Z kolei zastosowanie haplotypu H2^d jako stymulatora w tkance podlegającej przeszczepieniu gwarantowało pełną niezgodność i szybkie spontaniczne odrzucanie przeszczepionej tkanki, gdy nie stosowano żadnej manipulacji w celu uzyskania tolerancji. Zastosowanie tego samego haplotypu H2^d w obu szczepach będących źródłem tkanki do przeszczepu pozwoliło na obserwację nawet subtelnych różnic czasu trwania procesu odrzucania gdy stosowano protokół indukcji tolerancji z wykorzystaniem szczepu BALB/c lub gdy odrzucanie przebiegało zupełnie spontanicznie, jak w przypadku kontroli negatywnej DBA/2.

1.2.1.1 Antygeny MHC

Ponieważ wiele białek MHC zostało zidentyfikowanych metodą serologiczną, często są one nazywane antygenami MHC. Częsteczki MHC klasy I są obecne na powierzchni wszystkich komórek jądrzastych i warunkują zachowanie się cytotoksycznych limfocytów T. Częsteczki MHC klasy II, występujące na powierzchni wyspecjalizowanych komórek układu odpornościowego (komórki prezentujące antygen – APC (ang. antigen presenting cells), makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty B), regulują immunologiczne rozpoznanie antygenów za pomocą limfocytów B i T. Zarówno białka MHC klasy I, jak i II prezentują obcy antygen limfocytom T. Częsteczki klasy I wiążą krótkie, kilkuaminokwasowe peptydy, natomiast białka MHC klasy II peptydy złożone z kilkunastu do ponad 20 aminokwasów. Częsteczki MHC klasy III wchodzi w skład układu dopełniacza (komplementu), którego zadaniem jest uzupełnianie (dopełnianie) roli przeciwciał w zakresie unieszkodliwiania antygeny.

Odpowiedź na antygeny przeszczepu wymaga ich rozpoznania i aktywacji odpowiednich, swoistych limfocytów T. Za pośrednictwem limfocytów T pomocniczych pobudzone zostają limfocyty B, które wytwarzają przeciwciała, a także

zwiększa się aktywność pozostałych komórek, takich jak limfocyty cytotoksyczne, makrofagi czy komórki NK. Jednocześnie w reakcji na przeszczep w bezpośredni sposób indukowane są limfocyty cytotoksyczne. W przebiegu odrzutu można więc wyróżnić dwie fazy: aferentną, w czasie której dochodzi do indukcji odpowiedzi immunologicznej, kiedy prezentowane i rozpoznawane są obce antygeny oraz eferentną, w przebiegu której uruchomione zostają swoiste i nieswoiste mechanizmy odpowiedzi na przeszczep. Indukcja odpowiedzi immunologicznej biorcy przez komórki APC dawcy to tzw. prezentacja bezpośrednia. Polega ona na prezentacji aloantygeny w procesie interakcji limfocytów T biorcy z całymi cząsteczkami MHC na powierzchni komórek dendrytycznych (DC) dawcy (tzw. leukocytów pasażerskich) prowadzącej do pobudzenia limfocytów efektorowych. Zachodzi ona w węzłach limfatycznych bądź śledzionie biorcy, gdzie docierają komórki APC. Komórki te mogą prezentować antygeny w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy I ale także z MHC klasy II, aktywując w ten sposób swoiste limfocyty T pomocnicze CD4+, które są niezbędne do powstania reakcji odrzucenia przeszczepu (15). Do prezentacji pośredniej antygeny dochodzi, kiedy peptydy pochodzące od dawcy prezentowane są przez komórki biorcy. Szlak ten obejmuje przetwarzanie i prezentację peptydów, będących składowymi cząsteczek MHC dawcy lub innych jego białek, immunokompetentnym limfocytom T biorcy. Znaczenie tej drogi stymulacji procesu odrzucania wskazuje, dlaczego również cząsteczki kodowane poza układem MHC mogą wpływać na losy przeszczepionych narządów. Nienależące do układu MHC antygeny to między innymi antygeny narządowo-swoiste, związane z komórkami określonych narządów, które również wpływają na żywotność przeszczepu. Mogą one mieć analogiczny do typowych antygenów MHC charakter aloantygeny.

1.2.2 Rodzaje przeszczepów

Ze względu na rozpiętość bariery immunologicznej między dawcą i biorcą przeszczepu tkankowego rozróżniamy kolejno przeszczepy: autologiczne, izogeniczne, alogeniczne oraz ksenogeniczne. (Tab. 1.2.2.1)

Tabela 1.2.2.1 Rodzaje przeszczepów w zależności od różnic genetycznych dawcy i biorcy

rodzaj przeszczepu	charakterystyka
autologiczny (autogeniczny)	przeszczep w obrębie tego samego organizmu
izogeniczny (syngeniczny)	przeszczep między różnymi osobnikami tego samego gatunku (szczepu wsobnego lub bliźniętami monozygotycznymi)
alogeniczny	przeszczep między osobnikami tego samego gatunku (różnymi genetycznie)
ksenogeniczny	przeszczep między osobnikami różnych gatunków

Dodatkowo przeszczepy ksenogeniczne podzielić można jeszcze na tzw. „zgodne” – między osobnikami różnych, ale zbliżonych gatunków i „niezgodne”, kiedy dawcę i biorcę cechuje znaczna różnica genetyczna.

W przypadku dwóch ostatnich rodzajów przeszczepów: alogenicznego i ksenogenicznego, u biorcy obserwujemy złożoną reakcję immunologiczną, której podstawowym wynikiem jest odrzut przeszczepianej tkanki. Decydują o tym różnice genetyczne między dawcą a biorcą. Odpowiedź transplantacyjna organizmu biorcy skierowana jest przeciw antygenom transplantacyjnym dawcy, czyli antygenom zgodności tkankowej.

1.2.2.1 Mechanizmy i tempo odrzutu przeszczepu

Odrzucenie aloprzeszczepów jest wynikiem szeregu oddziałujących wzajemnie mechanizmów nadzorowanych przez odpowiedź wrodzoną i nabytą, przy czym kluczową rolę w tym procesie odgrywają limfocyty T. Ich aloreaktywność, czyli zdolność do rozpoznawania aloantygenów dawcy, rozpoczyna proces odrzucania przeszczepianej tkanki. Pobudzone limfocyty T biorcy różnicują się w komórki

efektorowe i migrują do przeszczepionych narządów, gdzie inicjują uszkodzenie tkanki (34). Swoista reakcja immunologiczna wywołuje w procesie odrzutu odczyn zapalny, który może doprowadzić do całkowitej niewydolności przeszczepionego narządu. Na podstawie kryterium czasowego możliwy jest podział mechanizmów odrzucania na: nadostre, ostre przyspieszone, ostre oraz przewlekłe. (Tab. 1.2.2.1.1). Jak już wspomniano, rozpoznanie aloantygenów, głównie cząsteczek MHC, odbywa się za pomocą prezentacji bezpośredniej bądź pośredniej. Obie drogi prezentacji antygenów zaangażowane są w proces odrzucania przeszczepów, przy czym droga bezpośrednia odpowiada głównie za inicjację odrzucenia wczesnego i ostrego, podczas gdy pośrednia za indukcję procesu chronicznego oraz odrzucania późnego (54, 85).

Tabela 1.2.2.1.1 Charakterystyka mechanizmów odrzucania

rodzaj odrzutu	charakterystyka	
odrzucanie nadostre	rozwija się w ciągu minut od przeszczepienia i prowadzi do nieuchronnej niewydolności	przeciwciała przeciw antygenom HLA i antygenom grupowym układu AB0
odrzucanie ostre przyspieszone	może pojawić się po 24 godzinach od transplantacji i prowadzi do niewydolności w ciągu 1-6 miesięcy	
odrzucenie ostre	następuje w ciągu kilku dni, do kilku miesięcy od przeszczepienia	limfocyty T, makrofagi
odrzucenie przewlekłe	występuje najczęściej nie wcześniej niż po roku	kompleksy immunologiczne, zarastanie naczyń, włóknienie

1.2.2.2 Dobór dawcy w zakresie zgodności tkankowej

Mechanizm odrzutu zależy od stopnia niezgodności genetycznej dawcy i biorcy. Pod względem molekularnym jest wynikiem interakcji receptora dla antygeny (ang. T-cell receptor – TCR) i MHC. Molekuły MHC gospodarza i przeszczepu prezentują różne peptydy co indukuje reakcję immunologiczną, w której kluczową rolę odgrywają limfocyty T, rozpoznające i reagujące bezpośrednio z obcymi molekułami MHC. Proces doboru dawcy i biorcy nazywamy typowaniem tkankowym. Powodzenie transplantacji zależy w pierwszej kolejności od właściwego doboru dawcy, gdzie dawca i biorca powinni posiadać jak najwięcej wspólnych antygenów HLA, a także zgodności w układzie grup krwi AB0. Określanie genotypu osobnika pod względem układu zgodności tkankowej (haplotypu) może być przeprowadzane w dwojaki sposób. Po pierwsze, za pomocą metod serologicznych, pozwalających na identyfikację określonych cząsteczek MHC oraz w drodze analizy molekularnej DNA, dzięki której możliwe jest wykrycie obecności danego allelu MHC. Właściwy dobór dawcy w zakresie HLA zmniejsza częstość epizodów ostrych odrzuceń, ryzyko wystąpienia odrzucenia przewlekłego oraz ryzyko reakcji przeszczepu przeciw gospodarzowi.

1.2.3 Immunosupresja

Immunosupresja jest to wyciszenie odpowiedzi immunologicznej organizmu poprzez zhamowanie procesu wytwarzania przeciwciał oraz komórek odpornościowych przez różne czynniki zwane immunosupresorami. Można ją wywołać poprzez usunięcie niektórych narządów limfatycznych, napromieniowując biorcę promieniami jonizującymi ale najpowszechniejszą stosowaną metodą jest podawanie leków immunosupresyjnych oraz przeciwciał zaburzających aktywność limfocytów. Leki immunosupresyjne, w zależności od mechanizmu działania, hamują reakcję odpornościową na różnych jej etapach, dlatego też różnią się wskazaniami klinicznymi w różnych jednostkach chorobowych. Stopień nasilenia immunosupresji oraz jej długotrwałość jest wypadkową wielu czynników, m.in. wrażliwości gatunkowej i osobniczej, dojrzałości immunologicznej, rodzaju i ilości antygeny, dawki i częstości podań leku oraz rodzaju odpowiedzi immunologicznej: humoralnej – zależnej od

obecności przeciwciał, czy komórkowej – warunkowanej obecnością limfocytów T. W przypadku transplantacji przeżycie przeszczepu uzależnione jest od stosowania immunosupresji praktycznie do końca życia. Leki immunosupresyjne poza znoszeniem nadmiernej odpowiedzi immunologicznej w konkretnych, zamierzonych przypadkach, z powodu braku swoistości prowadzą do ogólnej supresji układu immunologicznego, co wiąże się z poważnymi konsekwencjami, takimi jak: częste zakażenia, odmienny przebieg kliniczny chorób, a także zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów. Ponadto, wiele leków ma własne, niezależne działania uboczne. Nie mniej jednak jest to często jedyna skuteczna metoda zapewniająca długotrwałe funkcjonowanie przeszczepionego narządu poprzez zmniejszenie ryzyka jego odrzucenia, a nierzadko utrzymanie pacjenta przy życiu. Zastosowanie cyklosporyny A w latach 80. XX wieku spowodowało poprawę długotrwałego przeżycia przeszczepionego narządu w sposób skokowy (13). Leki immunosupresyjne są lekami o bardzo dużej sile działania (hamują zdolność organizmu do odrzucania obcego narządu) a, co za tym idzie, ich stosowanie wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia znacznej liczby działań niepożądanych (78). Niektóre leki immunosupresyjne, w tym te stanowiące podstawę terapii, takie jak inhibitory kalcyneuryny (ang. calcineurin inhibitors – CNI) – cyklosporyna A i takrolimus oraz inhibitory sygnału proliferacji (ang. proliferation signal inhibitors – PSI) – sirolimus i ewerolimus, wymagają rutynowego monitorowania stężenia we krwi podczas całego okresu leczenia (31). Stosowanie immunosupresji blokuje lub opóźnia odrzucenie przeszczepu ale znosi również reaktywność immunologiczną przeciw wszystkim antygenom. Tolerancja immunologiczna to swoisty brak reaktywności na określony antygen, a tolerancja transplantacyjna znosi odpowiedź immunologiczną tylko na antygeny przeszczepu. Podczas gdy w warunkach doświadczalnych można względnie łatwo wywołać stan tolerancji na aloantygen, gwarantujący trwałe przyjęcie przeszczepu, w przypadku człowieka uzyskanie trwałej tolerancji na przeszczep, bez stosowania immunosupresji jest niezmiernie trudne do osiągnięcia. Niestety obecny stan wiedzy nie pozwala wyeliminować immunosupresji, ale daje możliwości i narzędzia w poszukiwaniu alternatywnych metod indukcji i utrzymania tolerancji immunologicznej.

1.3 Indukcja tolerancji immunologicznej

Gdy mówimy o skutecznej, indukowalnej tolerancji immunologicznej należałoby przyrzeć się dwóm głównym czynnikom, od których ona zależy. Pierwszy to ograniczenie do minimum potencjalnie szkodliwej reakcji komórek efektorowych biorcy na tkanki dawcy. Drugi to zwiększenie do maksimum ilości immunosupresyjnych komórek biorcy (48). Doświadczenia ostatnich lat wskazują, że w hamowaniu odrzucania przeszczepów istotną rolę odgrywają nie tylko leki immunosupresyjne, ale również mechanizmy naturalne służące utrzymaniu homeostazy immunologicznej i tolerancji na autoantygeny (26). Szereg badań na zwierzętach (85), a także próby kliniczne na pacjentach z GvHD (102) wykazały, iż odpowiednia manipulacja mechanizmami immunologicznymi w celu wywołania stanu tolerancji może w istotny sposób przyczynić się do przeżycia przeszczepionego narządu i ogólnego polepszenia stanu zdrowia pacjenta. Udokumentowano, że indukowana tolerancja immunologiczna, zależna od aloantygenów może wielorako oddziaływać na cały układ immunologiczny. W odniesieniu do transplantacji klinicznych sugeruje się zwrócenie szczególnej uwagi nie tylko na protekcyjne działanie limfocytów Treg w stosunku do przeszczepu, ale również na potencjalne znaczenie komórek efektorowych. Biorąc pod uwagę niską liczebność naturalnych Treg (nTreg) możliwość generowania protekcyjnych Treg *in vivo* pochodzących ze znacznie większej puli aloreaktywnych, nieregulatorowych limfocytów T wydaje się być atrakcyjną metodą indukcji tolerancji immunologicznej w badaniach klinicznych (22).

1.3.1 Tolerancja immunologiczna centralna i obwodowa

Tolerancję immunologiczną opisuje się jako stan, w którym układ immunologiczny nie poddawany immunosupresji farmakologicznej, nie włącza odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko specyficznemu antygenowi, zachowując jednocześnie reaktywność wobec innych antygenów (14). Obecnie wykorzystywana jest już skuteczna metoda immunosupresji w oparciu o indukcję tolerancji i limfocyty regulatorowe po przeszczepach (90, 111), w leczeniu pacjentów z chorobą GvHD po przeszczepie szpiku (102) oraz w cukrzycy typu I (27, 36, 81). Po raz pierwszy

możliwość eksperymentalnego indukowania stanu tolerancji w mysim modelu przeszczepów tkankowych udowodnił zespół Medawara'a (3). Badania tej grupy wykazały wydłużenie czasu przeżycia przeszczepu, czyli indukcję tolerancji na obce antygeny mediowaną przez odpowiednio wczesną ekspozycję biorcy na komórki dawcy. Udało im się również potwierdzić, że obserwowana, nabyta tolerancja ma charakter specyficzny. Nie łączyli oni jednak akceptacji aloprzeszczepu z adaptacją antygenową przeszczepianych tkanek, a z brakiem reaktywności układu immunologicznego w obecności aloantygenu szczepu dawcy. Nie mniej jednak ich badania rozpoczęły wieloletnie poszukiwania odpowiedzi na pytanie jakie komórki i w jaki sposób odpowiedzialne są za indukowanie oraz podtrzymywanie stanu tolerancji immunologicznej. W toku licznych badań na zwierzętach potwierdzono tezę, iż za wystąpienie stanu tolerancji odpowiadają mechanizmy centralne i obwodowe (26). Tolerancja (deplecja) centralna zachodzi głównie w grasicy oraz częściowo w szpiku kostnym – centralnych narządach limfatycznych i dotyczy niedojrzałych limfocytów T i B, które nabywają tolerancję na własne antygeny. Deplecja centralna jest wynikiem umierania na drodze apoptozy bytujących w grasicy limfocytów T charakteryzujących się wysokim powinowactwem do antygenów innych tkanek obwodowych prezentowanych w tym narządzie. W wyniku tolerancji pierwotnej znaczna część limfocytów ulega zniszczeniu, ale ponieważ większość limfocytów autoreaktywnych nie może być wyeliminowana w narządach centralnych, ich dojrzałe formy nabierają tolerancji na obwodzie dzięki tzw. tolerancji obwodowej. Uzyskać ją można na drodze mechanizmów takich jak: delecja efektorowych limfocytów T, indukcja anergii tych komórek, bądź poprzez regulację aktywności limfocytów T.

Nabycie tolerancji centralnej wiąże się z eliminacją komórek z receptorami dla własnych antygenów na drodze delecji klonalnej, w wyniku której dochodzi ostatecznie do apoptozy. Delecja klonalna to:

- selekcja pozytywna – w kierunku limfocytów T posiadających receptory TCR zdolne do rozpoznawania antygenów MHC, wiążące się z tym receptorem słabo oraz w kierunku limfocytów B niereaktywnych,

- selekcja negatywna – eliminująca limfocyty T autoreaktywne, wiążące się z kompleksem MHC-antygen własny oraz limfocyty B wiążące własne antygeny.

Do tej pory główną rolę w indukcji i utrzymaniu tolerancji przypisywano grasicy, która jest źródłem komórek regulatorowych, wykazujących tolerancję wobec autoantygenów. Limfocyty T CD4⁺ regulatorowe stanowią ok 5-10% populacji dojrzałych form CD4⁺CD8⁻. Cechą, która wyróżnia limfocyty o charakterze regulatorowym jest wysoka ekspresja receptora IL-2R α (CD25) (14, 74), a także czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Limfocyty Treg podlegają w grasicy specyficznej selekcji polegającej na rozpoznawaniu samych cząsteczek MHC II lub w kompleksach z autoantygenami. Powinowactwo do prezentowanych i prezentujących białek musi być w tym procesie wystraszająco wysokie aby zaindukować anergię/supresję, ale jednocześnie nie zbyt wysokie, co skutkowałoby usunięciem komórek, jako form nadreaktywnych (92). Inną drogą generowania limfocytów Treg są mechanizmy tolerancji obwodowej, na drodze której powstają one równie efektywnie. Opisano szereg mechanizmów odpowiedzialnych za stan tolerancji obwodowej, m. in.: ignorancję, anergię, apoptozę, wyczerpanie, czy regulację (14). Wydaje się, że indukcja stanu tolerancji w szeroko rozumianej transplantologii może zależeć od skutecznego działania mechanizmów tolerancji centralnej, dzięki którym aloreaktywne limfocyty T są usuwane. Mechanizmy tolerancji obwodowej natomiast mogą być zaangażowane w długotrwałe utrzymywanie stanu akceptacji przeszczepionego narządu (26). Należy jednak zauważyć, że w obu przypadkach kluczową rolę odgrywają subpopulacje komórek regulatorowych, a więc to w manipulacjach tymi komórkami upatruje się pełnego, długoterminowego stanu tolerancji immunologicznej w przeszczepach narządowych, przy jednoczesnej eliminacji nieodzownej na chwilę obecną terapii immunosupresyjnej.

1.3.2 Limfocyty T regulatorowe

W 1995 r. Sakaguchi i wsp. (74) jako pierwsi opisali rolę limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ w patofizjologii chorób autoimmunizacyjnych. Odkryli, że komórki te są kluczem do poznania mechanizmu rozwoju tych schorzeń. Zauważyli, że transfer

limfocytów T CD4+, które wykazują na swojej powierzchni ekspresję cząsteczek CD25 (łańcuch α receptora IL-2) do myszy zapobiega u nich swoistym narządowym i ogólnoustrojowym chorobom autoimmunizacyjnym oraz chorobie GvHD. Udało im się udowodnić, że komórki te wpływają na utrzymanie tolerancji immunologicznej poprzez ujemną regulację odpowiedzi immunologicznej na auto- i aloantygeny.

Komórki regulatorowe to bardzo niejednorodna fenotypowo populacja limfocytów. Można je podzielić na dwie główne populacje: naturalnie występujące **CD25+CD4+Treg**, które wytwarzane są w grasicy, na obwodzie funkcjonujące jako dojrzałe komórki T oraz indukowane **CD4+Treg**, które pochodzą z prekursora CD25-CD4+ lub z obwodowych komórek CD25+CD4+ (48).

Do tej pory najlepiej scharakteryzowaną grupę stanowią naturalne limfocyty Treg CD4+CD25+Foxp3+ (nTreg) wywodzące się z grasicy. Dowiedziono, że pozostają one pod transkrypcyjną kontrolą czynnika Foxp3, który jest jednocześnie ich najbardziej charakterystycznym markerem. W badaniach nad limfocytami Foxp3+CD4+ przedstawiono dowody na ochronne działanie tych komórek względem aloprzeszczepu (22). Komórki Treg charakteryzują się wysokim potencjałem indukowania i utrzymywania stanu tolerancji na aloantygeny dawców w przeszczepach (49). Szereg badań na modelach zwierzęcych potwierdza jak istotną rolę odgrywają one w wydłużeniu przeżywalności aloprzeszczepu (18, 57, 77). Opisano między innymi zdolność tych komórek do ograniczania szkodliwej w transplantologii reakcji limfocytów T efektorowych, a także ich właściwości kontrolowania niekorzystnego pobudzenia limfocytów B. Ponadto udowodniono, że limfocyty nTreg chronią przed wystąpieniem reakcji GvHD w modelach przeszczepu szpiku kostnego i w istotny sposób przyczyniają się do indukcji stanu tolerancji (96). Takie doniesienia stają się podstawą do zastosowania tej subpopulacji komórek jako czynnika indukującego immunotolerancję w alotransplantacjach. Generalnie uważa się, że supresyjne działanie naturalnych limfocytów T regulatorowych zachodzi na drodze bezpośredniego oddziaływanie na komórki efektorowe (CD4+CD8+), czyli wymaga kontaktu z komórką docelową, lub pośrednio przez receptory hamujące w synapsie immunologicznej w interakcji z komórkami prezentującymi antygen (komórki dendrytyczne – DC i monocyty). Możliwe są także mechanizmy pośrednie poprzez

produkcję i uwalnianie supresyjnych cytokin (IL-10, TGF- β), metabolizm adenozy, usuwanie z mikrośrodowiska interleukiny 2 („głodzenie” innych komórek) lub nawet efekt cytotoksyczny wobec limfocytów efektorowych (22, 42, 43). W oparciu o model przeszczepu skóry u myszy dowiedziano, że komórki T regulatorowe CD25+CD4+ indukują długofalową tolerancję na aloantygeny dawcy po przeszczepie (42). Zdolność limfocytów Treg CD4+CD25+ do hamowania odpowiedzi limfocytów efektorowych stwarza realną szansę wykorzystania ich w terapii immunosupresyjnej osób po przeszczepach alogenicznych (47). Według niektórych badaczy, w przypadku przeszczepu komórek hematopoetycznych, podawanie pacjentom limfocytów Treg CD4+CD25+ w okresie przedtransplantacyjnym, a następnie po transplantacji narządu może zapobiegać rozwojowi choroby GvHD (47, 100). W innych badaniach wykazano również, że limfocyty Treg zdolne są do hamowania funkcji limfocytów Th1 oraz Th2, dzięki czemu mogą kontrolować odpowiedź immunologiczną w stosunku do alergenów (39, 47).

Duże znaczenie dla zidentyfikowania i opisanego roli limfocytów Treg w transplantologii miały badania z wykorzystaniem mysich modeli eksperymentalnych. Dostarczyły one ważnych informacji odnośnie działania środków immunosupresyjnych, pozwoliły lepiej zrozumieć znaczenie czynnika Foxp3 oraz ułatwiły strategię planowania dalszych badań nad indukowalną tolerancją immunologiczną Treg-zależną. Pozwoliły wreszcie bezpośrednio odnieść zastosowanie niektórych rozwiązań do badań klinicznych.

Wśród obwodowych komórek najważniejsze są populacje limfocytów Tr1 i Th3 (8, 37). Limfocyty Tr1, dzięki zdolnościom utrzymywania homeostazy, uważane są za główne mediatory tolerancji obwodowej. Hamują one odpowiedź immunologiczną poprzez szereg mechanizmów, w tym: produkcję cytokin o charakterze supresyjnym (IL10, TGF β), bezpośrednie hamowanie komórek regulatorowych czy modulowanie dojrzewania i funkcji komórek dendrytycznych (DC) (2). Limfocyty T regulatorowe Tr1 mogą mediować również tolerancję transplantacyjną, jako że ich obecność koreluje z długotrwałą akceptacją przeszczepu po podaniu niezgodnego pod względem HLA szpiku kostnego. Badania na pacjentach, którzy samoistnie akceptowali przeszczepy narządowe wykazały, że Tr1 mogą hamować odpowiedź naiwnych limfocytów T poprzez zdolność do sekrecji cytokin, takich jak IL10 czy TGF β (12). Co więcej,

cytokiny te mogą dodatkowo korzystnie wpływać na generowanie Treg poprzez alternatywną aktywację DC (38). Znaczącą rolę komórek dendrytycznych w wywoływaniu stanu tolerancji po raz pierwszy opisano w kontekście wewnątrzgrasiczej autotolerancji, gdzie DC stanowiły istotę procesu negatywnej selekcji (103). Udział tych komórek w tolerancji centralnej oraz w indukowaniu i utrzymywaniu tolerancji na autoantygeny jest więc powszechnie znany. Głównym sposobem utrzymania stanu tolerancji na obwodzie jest interakcja między DC, a limfocytami T (14). Przy braku czynników infekcyjnych, czyli w stanie zdrowia, komórki dendrytyczne odpowiadają za indukcję tolerancji obwodowej (86). Niedojrzałe DC tkanek podlegają stałej migracji do węzłów chłonnych, gdzie dochodzi do prezentacji autoantygenów zarówno przez napływowe DC jak i te bytujące w tkance limfatycznej (19). Generowanie Treg na obwodzie wydaje się być niezwykle istotne ze względu na involucję grasicy i związane z tym znaczne uszczuplenie puli Treg powstających w tym narządzie. Aktywność komórek efektorowych może być też hamowana dzięki enzymowi produkowanemu przez tolerogenne DC, który katabolizuje kluczowy dla funkcjonowania limfocytów T aminokwas – tryptofan (14).

1.4 Transplantologia eksperymentalna – model przeszczepu skóry u zwierząt

Transplantacja to często jedyna skuteczna metoda leczenia schyłkowej niewydolności narządowej, stąd tak duże pole do badań nad poprawą odległego przeżycia i prawidłowego funkcjonowania przeszczepianych narządów alogenicznych. Jednym z głównych celów immunologii transplantacyjnej jest poszukiwanie skutecznych metod indukowania u biorcy specyficznej tolerancji wobec antygenów dawcy, która mogłaby uchronić pacjenta od późnego odrzucania przeszczepu oraz pozwoliłaby uniknąć przewlekłej terapii lekami immunosupresyjnymi (72). Poszerzanie wiedzy na temat właściwości limfocytów T regulatorowych niesie ze sobą realne korzyści w dziedzinie badań nad przeszczepami. Możliwość aktywacji funkcji komórek regulatorowych przed przeszczepem lub we wczesnym okresie po przeszczepieniu, rokuje ograniczeniem potrzeby nieswoistej terapii immunosupresyjnej, bądź nawet całkowitym jej wyeliminowaniem (40). Badania na myszach pozwoliły zrozumieć jak wykorzystać odpowiedź immunologiczną organizmu i zjawisko tolerancji immunologicznej

w transplantologii, jak leczyć pacjentów po przeszczepach tak, aby zminimalizować stosowanie leków immunosupresyjnych, indukując jednocześnie długofalową tolerancję na tkanki dawcy (48). Szereg projektów zajmujących się aktywnością komórek regulatorowych i ich rolą w procesach immunologicznych stanowią badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych (64, 65).

Model przeszczepu skóry u myszy to szybka i stosunkowo prosta metoda monitorowania odpowiedzi immunologicznej, w szczególności limfocytów T regulatorowych. Jako pierwsi szczegółowo opisali ją w 1951 roku Billingham i Medawar w swoich badaniach nad odpowiedzią immunologiczną (5). Stworzyli doskonałe i użyteczne narzędzie do badań biomedycznych nad odrzutami aloprzeszczepu. Opracowali oni procedurę pobierania skrawków od dawcy, przygotowania łoża do przyjęcia skrawków u biorcy oraz metody zakładania opatrunku, chroniącego przeszczep. Opisałi również pracę ze skrawkami różnego rodzaju i pochodzenia. Skrawki skóry pełnej grubości (ang. pinch grafts), pobierane były przy użyciu pincety i skalpela bądź nożyczek, cieńsze skrawki (ang. thiersch grafts), składające się z warstwy naskórka i skóry właściwej bez tkanki podskórnej, pozyskiwane były poprzez rozdzielenie wzdłużne małżowiny usznej myszy lub poprzez zdjęcie skóry z ogona (5). Ich dokonania stały się motorem do modyfikacji i poszukiwania nowych technik przeszczepiania skóry. Bailey i Usama w 1960 roku (1), inspirując się wcześniejszymi dokonaniem, opracowali własną metodę przeszczepu skóry z ogona, w której łoże do przeszczepu wycinali również na ogonie biorcy. Skrawki skóry umieszczane były bezpośrednio w łożu, nie były mocowane a jedynie zabezpieczane specjalnie opracowanym opatrunkiem, który stanowiła szklana, podłużna tuba o średnicy 5 mm, nakładana bezpośrednio na ogon, tak aby w całości zakrywała miejsca przeszczepu. Na końcu ogona zakładany był klips zabezpieczający szklaną tubę przed zsuwaniem się (1). Ten rodzaj opatrunku miał umożliwić obserwację miejsca przeszczepu od momentu jego wykonania. Podobnie dla uwidocznienia miejsca przeszczepu Sugarbaker i Chang w 1979 roku (89) opisali metodę przeszczepu skóry z ucha, gdzie dla skrawka wszywanego w łoże nie stosowano żadnego dodatkowego opatrunku czy zabezpieczenia rany. Umożliwiało to monitoring przeszczepu od pierwszego dnia (89). Od tego czasu sama procedura wielokrotnie podlegała modyfikacjom i ulepszeniom. Naukowcy mierzyli się z opracowaniem idealnego

opatrunku, który nie będzie przynosił dyskomfortu zwierzęciu a jednocześnie zabezpieczy przeszczep w pierwszych dniach po zabiegu przed przesuwaniem się skrawka i próbami pozbycia się go przez zwierzę. Opatrunku, który umożliwi względne monitorowanie rany bez zbędnego narażania biorcy przeszczepu na stres.

Alogeniczne przeszczepy skóry mają obecnie bardzo duże zastosowanie w badaniach nad limfocytami Treg, jako tymi, które warunkują utrzymanie przeszczepu, a także przeciwdziałają jego odrzuceniu. Wśród głównych funkcji Treg wyróżnić należy: wytwarzanie tolerancji na antygen, odpowiedź przeciwinfekcyjną, przeciwnowotworową, poszczepienną odpowiedź immunologiczną, tolerancję wobec przeszczepów narządowych (43, 61). Wood i wsp. w swojej wieloletniej pracy nad limfocytami T regulatorowymi wielokrotnie sięgała po ten właśnie model eksperymentalny(9, 11, 21, 69, 109, 110). Badania jej zespołu dowiodły m. in., że limfocyty Treg mają kluczowe znaczenie w powstawaniu i utrzymywaniu homeostazy oraz tolerancji immunologicznej, odgrywają ważną rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych, alergicznych, nowotworowych oraz właśnie w transplantologii.

Obecnie mysie modele aloprzeszczepu mają szerokie zastosowanie w badaniach nad efektywnością najróżniejszych związków i preparatów o działaniu immunosupresyjnym, indukcją tolerancji immunologicznej oraz wpływem biologicznym przeciwciał blokujących (42). Manipulacje Treg to duże pole do badań laboratoryjnych prowadzących do stworzenia skutecznych terapii komórkowych. Mysi model przeszczepu skóry z ogona jest procedurą stosunkowo prostą do przeprowadzenia, która znakomicie sprawdza się w ocenie odrzutu aloprzeszczepu i indukcji tolerancji immunologicznej zależnej od limfocytów T regulatorowych. Procedura ta nie jest trudna, a sam transplant skóry z ogona jest znacznie mniej podatny na możliwość niedokrwienia niż skrawek (ang. graft) skóry pełnej grubości, pobrany z okolicy tułowiowej zwierzęcia. Dodatkowo eliminuje mikrourazy związane z goleniem fragmentów skóry owłosionej przeznaczonej do przeszczepu. Procedura jest wiarygodna, wysoce powtarzalna i łatwa w monitorowaniu. Charakteryzuje się również wysoką, blisko 100% przeżywalnością zwierząt.

2. Cele pracy

Celem niniejszej pracy była:

- Analiza właściwości tolerogennych limfocytów T regulatorowych w przeszczepach narządowych w świetle ich wykorzystania jako terapii zmniejszającej ryzyko odrzutu aloprzeszczepów w modelu zwierzęcym
- Określenie czy tolerancja centralna i immunoregulacja zależna od limfocytów T regulatorowych mogą niezależnie prowadzić do indukcji tolerancji na niezgodne antygeny

3. Materiały i metody

3.1 Schemat doświadczenia – założenia

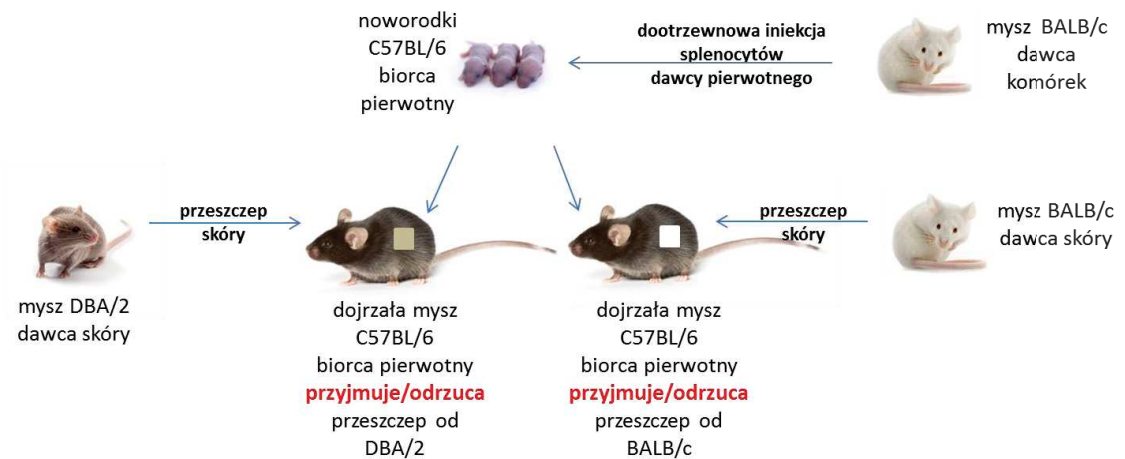
W niniejszej pracy rozwinięto model zaproponowany przez Medawar'a i wsp., zgodnie z którym ekspozycja na antygeny szczepu dawcy w okresie płodowym zapewnia przyjęcie przeszczepu przez osobnika dorosłego. W projekcie zastosowano dwa modele doświadczalne z wykorzystaniem dwóch szczepów myszy laboratoryjnych: w całości immunokompetentny szczep C57BL/6 oraz bezgrasicy szczep NIH III. Zestawienie tych dwóch modeli miało na celu przedstawienie sytuacji w której grasica zapewnia, bądź nie, mechanizmy związane z tolerancją centralną.

W naszym **pierwszym modelu** (Ryc. 3.1.1a) noworodkom myszy szczepu C57BL/6 (biorca pierwotny) dootrzewnowo podano splenocyty wyizolowane ze śledzion myszy szczepu BALB/c, a następnie, w momencie osiągnięcia przez nie dojrzałości, wykonano u nich przeszczep skóry od myszy BALB/c i DBA/2. Kontrolę stanowił przeszczep od C57BL/6. W dalszej kolejności, zmniejszając dyskryminacyjną niezgodność MHC zmodyfikowano ten model o wykorzystanie hybryd C57BL/6xBALB/ zamiast BALB/c jako dawców komórek (Ryc 3.1.1b). Oseskom myszy C57BL/6 podano dootrzewnowo w pierwszej dobie życia wyizolowane ze śledzion myszy F1 C57BL6xBALB/c splenocyty lub TconvCD4+CD25- lub TregCD4+CD25+ w celu potwierdzenia słuszności założenia o istotnej roli limfocytów T w mediacji zjawiska tolerancji potransplantacyjnej. Następnie po osiągnięciu przez myszy C57BL/6 dojrzałości wykonano u nich przeszczepy skóry od myszy BALB/c i DBA/2. Kontrole stanowił przeszczep od C57BL/6.

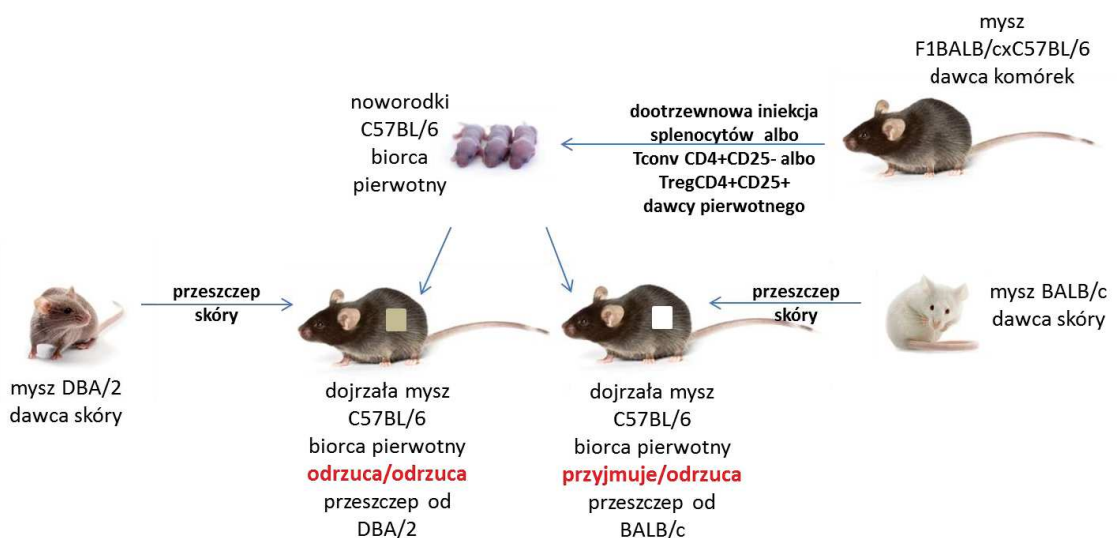
W **drugim modelu** wykorzystano myszy szczepu NIH III, pozbawione własnego układu immunologicznego ze względu na mutacje, które nie pozwalają grasicy i szpikowi tych myszy produkować limfocytów. (Ryc. 3.1.2) Pozwoliło to na zbadanie możliwości tworzenia tolerogennych limfocytów T regulatorowych bez udziału tolerancji centralnej – zależnej od grasicy, a jedynie przy udziale mechanizmów obwodowych. W tym modelu oseskom myszy szczepu C57BL/6 (biorca pierwotny) dootrzewnowo podano splenocyty wyizolowane ze śledzion myszy szczepu BALB/c.

Następnie, od dojrzałych biorców pierwotnych pobrano śledziony, z których pozyskano komórki (splenocyty lub TconvCD4+CD25- lub TregCD4+CD25+), które z kolei podano drogą dożylną myszom NIH III.

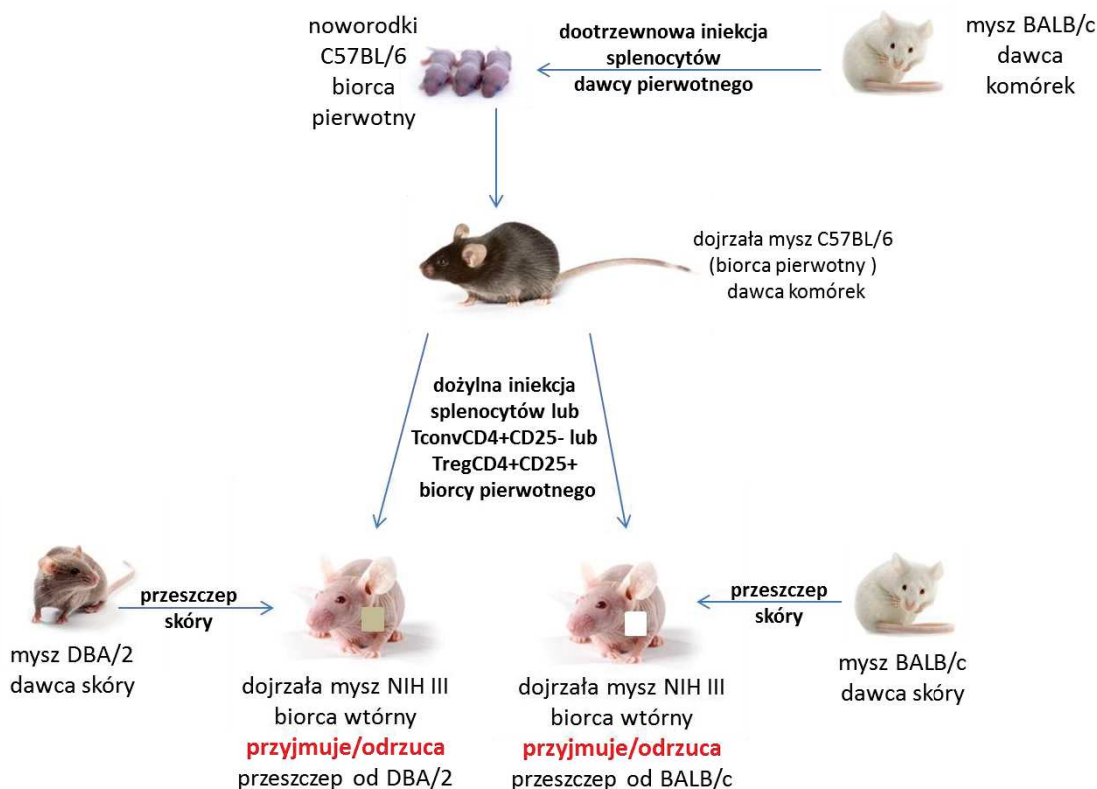
Dla lepszego zilustrowania założeń projektu powyższe modele przedstawiono w postaci grafów (Ryc. 3.1.1a, 3.1.1b, 3.1.2).



Ryc. 3.1.1a Model pierwszy – ogólny schemat doświadczenia



Ryc. 3.1.1b Model pierwszy – zmodyfikowany



Ryc. 3.1.2 Model drugi – ogólny schemat doświadczenia

3.2 Badania *in vivo*

Potrzebę przeprowadzenia doświadczeń na zwierzętach oraz wykorzystanie w projekcie danego gatunku zwierząt doświadczalnych uzasadnić należy specyfiką badań transplantologicznych, które nie pozwalają na zastosowanie metod alternatywnych dla osiągnięcia celu doświadczenia. W analizach mechanizmów warunkujących przyjęcie lub odrzucenie przeszczepu i związany z tym zespół chorobowy GvHD niezbędne jest uwzględnienie szeregu zmian występujących w całym organizmie dawcy i biorcy. Również badania funkcji limfocytów T regulatorowych i ich udziału w akceptacji tkanek dawcy w organizmie biorcy wymagają przeprowadzania badań na całych organizmach a nie izolowanych układach. W wyniku rozpatrzenia wniosku do Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Gdańsku projekt uzyskał zgodę tejże Komisji uchwałą nr 28/2009.

3.2.1 Zwierzęta

Do projektu wybrano następujące szczepy myszy pochodzące z hodowli SPF Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej – Centrum Badawczo-Usługowe Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:

- C57BL/6 – jako pierwotny i wtórny biorca oraz dawca komórek regulatorowych Treg podawanych dożylnie, a także dawca alogenicznego przeszczepu skóry z ogona stanowiącego kontrolę dodatnią
- BALB/c – jako dawca splenocytów podawanym ośeskom szczepu biorcy oraz dawca alogenicznego przeszczepu skóry z ogona
- DBA/2 – jako dawca alogenicznego przeszczepu skóry z ogona stanowiącego kontrolę negatywną

Myszy szczepu C57BL/6 użyte w badaniach są gatunkiem, którego układ immunologiczny jest stosunkowo najlepiej opisany w porównaniu do innych gatunków zwierząt, oraz bardzo szeroko wykorzystywany w badaniach transplantologicznych. Z kolei wykorzystanie myszy szczepu BALB/c jako dawców związane jest z potwierdzoną silną niezgodnością w głównym układzie zgodności tkankowej względem myszy pozostałych wybranych do badań szczepów. Szczep DBA/2 stanowił grupę kontrolną w stosunku do C57BL/6 we wszystkich zaplanowanych doświadczeniach.

Ponadto, do drugiego modelu doświadczalnego wybrano myszy szczepu NIH III, sprowadzone z hodowli Charles River w Niemczech, jako biorcę komórek regulatorowych oraz alogenicznego przeszczepu skóry z ogona. Charakterystykę wybranych szczepów przedstawiono w tabelach poniżej (Tabela 3.2.1.1, 3.2.1.2)

Tabela 3.2.1.1 Charakterystyka wybranych szczepów myszy

szczep	charakterystyka	zastosowanie badawcze
C57BL/6	umaszczenie ciemno brązowe, prawie czarne; dość agresywny; charakteryzuje się skłonnością do wzajemnego wygryzania sierści w	uniwersalny, wielofunkcyjny model; otyłość indukowana dietą, rozwój modeli transgenicznych

	zależności od pozycji socjalnej (dominujące osobniki, głównie samice, wygryzają włosy innym myszom, samce manifestują swoją dominację walcząc); duża tendencja do występowania różnego rodzaju zmian skórnych	/knockout, w badaniach genetycznych jako idealna kontrola w stosunku do myszy genetycznie modyfikowanych, badania immunologiczne.
BALB/c	umaszczenie albinotyczne, oczy czerwone; posiada długotrwałą zdolność rozrodczą; bardzo wrażliwy na napromienianie; podatny na występowanie spontanicznych nowotworów sutka, płuc, nerek, układu limfatycznego i innych	powszechny, wielofunkcyjny model, produkcja przeciwciał monoklonalnych, używany do wielu badań biomedycznych, szczególnie immunologicznych i nad nowotworami; dobry modelem do badań nad układem sercowo-naczyniowym w związku z powszechnie występującą u myszy arteriosklerozą
DBA/2	umaszczenie jasnobrażowe, beżowe; podatny na choroby oczu (wada tęczówki, jaskra), ucha wewnętrznego, padaczkę słuchowopochodną, nowotwory; charakteryzuje się bardzo wysoką zapadalnością na gruczolakoraka sutka (ok. 72% samic wieloródek) oraz nadwrażliwością słuchową u młodych i zależną od wieku utratą słuchu	bezpieczny i efektywny model, szeroko rozpowszechniony w badaniach neurobiologicznych, geriatrycznych i nad układem sercowo-naczyniowym
NIH III	posiada mutację genu nude, czego rezultatem jest brak grasicy i funkcji komórek T, ponadto	badania przeciwnowotworowe, przeszczepy ksenogeniczne

	<p>posiada dwie ważne mutacje wpływające na regulację układu immunologicznego: x - związaną z defektem odporności (xid) i beige (bg). Mutacja xid wywiera wpływ na dojrzewanie grasiconiezależnych limfocytów B; dowiedziono, że homozygoty bg mają uszkodzone komórki natural killer (NK), które są cytotoksyczne wobec komórek guzów w badaniach <i>in vitro</i>.</p>	
--	---	--

Tabela. 3.2.1.2 Haplotypy szczepów wsobnych myszy wykorzystanych w projekcie

Haplotyp	Szczep
H2 ^b	C57BL/6
H2 ^b	NIH III
H2 ^d	BALB/c
H2 ^d	DBA/2

3.2.2 Utrzymywanie zwierząt

Wszystkie wybrane szczepy utrzymywano w warunkach podwyższonych standardów sanitarno-higienicznych w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej – Centrum Badawczo-Usługowym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Ośrodek ten jest obecnie jednym z najnowocześniejszych tego typu obiektów w Polsce i stanowi innowacyjną jednostkę, w której możliwe jest prowadzenie badań naukowych na zwierzętach na światowym poziomie. W obrębie Pracowni Zwierząt Doświadczalnych znajdują się dwa oddzielne ciągi za barierą sanitarno-higieniczną z pomieszczeniami przeznaczonymi dla zwierząt laboratoryjnych. Pokoje te służą do hodowli myszy i szczurów, ich utrzymywania, a także wykonywania zabiegów i procedur doświadczalnych. Pracownia wyposażona jest w:

- system monitorujący parametry w pomieszczeniach zwierzętarni, takie jak temperatura, wilgotność i ciśnienie,
- system 3-częściowych śluz dla personelu, stanowiący barierę,
- system klimatyzacji z absolutnymi filtrami HEPA,
- odpowiednią instalację oświetleniową, system filtracji wody,
- autoklawy przelotowe,
- komorę do dezynfekcji z waporyzatorem nadtlenu wodoru,
- nowoczesne myjnie do klatek i butelek dla zwierząt.

Zwierzętarnia zapewnia wystandaryzowane warunki pozwalające na prowadzenie hodowli, jak również utrzymywanie zwierząt doświadczalnych o standardzie sanitarno-higienicznym tzw. SPF (ang. specific pathogen free – wolnych od specyficznych patogenów występujących u danego gatunku).

Zwierzęta wykorzystane w niniejszym projekcie utrzymywane były w kontrolowanych warunkach środowiska: temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, oświetlenie 12 godzin światła/12 godzin ciemności, wilgotność $55\pm 10\%$, 15-20 wymian powietrza na godzinę. Zwierzęta miały zapewniony stały dostęp do wody i pożywienia (żywione były standardową paszą dla gryzoni laboratoryjnych oraz paszą o specjalnym przeznaczeniu dla myszy o obniżonej odporności). Utrzymywane były w standardowych klatkach, o odpowiedniej kubaturze, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek, oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku. Opiekę nad zwierzętami sprawował przeszkolony personel zwierzętarni legitymujący się ukończonym szkoleniem z zakresu opieki nad zwierzętami laboratoryjnymi, zgodnym z obowiązującym prawodawstwem (Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych i edukacyjnych wraz z obowiązującymi aktami wykonawczymi).

3.2.3 Procedury *in vivo* wykorzystane w pracy

3.2.3.1 Iniekcja splenocytów 1-dniowym oseskom mysim

Oseskom myszy szczepu C57BL/6 w pierwszej dobie życia drogą dootrzewnową (*i. p.*) podano splenocyty wyizolowane ze śledzion myszy szczepu BALB/c (pierwotny dawca) w objętości 20 - 30 μ l, w ilości 1-2 mln komórek na mysz (igła 0,3 mm; strzykawka 1 ml). Po wykonanym zastrzyku oseski zwrócono matce. Procedura przeprowadzana była za barierą sanitarno-higieniczną pod komorą laminarną.

3.2.3.2 Model alogenicznego przeszczepu skóry

Przedstawiony poniżej protokół przeszczepu skóry opracowano na podstawie własnej praktyki w zakresie przeprowadzania procedury doświadczalnej przeszczepu skóry u myszy oraz z wykorzystaniem materiałów źródłowych (29, 79, 89).



Ryc. 3.2.3.2.1– Miejsce pracy

W pierwszej kolejności przygotowano skrawki skóry z ogona myszy dawcy (BALB/c) Mysz dawcę poddano eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Następnie zdezynfekowany ogon nacięto skalpelem wzdłuż od nasady do jego końca, po czym przy użyciu pincety zdjęto skórę z całej długości ogona. Uzyskany w ten sposób płat

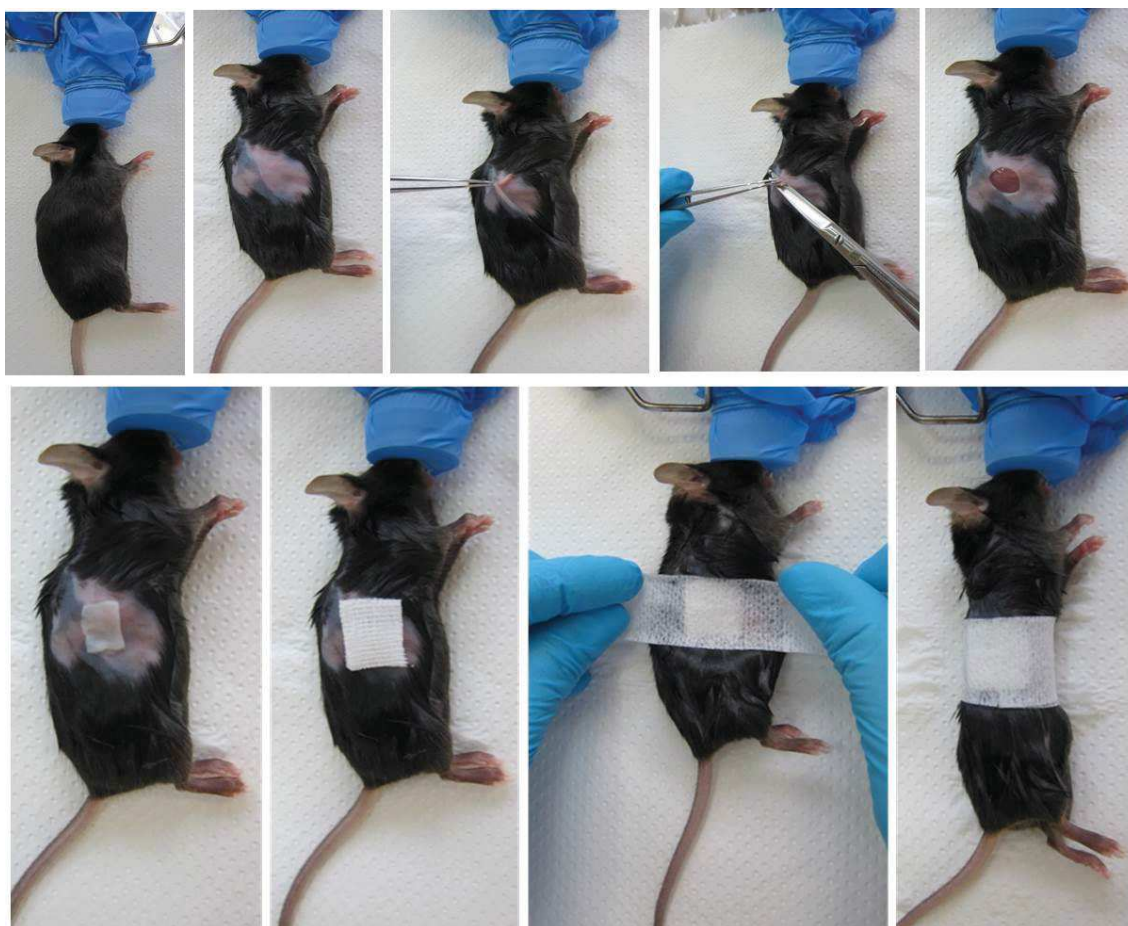
skóry umieszczono w 0,9 % NaCl w szalce i przetrzymywano na lodzie. Przy pomocy skalpela pocięto fragment skóry na mniejsze ok. 10 mm długości skrawki i pozostawiono w 0,9 % NaCl z dodatkiem antybiotyków – streptomycyny i gentamycyny (Ryc. 3.2.3.2.2).



Ryc. 3.2.3.2.2 – Przygotowanie skrawków do przeszczepu

W kolejnym etapie eksperymentu mysz biorcą umieszczono w pojemniku indukcyjnym aparatu do anestezji wziewnej dla małych gryzoni i poddano znieczuleniu 3% izofluranem. Uśpione zwierzę ułożono na boku ciała na płytce operacyjnej z maseczką inhalacyjną na pyszczku. Dla potwierdzenia, że zwierzę wprowadzono w stan głębokiej anestezji sprawdzono jej czucie głębokie zaciskając fałd skórny między palcami kończyny tylnej. Następnie dokładnie ogolono bok ciała przy pomocy skalpela, a powierzchnię skóry zdezynfekowano preparatem Octenisept. Używając pincety uchwycono płat ogolonej skóry i uniesiono go delikatnie do góry, a następnie przy pomocy nożyczek odcięto fragment skóry tworząc łożo o średnicy ok 8 mm² (w przypadku krwawienia osuszono ranę jałowym gazikiem). Przygotowany wcześniej pojedynczy skrawek skóry z ogona umieszczono bezpośrednio w łożu, delikatnie uciskając jałowym gazikiem, jeżeli konieczne; w celu dopasowania graftu, nadmiar skóry delikatnie przycięto używając nożyczek. Kolejny etap stanowiło założenie opatrunku. W tym celu jałowy gazik wielkości ok 1 cm² umieszczono bezpośrednio

w miejscu przeszczepu, a następnie założono plaster opatrunkowy wokół klatki piersiowej myszy tak aby nie przesunąć przeszczepu a jednocześnie solidnie przymocować opatrunek do powłok ciała. Niezwykle istotne było aby opatrunek założony był odpowiednio ciasno; nie powinien powodować dyskomfortu zwierzęcia; z drugiej strony nie mógł być założony zbyt luźno, co mogłoby skutkować jego zsunięciem się, albo przesunięciem się samego graftu pod opatrunkiem (Ryc. 3.2.3.2.3). Bezpośrednio po zabiegu mysz biorcą umieszczono w oddzielnej klatce na czas odzyskania przez nią całkowitej przytomności i obserwowano czy założony opatrunek pozwala na swobodne poruszanie się oraz czy zwierzę nie próbuje się go pozbyć. Przed podjęciem czynności zabiegowych na kolejnej myszy, narzędzia każdorazowo dezynfekowano roztworem 70 % etanolu.

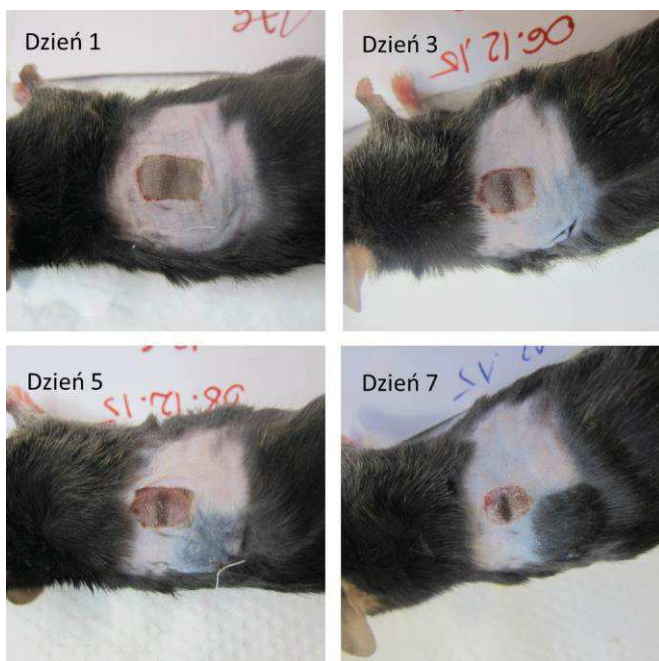


Ryc. 3.2.3.2.3 – Etapy procedury przeszczepu skóry z ogona

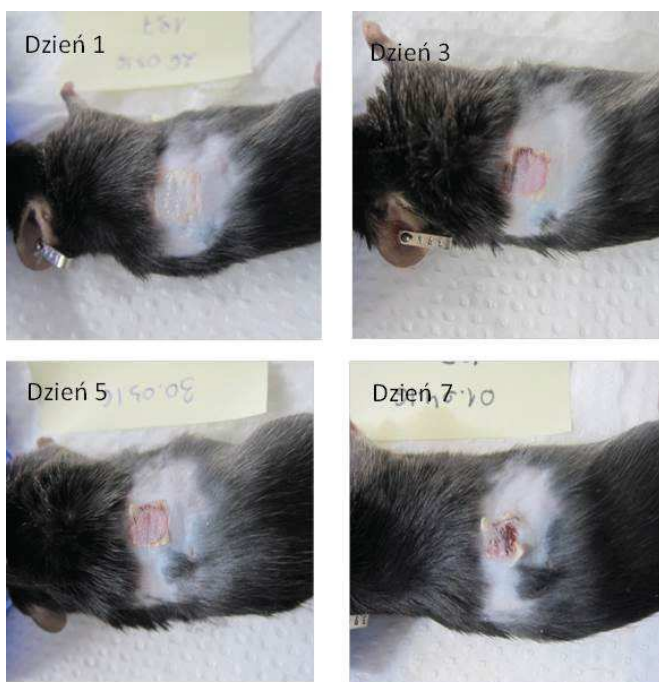
Kolejny etap procedury stanowiła opieka pooperacyjna, na którą składały się: monitoring zwierzęcia po zabiegu, skupiający się na ocenie ogólnego stanu zdrowia

i behawioru myszy; pomiarach masy ciała i kontroli pobieranej paszy i wody oraz monitoring samego przeszczepu: zmiana opatrunku i ocena wizualna przeszczepu, udokumentowana wykonaniem zdjęcia w 1, 3, 5 i 7 dniu od wykonania przeszczepu, przy czym całkowite usunięcie opatrunku możliwe było już w 5 dniu od przeprowadzonej procedury (Ryc. 3.2.3.2.4, 3.2.3.2.5). Każdorazowa zmiana opatrunku i wykonanie zdjęcia przeszczepu wymagała poddania zwierzęcia anestezji wziewnej 3% izofluranem. Myszy umieszczano kolejno w pojemniku indukcyjnym aparatu do anestezji wziewnej dla małych gryzoni i poddawano znieczuleniu. Uśpione zwierzęta układano na boku ciała na płycie operacyjnej z maseczką inhalacyjną na pyszczku, delikatnie przecinano nożyczkami plaster wzdłuż ciała zwierzęcia, a następnie bardzo delikatnie usuwano stary opatrunek – plaster z gazikiem – starając się nie naruszyć miejsca przeszczepu i zakładano nowy. (W przypadku gdy gazik przykleił się do rany należało zwilżyć go roztworem 0,9% NaCl, usunąć a następnie osuszyć.)

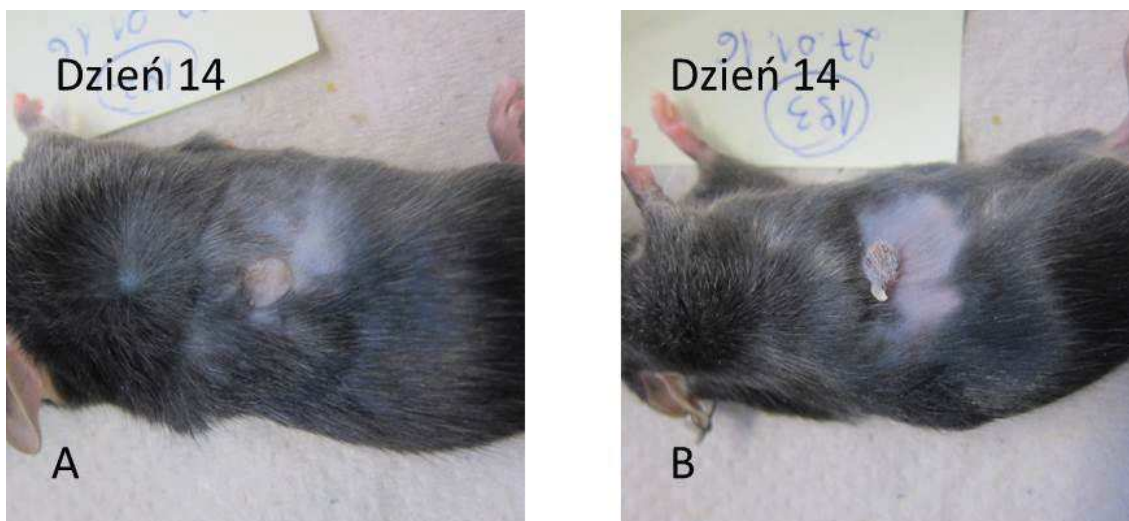
Opisana procedura okazała się wiarygodna, wysoce powtarzalna i łatwa w monitorowaniu; charakteryzowała się również wysoką, blisko 100% przeżywalnością zwierząt. Stosowana w tym modelu anestezja wziewna z 3% izofluranu okazała się dużo bezpieczniejsza dla zwierzęcia w porównaniu do anestezji iniekcyjnej, co związane było z mniejszą ilością ewentualnych powikłań. Wskazywał na to skrócony do minimum czas trwania samego zabiegu jak i wybudzania się myszy, a co za tym idzie ograniczony stres zwierzęcia związany z całą procedurą.



Ryc. 3.2.3.2.4 – Przeszczep skóry z ogona od myszy C57BL/6 do C57BL/6 w kolejnych dniach od wykonania procedury



Ryc. 3.2.3.2.5 – Przeszczep skóry z ogona od myszy BALB/c do C57BL/6 w kolejnych dniach od wykonania procedury, w dniu 3 widać charakterystyczne dla odrzutu zaczerwienienie



Ryc. 3.2.3.2.6 – Dzień 14 – przeszczep przyjęty (A), przeszczep odrzucony (B).

3.2.3.3 Iniekcja dożylna wybranych subpopulacji komórek regulatorowych

Myszom szczepu NIH III – biorcom wtórnym wykonano iniekcje dożylne (*i. v.*) wybranych frakcji komórek wyizolowanych ze śledzion myszy C57BL/6 – biorców pierwotnych, które miały kontakt z antygenem szczepu dawcy BALB/c. W tym celu mysz biorcę bez znieczulenia umieszczono w trzymadle w celu unieruchomienia zwierzęcia. Zdezynfekowany ogon ułożono w dłoni tak aby uwidocznic naczynie krwionośne – żyłę ogonową (delikatne uciśnięcie nasady ogona ułatwiało zlokalizowanie miejsca wkłucia). Wykonano iniekcje przygotowanej na świeżo zawiesiny wybranych subpopulacji komórek regulatorowych w objętości 200 μ l na mysz w ilości od 1 mln do 200 mln komórek na mysz. Bezpośrednio po iniekcji według zaleceń przetrzymywano zwierzę w oddzielnej klatce, ale jedynie do momentu upewnienia się czy mysz dobrze zniosła procedurę. Następnie przekładano ją do wspólnej klatki i przetrzymywano w grupach kilkusobniczych.

3.2.4 Materiały podstawowe i aparatura

Drobny sprzęt laboratoryjny (szalki Petriego), narzędzia chirurgiczne (nożyczki, pincety, szpatułki) stanowiący wyposażenie pracowni zwierząt doświadczalnych był

każdorzazowo przed zabiegami jałowiony metodą termiczną przy użyciu autoklawu nastołowego.

Tabela 3.2.4.1 Odczynniki i materiały zużywalne

izofluran – Iso-Vet	Piramal Healthcare, Wielka Brytania
sól fizjologiczna	Polfarma, Starogard Gdański, Polaska
PBS	Sigma-Aldrich, Niemcy
Octenisept	Schulke & Mayr GmbH, Niemcy
Aerodesin 2000	MediLab Sp. z o. o., Polaska
Streptomycyna, Gentamycyna	Polfarma, Starogard Gdański, Polaska

kompresy, gaziki jałowe – Matocomp	Matopat, Totuń, Polaska
przylepiec włókninowy rozciągliwy z papierem silikonowym – Medipore Hypoallergenic	3M, Polaska
igły	Becton Dickinson, Niemcy
strzykawki	Becton Dickinson, Niemcy
skalpele	Swann-Morton, Wielka Brytania

3.2.4.2 Aparatura wykorzystywana w pracy

- Aparat do narkozy wziewnej dla gryzoni (Combivet, Rothacher-Medical GmbH)
- Autoklaw nastołowy (Prestige Medical)
- Komora laminarna – stacja wymiany ściółki (Top Flow 3, Ehret)
- Mikroskop (Motic)
- Komora do eutanazji CO₂ (Ehret)

3.3 Badania *in vitro*

3.3.1 Materiały podstawowe i aparatura

3.3.1.1 Odczynniki i materiały zużywalne

Wszystkie materiały jednorazowego użytku wykorzystane w części biologicznej pracy (probówki, szalki Petriego, płytki i probówki do reakcji Real-time PCR, etc.) pochodziły z firm Nunc (Dania); Falcon Becton Dickinson (Niemcy); Medlab Products (Polska).

Tabela 3.3.1.1.1 Odczynniki zużywalne

podłoże RPMI1640 do hodowli komórkowych	Gibco, Wielka Brytania
Penicylina	Sigma, USA
Streptomycyna	Sigma, USA
bufory lizujące erytrocyty	Sigma, USA
PBS	Sigma-Aldrich, Niemcy
histopaque	Sigma-Aldrich, Niemcy
mouse CD4+ T Cell Pre-Enrichment Kit, Cat #19772A	Stemcell Technologies, Kanada
mouse CD25 Regulatory T Cell Positive Selection Kit, Cat. # 18782	Stemcell Technologies, Kanada

3.3.1.2 Aparatura wykorzystywana w pracy

- Czytnik mikropłytek FL600 (Biotec, Japonia)
- Komora laminarna (TopFlow 3, Ehret)
- Inkubator z regulowanym przepływem CO² (Heraeus, Niemcy)
- Wirówka 3K15 (Sigma, USA)
- Wirówka 4K15 (Sigma, USA)
- Wirówka eppendorf 5804R (Eppendorf, USA)

- Zamrażarka -80°C Polar 550H (AS Biomedica, Włochy)
- Cytometr przepływowy – LSRFortessa (Becton Dickinson, USA)
- Spektrofotometr Epoch (BioTek Instruments, USA)

3.3.3 Izolacja splenocytów

Pobraną od myszy śledzoną, dostarczoną w PBS-ie przeniesiono na sitko a następnie sterylnym tłokiem strzykawki przetarto przepłukując niewielką ilością PBS-u do probówki, po czym uzupełniono objętość uzyskanej zawiesiny do 5 ml. W kolejnym etapie przygotowano po jednej probówce wirowniczej (na śledzoną) o pojemności 15 ml z 8 ml fikolu na każde 5 ml uzyskanej zawiesiny. Zawiesinę delikatnie, przy pomocy pipety pasterowskiej nawarstwiono na fikol i wirowano 18 min./1800 rpm/18°C z wyłączonym hamulcem. Do świeżo przygotowanych 15 ml probówek przeniesiono przy pomocy pipety transferowej splenocyty, które po wirowaniu skupiły się w postaci tzw. obłoczka na granicy warstw fikolu i PBS-u. Uzyskane w ten sposób komórki przepłukano dwukrotnie PBS-em wirując 6 min./1600 rpm/18°C. Otrzymany pelet zawieszono w 1 ml PBS-u i policzono komórki. Otrzymane w ten sposób splenocyty podawane były bezpośrednio po przygotowaniu oseskom mysim droga dootrzewnową (*i. p.*) osobnikom dojrzałym droga dożylna (*i. v.*) bądź stanowiły materiał wyjściowy dla dalszego sortowania komórek regulatorowych oraz testu MLR.

3.3.3.1 Metoda magnetycznego sortowania komórek

W metodzie tej do izolacji wybranych populacji komórkowych wykorzystano powleczone przeciwciałami monoklonalnymi kulki magnetyczne. Przeciwciała te skierowane są przeciwko markerom powierzchniowym charakterystycznym dla danej subpopulacji komórkowej. Metoda rozdziału badanych komórek może przebiegać w dwojaki sposób: na drodze selekcji pozytywnej, bądź negatywnej. W **selekcji pozytywnej** po związaniu się antygenów badanych komórek z przeciwciałami przyczepionymi do kulek magnetycznych, przykłada się do kolumny magnes, co powoduje, że pożądane komórki zostają w kolumnie, a reszta jest usuwana. W **selekcji negatywnej**, szukane komórki są w wyplukiwane w pierwszej kolejności, natomiast niepożądane zostają w kolumnie.

W pracy wykorzystano zestawy do selekcji negatywnej jak i pozytywnej EasyStep Stemcell Technologies, a procedura przebiegała według załączonego do zestawu protokołu. W pierwszej kolejności przeprowadzono selekcję negatywną limfocytów T CD4+. W tym celu do uzyskanej na świeżo zawiesiny 1 ml splenocytów mysich, dodano:

- **5% szczurzego serum** (normal rat serum), aby zapobiec łączeniu się przeciwciał szczurzych z mysimi
- **50 µl mieszaniny wzbogacającej** (pre-enrichment cocktail) zawierającej szczurze przeciwciała monoklonalne wzbogacone biotyną, skierowane przeciw mysim komórkom CD8, CD11b, CD19, CD24, CD45R, CD49b – inkubacja w temperaturze pokojowej (15-22°C) przez 15 min.
- **150 µl mieszaniny** (biotin selection cocktail) zawierającej mysie przeciwciała monoklonalne IgG₁ skierowane przeciw biotynie – inkubacja w temperaturze pokojowej (15-22°C) przez 15 min.
- po dokładnym wymieszaniu przez 30 sekund, **150 µl zawiesiny kulek magnetycznych** – inkubacja w temperaturze pokojowej (15-22°C) przez 10 min.
- **PBS** (rekomendowanego medium), dopełniając do 2,5 ml

Po uprzednim, delikatnym, kilkukrotnym rozpipetowaniu zawiesiny, próbkę umieszczono w magnesie na 5 min. Po upływie wyznaczonego czasu zlano zawartość próbki do nowej 5 ml polistyrenowej próbki; do pozyskanej w ten sposób zawiesiny **dodano 200 µl roztworu blokującego** (blockin solution) po czym powtórzono etap z zawiesiną kulek magnetycznych dwa razy. Uzyskaną na końcu zawiesinę komórek zwirowano dwukrotnie (250xg, 10 min.) w PBS, zlano supernatant a pelet zawieszono w 1 ml PBS.

W drugim etapie przeprowadzono selekcję pozytywną CD25+. Do uzyskanej w pierwszym etapie selekcji zawiesiny komórek CD4+ w objętości 1 ml dodano:

- **50 µl mieszaniny** (CD25 PE labeling reagent) zawierającej przeciwciała skierowane przeciw mysim CD16/32 – inkubacja w temperaturze pokojowej (15-22°C) przez 15 min.

- **33µl mieszaniny** (PE selection cocktail) zawierającej mysie przeciwciała monoklonalne – inkubacja w temperaturze pokojowej (15-22°C) przez 15 min.
- po dokładnym wymieszaniu, **50 µl zawiesiny nanocząstek magnetycznych** (SA magnetic nanoparticles) – inkubacja w temperaturze pokojowej (15-22°C) przez 10 min.
- **PBS** , dopełniając do 2,5 ml

Po uprzednim, delikatnym, kilkukrotnym rozpipetowaniu zawiesiny, próbkę umieszczono w magnesie na 5 min. Po upływie wyznaczonego czasu zlano supernatant zawierający komórki CD4+CD25^{neg} do nowej 5 ml polistyrenowej próbki. Związane z magnetycznymi nanocząstkami komórki CD4+CD25⁺ pozostały w próbce pierwszej. Po wyjęciu próbki z magnesu dolano 2,5 ml PBS-u i umieszczono ją ponownie w magnesie na 5 min., czynność powtórzono dwukrotnie. W końcowym etapie komórki CD4+CD25⁺ po zawieszeniu ich w pożądanej objętości PBS były gotowe do użytku.

3.3.4 Analiza aktywności wybranych subpopulacji komórek regulatorowych

W celu przeprowadzenia oceny ekspresji markerów charakterystycznych dla limfocytów T regulatorowych, zastosowano metodę cytometrii przepływowej. Pozwala ona na pomiar fluorescencji emitowanej z pojedynczych komórek. Za fluorescencję odpowiadają fluorochromy sprzężone z przeciwciałami swoiście wiążącymi się z antygenami na błonie komórkowej lub wewnątrz komórki.

Komórki śledziona mysiej przenoszono do próbek cytometrycznych w ilości 100 tys komórek/probówka. Do każdej próbki dodawano przeciwciał skierowanych przeciwko markerom powierzchniowym w ilości 5µl. Jako kontrolę stosowano komórki nieznakowane przeciwciałami. Następnie komórki inkubowano z przeciwciałami w ciemności w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po tym czasie komórki płukano i przygotowywano do barwienia wewnątrzkomórkowego czynnika FoxP3. W tym celu komórki permeabilizowano (FoxP3 Fixation/Permeabilization, inkubacja 4°C 60 minut). Po dwukrotnym płukaniu buforem do permeabilizacji, komórki zawieszano

w 300ul PBS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSRFortessa (Becton Dickinson, USA).

Tabela 3.3.4.1: Przeciwciała monoklonalne używane w oznaczeniach cytometrycznych (specyficzność z fluorochromem, klon, producent)

Anti-Mouse/Rat Foxp3 eFluor® 450, clone FJK-16s,	(ebioscience, USA)
Anti-Mouse CD62L (L-Selectin) APC, clone MEL-14,	(ebioscience, USA)
Anti-Mouse CD127 PE-Cyanine7, clone A7R34,	(ebioscience, USA)
Anti-Mouse CD25 PerCP-Cyanine5.5, clone PC61.5,	(ebioscience, USA)
Anti-mouse CD45RA PE clone 14.8,	(BDBioscience, USA)
Anti-mouse CD4 FITC IgG2a clone RM4-5,	(BDBioscience, USA)

3.3.5 Analiza statystyczna

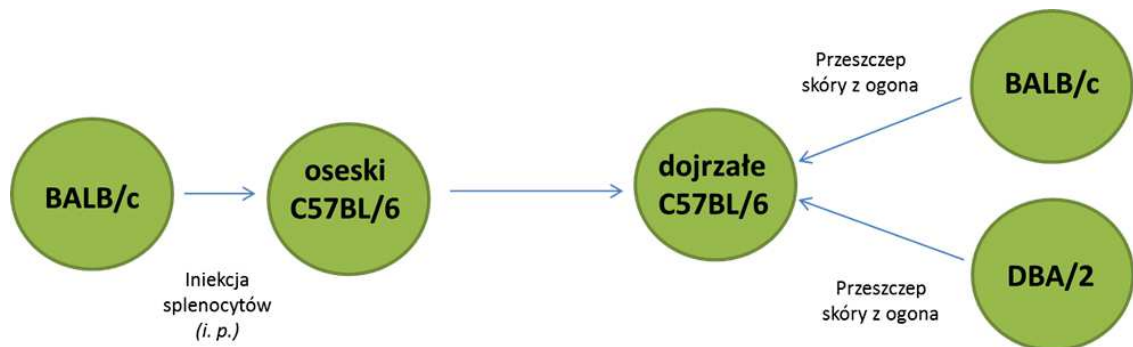
Obliczenia statystyczne wykonywano przy użyciu programu Statistica, wersja 12.0 (Statsoft Polska). Zgodność rozkładu zmiennych ilościowych z rozkładem normalnym analizowana była za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa. Zmienne ilościowe analizowane w badaniu nie spełniały założeń testów parametrycznych. Dlatego też do porównania dwóch zmiennych ilościowych zastosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya, a do porównania wielu zmiennych – test nieparametryczny ANOVA rang Kruskala Wallisa. We wszystkich obliczeniach wartości $p < 0,05$ przyjmowano jako znamienne statystycznie (przy graficznym przedstawianiu wyników zaznaczano je symbolem (*) lub czerwonym kolorem).

4. Wyniki

4.1 Alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją splenocytów dawcy u biorcy C57BL/6

4.1.1 Indukcja tolerancji po urodzeniu

W pierwszym modelu doświadczenia 1-dniowym oseskom myszy szczepu C57BL/6 podawane były dootrzewnowo splenocyty myszy szczepu BALB/c. (Ryc. 4.1.1.1)



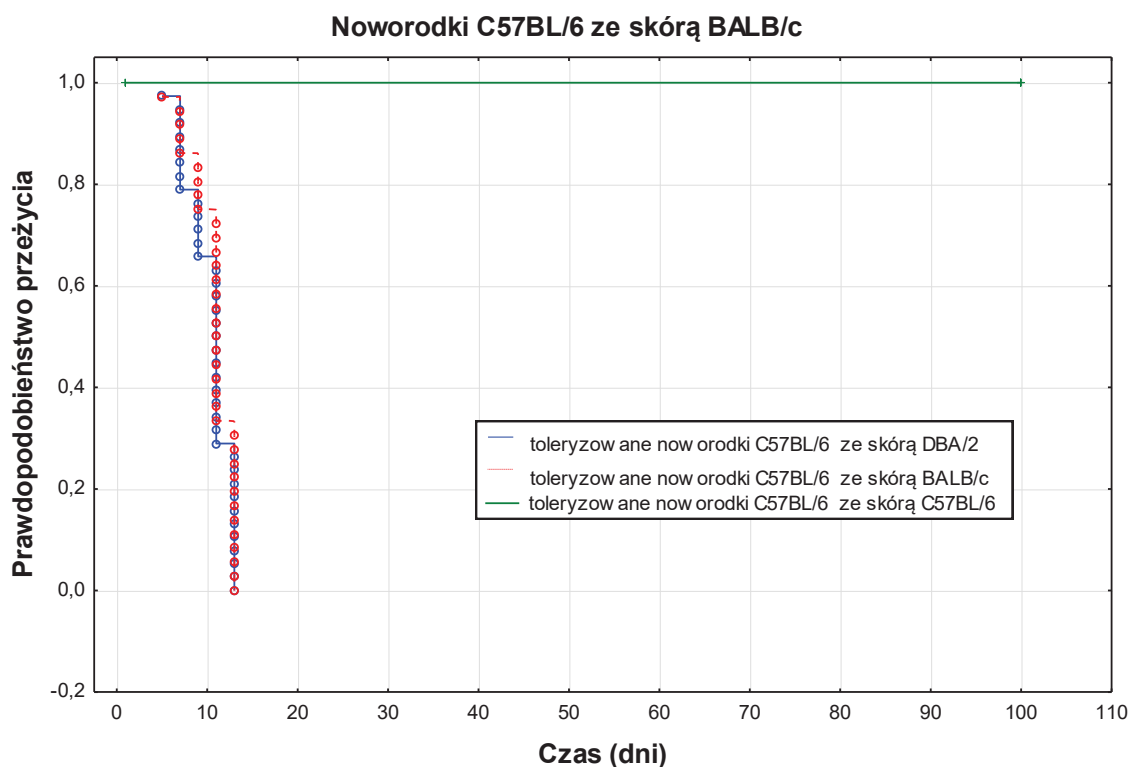
Ryc.4.1.1.1 Schemat doświadczenia

Oseskom myszy C57BL/6 podano dootrzewnowo w pierwszej dobie życia wyizolowane ze śledzion BALB/c splenocyty w objętości 30 μ l na mysz w trzech ilościach: 300 tys., 1 mln i 3 mln komórek. Połowie zwierząt po osiągnięciu 1 miesiąca (4 tyg.) życia wykonano przeszczepy skóry od myszy BALB/c i DBA/2 (skóra z ogona) w okolicę prawego boku ciała. Myszy obserwowano, kontrolowano masę ciała oraz wykonywano zdjęcia w kolejnych dniach od wykonania przeszczepu. Zwierzęta, u których zaobserwowano znaczny spadek masy ciała lub ogólny zły stan zdrowia, poddano eutanazji; od pozostałych pobrano śledziony, które poddano analizom cytometrycznym oraz testom MLR. Drugiej połowie myszy C57BL/6 wykonano przeszczepy po ukończeniu przez zwierzęta 3 miesiąca życia (12 tyg.).

Niestety okazało się, że taki zabieg nie doprowadza do akceptacji skóry dawców BALB/c u dorosłych myszy C57BL/6 toleryzowanych splenocytami dawcy. Niezależnie od zastosowanej dawki splenocytów BALB/c oraz niezależnie od tego czy przeszczepu skóry dokonano 1 miesiąc czy 3 miesiące po urodzeniu, zwierzęta szybko odrzucały przeszczep (Ryc. 4.1.1.2). Kontrolę pozytywną w eksperymencie stanowił izogeniczny przeszczep od myszy C57BL/6, który był przyjmowany.

Tabela 4.1.1.1

alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją splenocytów dawcy u biorcy C57BL/6 (po ukończeniu 1 m-ca i 3 m-ca życia)						
iniekcja splenocytów od BALB/c w ilości:	300 tys.		1 mln		3 mln	
przeszczep skóry od (szczep):	BALB/c	DBA/2	BALB/c	DBA/2	BALB/c	DBA/2
po 1 miesiącu przyjęty/odrzucony (ilości zwierząt)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
po 3miesiącach przyjęty/odrzucony (ilości zwierząt)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5



Ryc. 4.1.1.2 Prawdopodobieństwo przeżycia przeszczepu skóry. Nieudana indukcja tolerancji w pierwszej dobie życia w modelu biorca C57BL/6 – dawca BALB/c, indukcja tolerancji splenocytami BALB/c. Noworodki C57BL/6 toleryzowane (indukcja tolerancji) splenocytami BALB/c w pierwszej dobie życia, po uzyskaniu wieku 4 lub 12 tygodni (wykres pokazuje łączny wynik po 1 i po 3 miesiącach) otrzymywały przeszczep skóry od dawcy BALB/c ($n=30$, linia czerwona) lub dawcy DBA/2 ($n=30$, linia niebieska). We wszystkich przypadkach, zarówno w modelu spodziewanej tolerancji skóry BALB/c, jak i przy spodziewanym odrzucaniu ze skórą dawcy DBA/2 dochodziło do odrzucania. Jako kontrolę zastosowano całkowicie niezgodny przeszczep od myszy DBA/2, który z definicji powinien być odrzucony. Kontrolę pozytywną stanowił izogeniczny przeszczep od myszy C57BL/6, który był przyjmowany ($n=10$).

4.1.2 Indukcja tolerancji po urodzeniu splenocytami mieszańców F1 C57BL/6 x BALB/c

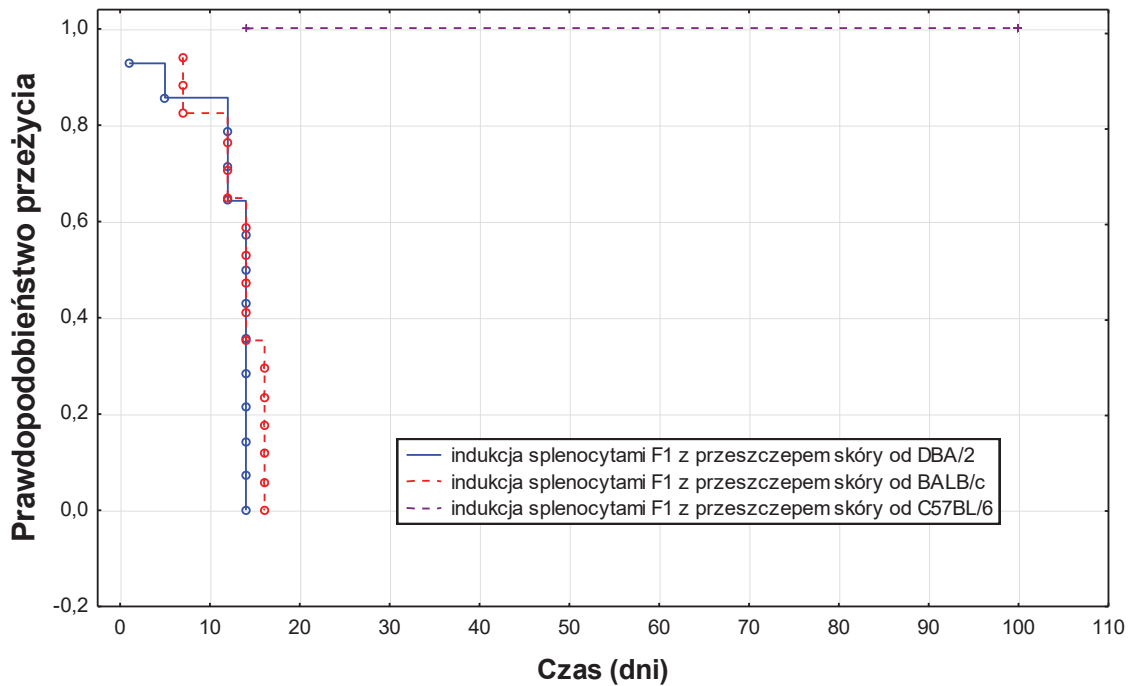
Zmodyfikowany model pierwszy zakładał mniejszą dyskryminacyjną niezgodność MHC i zamiast dzikiego szczepu BALB/c, do indukcji tolerancji użyto splenocytów wyizolowanych ze śledzion mieszańców F1 C57BL/6 x BALB/c (B6CF1) wstrzykiwanych następnie oseskom C57BL/6.

Tabela 4.1.2.1

alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją <u>splenocytów mieszańców B6CF1</u> u biorecy C57BL/6 (po ukończeniu 2 m-ca życia)			
iniekcja splenocytów od B6CF1:			
przeszczep skóry od (szczep):	BALB/c	DBA/2	C57BL/6
przyjęty/odrzucony (ilości)	0/18	0/12	8/0

Oseskom myszy C57BL/6 podano dootrzewnowo w pierwszej dobie życia wyizolowane ze śledzion myszy B6CF1 splenocyty w objętości 30µl na mysz w ilości 1 mln komórek. U zwierząt po osiągnięciu 2 miesiąca życia (8 tyg.) wykonano przeszczepy skóry od myszy BALB/c, DBA/2, C57BL/6 (skóra z ogona) w okolicę prawego boku ciała. Myszy obserwowano, kontrolowano masę ciała oraz wykonywano zdjęcia w kolejnych dniach od wykonania przeszczepu. Zwierzęta, u których zaobserwowano znaczny spadek masy ciała lub ogólny zły stan zdrowia poddano eutanazji; od pozostałych pobrano śledziony, które poddano analizom cytometrycznym. Niestety, także w tym przypadku (niezależne doświadczenia, razem n=38) dochodziło do odrzucania we wszystkich przypadkach. Niemniej jednak, w tym modelu zauważyliśmy nieistotnie dłuższe przeżycie przeszczepów skóry od dawców BALB/c (p=0.22).

Noworodki C57BL/6 toleryzowane F1 C57BL/6 x BALB/c z przeszczepem skóry BALB/c lub DBA/2 lub C57BL/6



Ryc. 4.1.2.1 Prawdopodobieństwo przeżycia przeszczepu skóry. Nieudana indukcja tolerancji w pierwszej dobie życia w modelu biorca C57BL/6 – dawca BALB/c, indukcja tolerancji splenocytami mieszańców F1C57BL/6xBALB/c. Noworodki C57BL/6 toleryzowane splenocytami mieszańców F1C57BL/6xBALB/c w pierwszej dobie życia, po uzyskaniu wieku 8 tygodni otrzymywały przeszczep skóry od dawcy BALB/c (n=18, linia czerwona) lub dawcy DBA/2 (n=12, linia niebieska). We wszystkich przypadkach dochodziło do odrzucania. Niemniej jednak odrzucanie przeszczepu od dawcy BALB/c występowało nieistotnie później (p=0.22). Kontrolę pozytywną stanowił izogeniczny przeszczep od C57BL/6 (n=8).

4.1.3 Indukcja tolerancji po urodzeniu subpopulacjami splenocytów mieszańców F1C57BL/6xBALB/c

Kontynuując prace w tym modelu, przed iniekcją przeprowadzono izolacje limfocytów Treg CD4+CD25+ oraz Tconv CD4+CD25- ze splenocytów mieszańców F1C57BL/6xBALB/c i dopiero tak separowane komórki podane zostały oseskom myszy

C57BL/6 w pierwszej dobie życia. Dodatkowe założenie stanowił fakt, że wstrzykiwany materiał jest nie tylko „nośnikiem” obcego MHC, ale również, że komórki te potrafią przeżyć i aktywnie regulować odpowiedź immunologiczną u osobnika dorosłego, który otrzymał przeszczep 8 tygodni po indukcji tolerancji.

Tabela 4.1.3.1

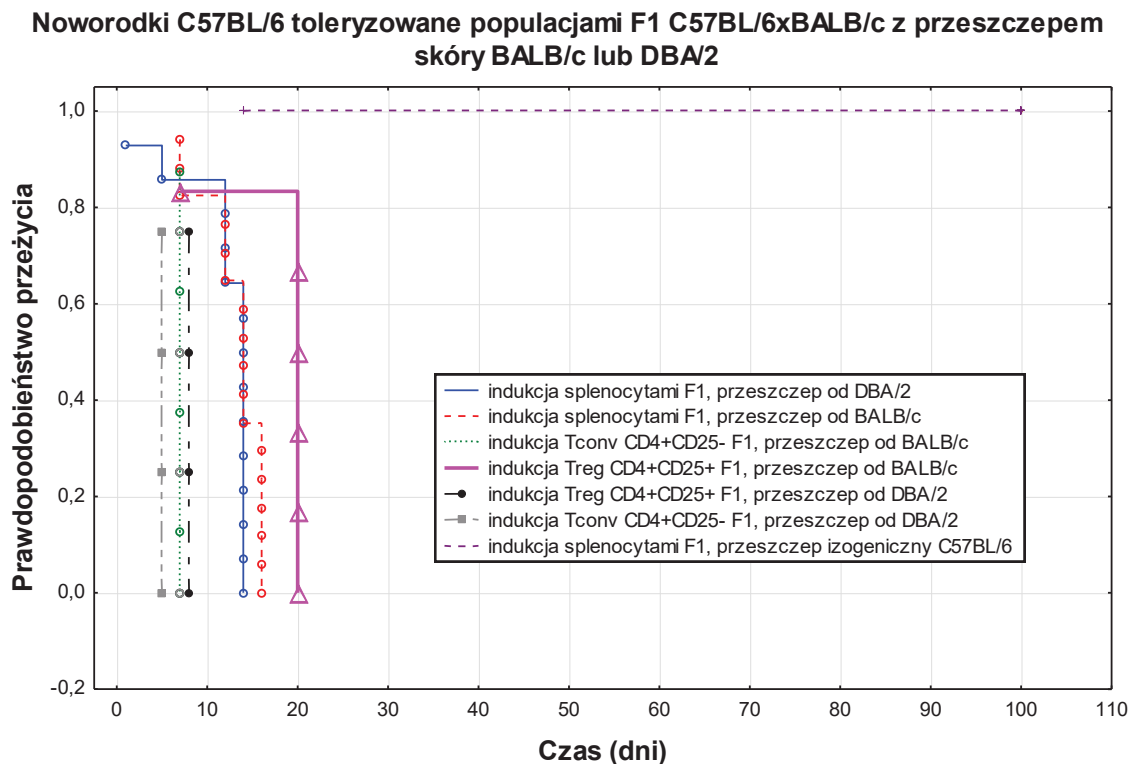
alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją subpopulacji splenocytów mieszańców B6CF1 w ilości 1 mln i 2 mln komórek u biorcy C57BL/6 (po ukończeniu 2 m-ca życia)				
iniekcja subpopulacji splenocytów od B6CF1:	Tconv. CD4+CD25-		Treg CD4+CD25+	
przeszczep skóry od (szczep):	BALB/c	DBA/2	BALB/c	DBA/2
przyjęty/odrzucony (ilości zwierząt)	0/8	0/6	0/8	0/6

Osekom myszy C57BL/6 podano dootrzewnowo w pierwszej dobie życia wyizolowane ze śledzion B6CF1 komórki CD4+CD25+ i CD4+CD25- w objętości 30µl na mysz w ilości 1-2 mln komórek. U zwierząt po osiągnięciu 2 miesiąca życia wykonano przeszczepy skóry od myszy BALB/c, DBA/2 i kontrolnie od C57BL/6 (skóra z ogona) w okolicę prawego boku ciała. Myszy obserwowano, kontrolowano masę ciała oraz wykonywano zdjęcia w kolejnych dniach od wykonania przeszczepu. Po dwóch tygodniach od przeszczepu zwierzęta poddano eutanazji, pobrano od nich śledziony i poddano je analizom cytometrycznym.

Zauważono, że myszy C57BL/6, które jako oseski otrzymały iniekcję limfocytów Treg pochodzących od mieszańców F1C57BL/6xBALB/c istotnie dłużej utrzymywały przeszczep skóry od dawcy BALB/c w porównaniu z osobnikami, które były indukowane niesortowanymi splenocytami mieszańców i otrzymały przeszczep od dawcy DBA/2 (p=0.009) (grupa kontrolna z całkowicie niezgodnym przeszczepem od myszy DBA/2, który z definicji powinien być odrzucany).

Z drugiej jednak strony myszy C57BL/6, które jako oseski otrzymały iniekcję limfocytów Tconv od mieszańców F1C57BL/6xBALB/c odrzucały przeszczep istotnie szybciej w porównaniu z osobnikami, które były indukowane niesortowanymi splenocytami mieszańców i otrzymały przeszczep od dawcy DBA/2 ($p=0.025$ dla przeszczepu od dawcy DBA/2 oraz $p=0.004$ dla przeszczepu od dawcy BALB/c). Interesujący okazał się również fakt, iż indukcja tolerancji limfocytami Treg mieszańców F1C57BL/6xBALB/c nie chroniła przed odrzutem przeszczepu od dawcy DBA/2 ($p=0.025$).

Niemniej jednak, w efekcie końcowym, wszystkie przeszczepy zakończyły się odrzutami, a różnica dotyczyła jedynie czasu odrzucania.



Ryc. 4.1.3.1 Prawdopodobieństwo przeżycia przeszczepu skóry. Indukcja tolerancji w pierwszej dobie życia w modelu biorca C57BL/6 – dawca BALB/c, indukcja tolerancji subpopulacjami komórek mieszańców F1C57BL/6xBALB/c. Wyniki z użyciem sortowanych subpopulacji Tconv CD4+CD25- oraz Treg CD4+CD25+

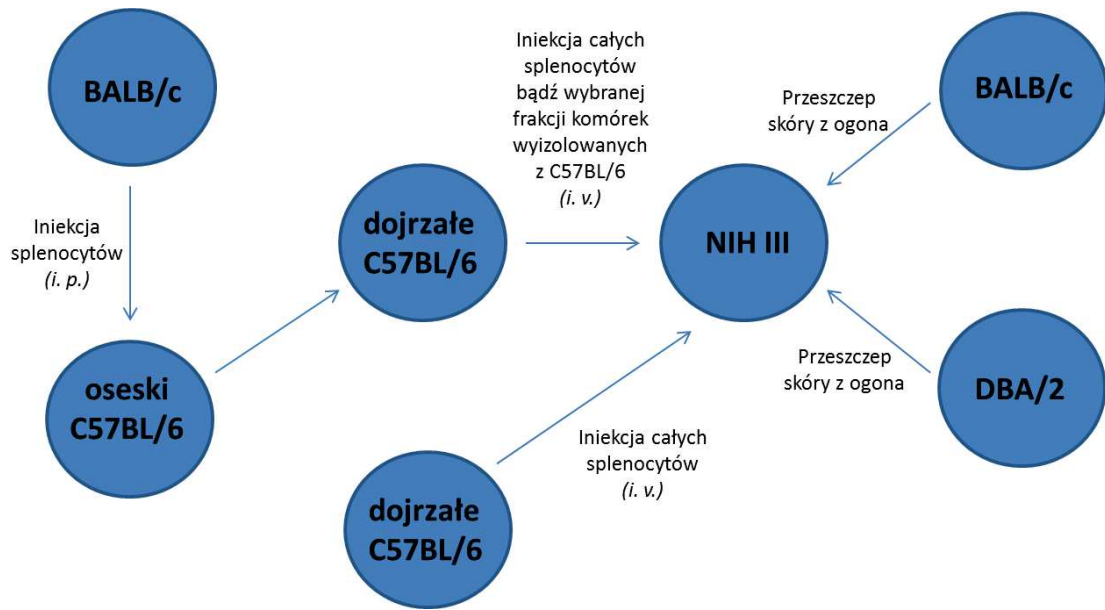
pochodzących ze splenocytów mieszańców F1C57BL/6xBALB/c nałożono na wyniki bez sortowania z poprzedniego eksperymentu (z Ryc. 4.1.2.1), aby uwidocznić zaobserwowane różnice. Noworodki C57BL/6 toleryzowane limfocytami Treg B6CF1 w pierwszej dobie życia, po uzyskaniu wieku 8 tygodni otrzymywały przeszczep skóry od dawcy BALB/c (linia fioletowa i trójkąty, n=8). W grupie tej zaobserwowano istotnie najdłuższe przeżycie przeszczepu. Gdy oseski były toleryzowane limfocytami Tconv CD4+CD25-, to niezależnie od otrzymanego przeszczepu dochodziło do bardzo szybkiego odrzucania (dawca BALB/c – zielona kropkowana linia i kółka, n=8; dawca DBA/2 – linia szara i kwadraty, n=6). Podobnie szybko odrzucały myszy C57BL/6 toleryzowane limfocytami Treg B6CF1, które otrzymały przeszczep od dawcy DBA/2 (linia czarna, n=6).

4.2 Alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją splenocytów dawcy u biorcy NIH III

4.2.1. Indukcja tolerancji u myszy NIH III

Użycie modelu z wykorzystaniem myszy szczepu NIH III pozwoliło na całkowitą eliminację zjawiska tolerancji centralnej, ponieważ zwierzęta te nie posiadają grasicy i nie wykazują limfopoezy szpikowej (nie posiadają limfocytów T, B i NK).

W drugim modelu myszy NIH III zasiedlano układem odpornościowym myszy C57BL/6 indukowanych splenocytami BALB/c w pierwszej dobie życia. W zależności od wybranej frakcji komórek myszy NIH III zasiedlano splenocytami lub limfocytami Treg CD4+CD25+ lub limfocytami Tconv CD4+CD25-, a następnie wykonywano przeszczep skóry od dawcy BALB/c albo DBA/2. (Ryc. 4.2.1.1)



Ryc. 4.2.1.1 Schemat doświadczenia

Myszom NIH III podano dożylnie (żyła ogonowa – igła 0,4mm x 19mm, strzykawka 1ml) wybrane frakcje komórek wyizolowane ze śledziony myszy C57BL/6, którym wcześniej (oseski) podano dootrzewnowo splenocyty myszy BALB/c oraz od C57BL/6 nietolerowanych. Następnie po upływie 10 dni wykonano przeszczepy skóry z ogona myszy BALB/c lub DBA/2 w okolicę prawego boku ciała. Myszy obserwowano, kontrolowano masę ciała oraz wykonywano zdjęcia w kolejnych dniach od wykonania przeszczepu. Zwierzęta, u których zaobserwowany znaczny spadek masy ciała lub ogólny zły stan zdrowia poddano eutanazji; od pozostałych pobrano śledziony, które poddano analizom cytometrycznym.

Tabela 4.2.1.1

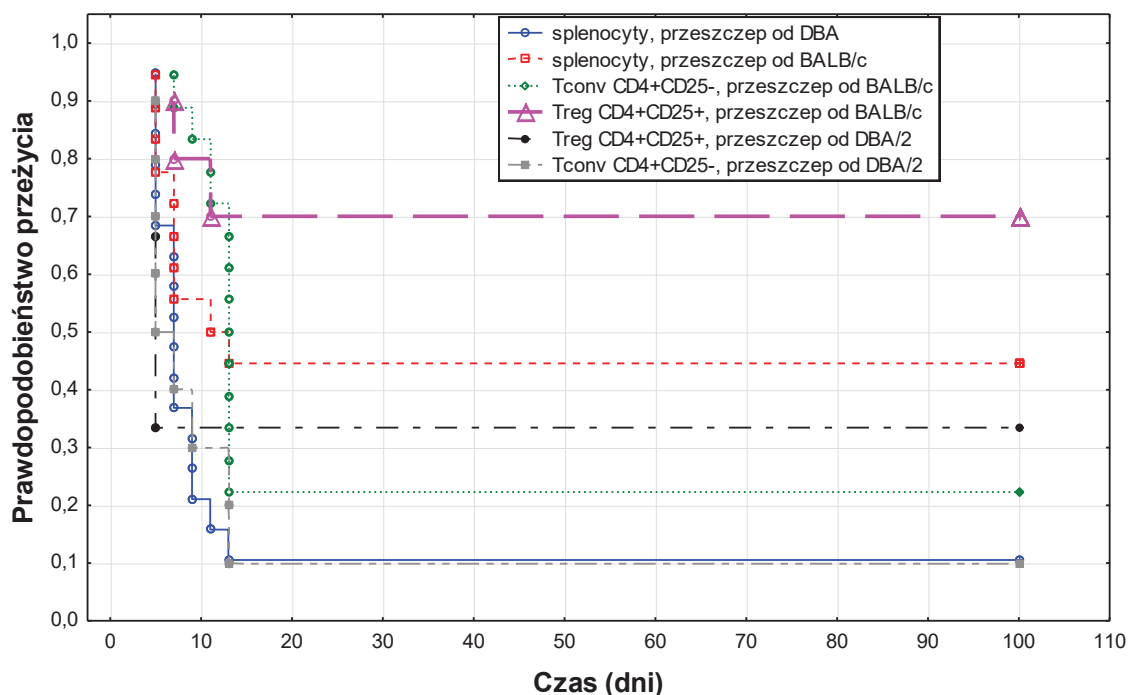
alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją splenocytów dawcy u biorecy NIH III								
iniekcja od C57BL/6:	splenocytów		Tconv CD4+CD25-		Treg CD4+CD25+		splenocytów od zwierząt bez indukcji tolerancji	
przeszczep skóry od (szczep):	BALB/c	DBA/2	BALB/c	DBA/2	BALB/c	DBA/2	BALB/c	DBA/2
przyjęty/odrzucony (ilości zwierząt*)	4/5	2/6	5/5	1/8	4/1	1/2	0/1	0/3
odsetek przyjętych przeszczepów	44%	25%	50%	11%	80%	33%	0%	0%



Ryc. 4.2.1.2 NIH III z przyjętym, wygojonym przeszczepem skóry od BALB/c w kolejnych dniach (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) od wykonania procedury.

Myszy NIH III, które otrzymały limfocyty Treg CD4+CD25+ istotnie częściej akceptowały przeszczep skóry pochodzący od dawcy BALB/c ($p=0.0023$ w porównaniu z biorcami splenocytów z przeszczepem skóry od DBA/2, $p=0.016$ w porównaniu z biorcami limfocytów Tconv CD4+CD25- z przeszczepem skóry od BALB/c oraz $p=0.13$ w porównaniu z biorcami splenocytów z przeszczepem skóry od BALB/c). Należy jednak podkreślić, iż właściwie w każdej grupie obserwowano długotrwałe przeżycia, co pokazuje „ułamność” modelu.

Myszy NIH III zasiedlone splenocytami/limfocytami C57BL/6 indukowanymi BALB/c, przeszczep skóry BALB/c lub DBA/2



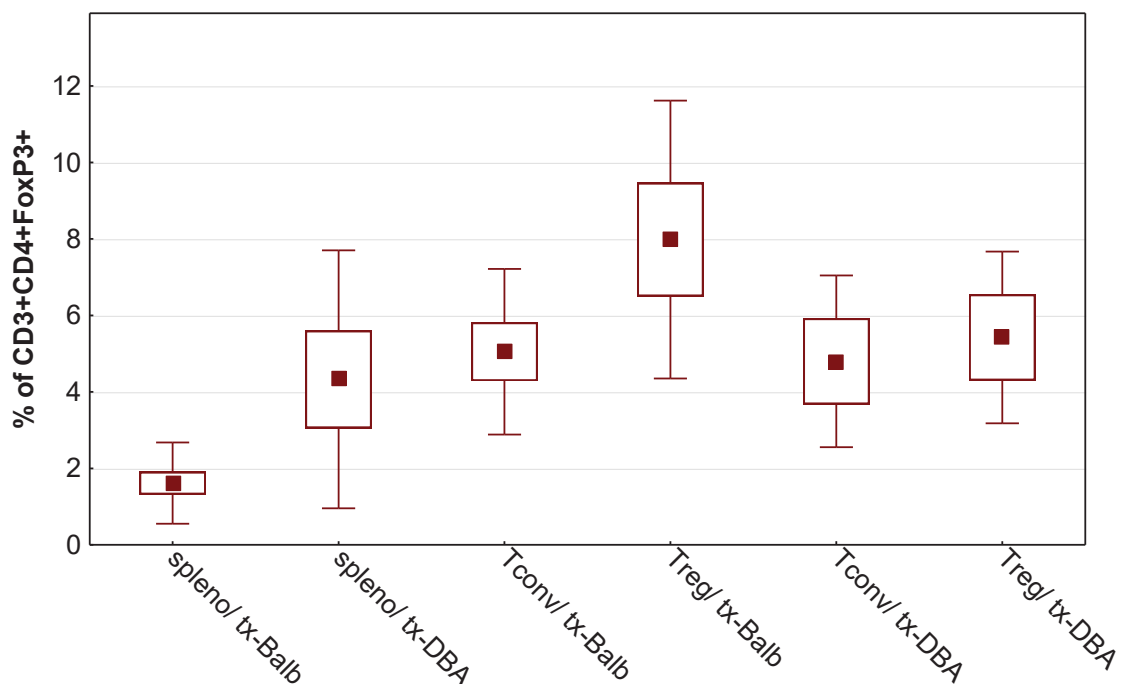
Ryc. 4.2.1.3 Prawdopodobieństwo przeżycia przeszczepu skóry. Indukcja tolerancji u myszy NIH III zasiedlonych splenocytami lub limfocytami od myszy C57BL/6 indukowanych splenocytami BALB/c w pierwszej dobie życia. Myszy NIH III otrzymały następnie przeszczep skóry od dawcy BALB/c lub DBA/2. W grupie zasiedlonej limfocytami Treg z przeszczepem od BALB/c zaobserwowano istotnie najdłuższe prawdopodobieństwo przeżycia przeszczepu. Nieco gorsze wyniki zaobserwowano u osobników zasiedlonych całymi splenocytami z przeszczepem skóry od BALB/c. Zasiedlenie limfocytami Treg powodowało też słabą protekcję przeszczepów skóry od DBA/2. Wyniki łączne dla trzech niezależnych eksperymentów, łącznie po 10 myszy NIH III w każdej grupie (razem pełne i niekompletne obserwacje).

4.3 Subpopulacje

4.3.1 FoxP3 (doświadczenia z chimerami F1 C57BL/6xBALB/c)

Poziom limfocytów Treg FoxP3⁺ był najwyższy w grupie myszy C57BL/6, które otrzymały iniekcję limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ izolowanych ze śledzion mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c, a następnie, 8 tygodni później, przeszczep skóry od myszy BALB/c (był on istotnie wyższy w porównaniu z innymi grupami zwierząt, $p < 0.05$). Z drugiej strony, najniższe poziomy limfocytów Treg FoxP3⁺ obserwowano w grupie myszy C57BL/6, które otrzymały iniekcję splenocytów mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c, a następnie 8 tygodni później przeszczep skóry od myszy BALB/c ($p < 0.05$ w porównaniu ze wszystkimi grupami).

Noworodki C57BL/6 toleryzowane populacjami F1 C57BL/6 x BALB/c z przeszczepem skóry BALB/c lub DBA/2



Ryc. 4.3.1.1 Poziom limfocytów T regulatorowych CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ w modelu przeszczepu skóry biorca C57BL/6 – dawca BALB/c, indukcja tolerancji splenocytami lub subpopulacjami komórek mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c. Poziomy limfocytów Treg kolejno dla grup indukowanych splenocytami mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c

z przeszczepem od BALB/c ('spleno/ tx=Balb') albo od DBA/2 ('spleno/ tx=DBA'), indukowanych limfocytami Tconv CD4+CD25- lub Treg CD4+CD25+ pochodzących ze splenocytów mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od BALB/c ('Tconv/ tx-Balb' oraz 'Treg/ tx=Balb') lub indukowanych limfocytami Tconv CD4+CD25- lub Treg CD4+CD25+ pochodzących ze splenocytów mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od DBA/2 ('Tconv/ tx-DBA' oraz 'Treg/ tx=DBA'). **Najwyższy odsetek limfocytów Treg zanotowano w grupie indukowanej limfocytami Treg mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem skóry od BALB/c (n=8 dla każdej grupy, n=48 razem).**

Tabela 4.3.1.1

Poziomy FoxP3 statystyka efekt główny dla porównania wszystkich grup: F=6,33, p=0,00025

FoxP3 statystyka post hoc NIR

	spleno/ tx=DBA {1}	spleno/ tx=Balb {2}	Tconv/ tx-Balb {3}	Treg/ tx=Balb {4}	Treg/ tx=DBA {5}	Tconv/ tx-DBA {6}
spleno/ tx=DBA {1}		0,022	0,568	0,010	0,474	0,757
spleno/ tx=BALB {2}	0,022		0,003	0,000005	0,009	0,027
Tconv/ tx-Balb {3}	0,568	0,003		0,031	0,801	0,866
Treg/ tx=Balb {4}	0,010	0,000005	0,031		0,110	0,048
Treg/ tx=DBA {5}	0,474	0,009	0,801	0,110		0,717
Tconv/ tx-DBA {6}	0,757	0,027	0,866	0,048	0,717	

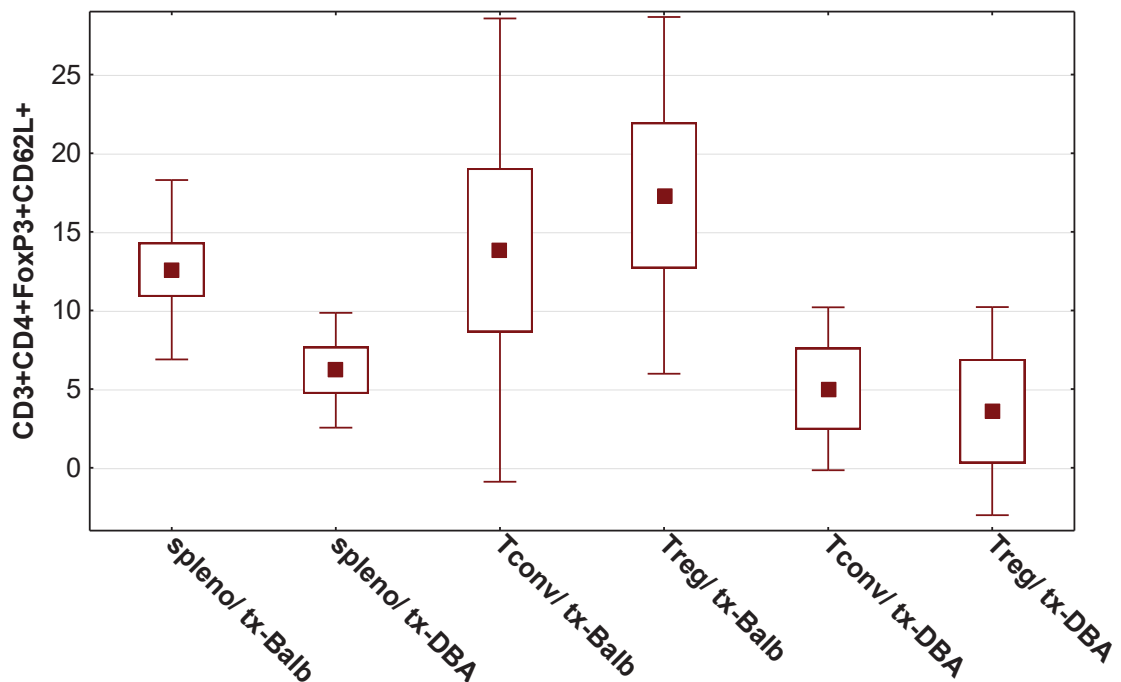
4.3.2 Subpopulacje Treg/Tconv (doświadczenia z mieszańcami F1 C57BL/6xBALB/c)

Wśród subpopulacji limfocytów T CD4+ znaleźliśmy jedną, która w istotny sposób korelowała z dłuższym przeżyciem przeszczepu skóry od BALB/c: **limfocyty Treg FoxP3+CD62L+**. Obserwowano także korelację między dłuższym przeżyciem

przeszczepu i poziomami konwencjonalnych limfocytów T naiwnych FoxP3-CD62L+CD45RA+, ale nie było to istotne statystycznie.

Odsetek limfocytów Treg FoxP3+CD62L+ u myszy C57BL/6, które otrzymały iniekcję Treg od mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c, był istotnie wyższy w porównaniu do wszystkich grup zwierząt, które otrzymały przeszczep od DBA/2 ($p < 0.05$). Podobnie odsetek limfocytów Tconv naiwnych CD62L+CD45RA+ u myszy C57BL/6, które otrzymały iniekcję Treg od mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c, był istotnie wyższy w porównaniu do wszystkich grup zwierząt, które otrzymały przeszczep od DBA/2 ($p < 0.05$). Z drugiej strony, u myszy z przeszczepami od DBA/2 notowano istotnie wyższe odsetki konwencjonalnych limfocytów T efektorowych pamięci FoxP3-CD62L-CD45RA-, natomiast różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej (nie pokazano).

Noworodki C57BL/6 toleryzowane populacjami F1 C57BL/6 x BALB/c z przeszczepem skóry BALB/c lub DBA/2



Ryc. 4.3.2.1 Poziom limfocytów T regulatorowych CD3+CD4+FoxP3+CD62L+ w modelu przeszczepu skóry biorca C57BL/6 – dawca BALB/c, indukcja tolerancji splenocytami lub subpopulacjami mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c. Poziomy

limfocytów Treg FoxP3+CD62L+ kolejno dla grup indukowanych splenocytami mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od BALB/c ('spleno/ tx=Balb') albo od DBA/2 ('spleno/ tx=DBA'), indukowanych limfocytami Tconv CD4+CD25- lub Treg CD4+CD25+ pochodzących ze splenocytów mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od BALB/c ('Tconv/ tx-Balb' oraz 'Treg/ tx=Balb') lub indukowanych limfocytami Tconv CD4+CD25- lub Treg CD4+CD25+ pochodzących ze splenocytów mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od DBA/2 ('Tconv/ tx-DBA' oraz 'Treg/ tx=DBA'). **Najwyższe odsetki limfocytów Treg CD62L+ zanotowano w grupie indukowanej limfocytami Treg mieszańców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem skóry od BALB/c, nieco niższe ale nadal wysokie dotyczyły także pozostałych grup zwierząt z przeszczepem od BALB/c (n=8 dla każdej grupy, n=48 razem).**

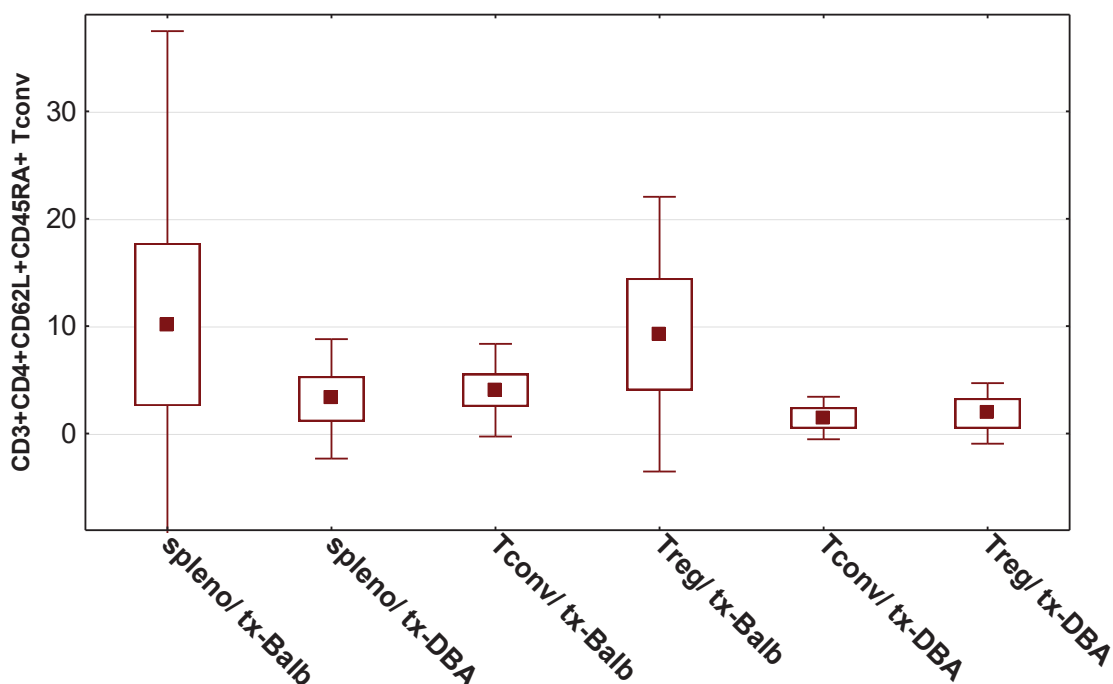
Tabela 4.3.2.1

Odsetek limfocytów Treg naiwnych FoxP3+CD62L+, statystyka efekt główny dla porównania wszystkich grup: F=1,984 p=0,106

Odsetek limfocytów Treg naiwnych FoxP3+CD62L+ statystyka post hoc NIR

populacja limfocytów użyta w transferze/ skóra użyta do przeszczepu	spleno/ tx=Balb {1}	spleno/ tx=DBA {2}	Tconv/ tx-Balb {3}	Treg/ tx=Balb {4}	Tconv/ tx-DBA {5}	Treg/ tx=DBA {6}
spleno/ tx=Balb {1}		0,178	0,771	0,316	0,166	0,101
spleno/ tx=DBA {2}	0,178		0,131	0,043	0,843	0,662
Tconv/ tx-Balb {3}	0,771	0,131		0,486	0,125	0,076
Treg/ tx=Balb {4}	0,316	0,043	0,486		0,045	0,026
Tconv/ tx-DBA {5}	0,166	0,843	0,125	0,045		0,827
Treg/ tx=DBA {6}	0,1019	0,662	0,076	0,026	0,827	

Noworodki C57BL/6 toleryzowane populacjami F1 C57BL/6 x BALB/c z przeszczepem skóry BALB/c lub DBA/2



Ryc. 4.3.2.2 Poziom limfocytów T konwencjonalnych naiwnych $CD3+CD4+CD62L+CD45RA+$ w modelu przeszczepu skóry biorca C57BL/6 – dawca BALB/c, indukcja tolerancji splenocytami lub subpopulacjami mieszaińców F1 C57BL/6xBALB/c. Poziomy limfocytów Tconv naiwnych $CD62L+CD45RA+$ kolejno dla grup indukowanych splenocytami mieszaińców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od BALB/c ('spleno/ tx=Balb') albo od DBA/2 ('spleno/ tx=DBA'), indukowanych limfocytami Tconv $CD4+CD25-$ lub Treg $CD4+CD25+$ pochodzących ze splenocytów mieszaińców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od BALB/c ('Tconv/ tx-Balb' oraz 'Treg/ tx=Balb') lub indukowanych limfocytami Tconv $CD4+CD25-$ lub Treg $CD4+CD25+$ pochodzących ze splenocytów mieszaińców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem od DBA/2 ('Tconv/ tx-DBA' oraz 'Treg/ tx=DBA'). Najwyższy odsetek limfocytów Tconv naiwnych zanotowano w grupie indukowanej splenocytami lub limfocytami Treg mieszaińców F1 C57BL/6xBALB/c z przeszczepem skóry od BALB/c ($n=8$ dla kaźdej grupy, $n=48$ razem).

Tabela 4.3.2.2

Odsetek limfocytów T konwencjonalnych naiwnych CD45RA+CD62L+, statystyka efekt główny dla porównania wszystkich grup: F=0,37 p=0,86

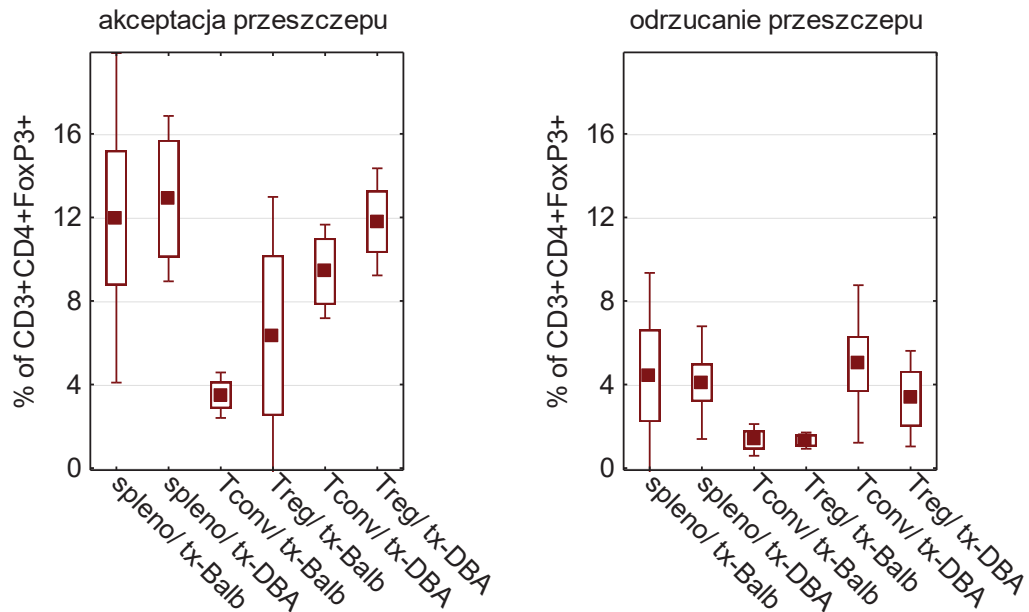
Tconv CD62L+ CD45RA+ statystyka post hoc NIR

populacja limfocytów użyta w transferze/ skóra użyta do przeszczepu	spleno/ tx=Balb {1}	spleno/ tx=DBA {2}	Tconv/ tx-Balb {3}	Treg/ tx=Balb {4}	Tconv/ tx-DBA {5}	Treg/ tx=DBA {6}
spleno/ tx=Balb {1}		0,384	0,422	0,914	0,370	0,394
spleno/ tx=DBA {2}	0,384		0,926	0,522	0,866	0,898
TvBALB {3}	0,422	0,926		0,568	0,802	0,834
TrBALB {4}	0,914	0,522	0,568		0,475	0,500
Tconv/ tx-DBA {5}	0,370	0,866	0,802	0,475		0,971
Treg/ tx=DBA {6}	0,394	0,899	0,834	0,500	0,971	

4.3.3. Subpopulacje FoxP3+ (doświadczenia z myszami NIH III)

We wszystkich grupach z wykorzystaniem myszy szczepu NIH III, które w sposób długotrwały akceptowały przeszczepy zaobserwowano wyższe odsetki limfocytów Treg FoxP3+ w porównaniu do grup, które odrzucały przeszczep.

Myszy NIH III zasiedlone splenocytami/limfocytami C57BL/6 indukowanymi BALB/c, przeszczep skóry BALB/c lub DBA/2



Rys. 4.3.3.1. Poziom limfocytów T regulatorowych CD3+CD4+FoxP3+ u myszy NIH III zasiedlonych splenocytami lub limfocytami od myszy C57BL/6 indukowanych splenocytami BALB/c w pierwszej dobie życia. Myszy NIH III otrzymały następnie przeszczep skóry od dawcy BALB/c lub DBA/2. Poziomy limfocytów Treg kolejno dla grup indukowanych splenocytami BALB/c z przeszczepem od BALB/c ('spleno/tx=Balb') albo od DBA/2 ('spleno/tx=DBA'), indukowanych limfocytami Tconv CD4+CD25- lub Treg CD4+CD25+ z przeszczepem od BALB/c ('Tconv/tx=Balb' oraz 'Treg/tx=Balb') lub z przeszczepem od DBA/2 ('Tconv/tx-DBA' oraz 'Treg/tx=DBA') (n=8 dla każdej grupy, n=48 razem).

Tabela 4.3.3.1

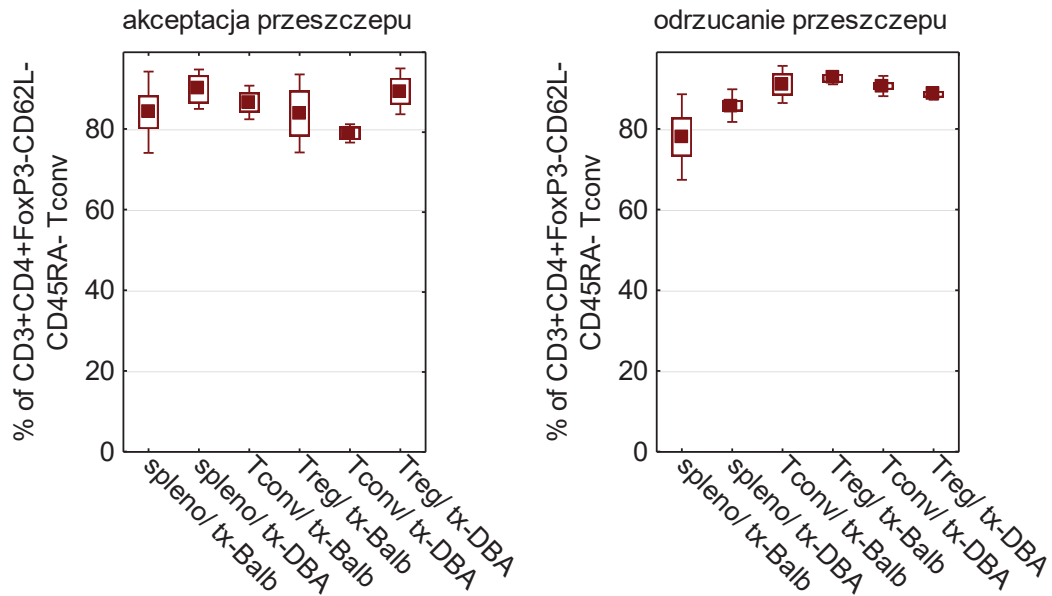
istotności (p) w teście U Manna-Whitneya, porównanie akceptacja/odrzućanie:	
p=0.096	grupa biorców splenocytów z przeszczepem skóry od BALB/c;
p=0.0034	grupa biorców splenocytów z przeszczepem skóry od DBA/2;
p=0.049	grupa biorców limfocytów Tconv CD4+CD25- z przeszczepem skóry od BALB/c;
p=0.38	grupa biorców limfocytów Treg CD4+CD25+ z przeszczepem skóry od BALB/c;
p=0.012	grupa biorców limfocytów Treg CD4+CD25+ z przeszczepem skóry od DBA/2).
p=0.015	grupa biorców limfocytów Tconv CD4+CD25- z przeszczepem skóry od DBA/2;

4.3.4. Subpopulacje Treg/Tconv (doświadczenia z myszami NIH III)

Nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic między grupami w zakresie subpopulacji limfocytów Treg, jak w przypadku myszy dzikich ($p > 0.05$). Może mieć to związek z proliferacją homeostatyczną indukowaną naturalną limfopenią myszy NIH III. Szczególnie intensywnie fenotyp zmieniały w ten sposób limfocyty Tconv – we wszystkich grupach powyżej 80% komórek Tconv należało do przedziału efektorowego/memory-like CD62L-CD45RA-. Z tego powodu wśród limfocytów w modelu z myszami NIH III nie znaleziono różnic między grupami

Limfocyty konwencjonalne

Myszy NIH III zasiedlone splenocytami/limfocytami C57BL/6 indukowanymi BALB/c, przeszczep skóry BALB/c lub DBA/2



Rys. 4.3.4.1. Poziom limfocytów T konwencjonalnych efektorowych pamięci CD3+CD4+CD62L-CD45RA- u myszy NIH III zasiedlonych splenocytami lub limfocytami od myszy C57BL/6 indukowanymi splenocytami BALB/c w pierwszej dobie życia. Myszy NIH III otrzymały następnie przeszczep skóry od dawcy BALB/c lub DBA/2. Poziomy limfocytów Tconv CD62L-CD45RA- kolejno dla grup indukowanymi splenocytami BALB/c z przeszczepem od BALB/c ('spleno/ tx=Balb') albo od DBA/2 ('spleno/ tx=DBA'), indukowanymi limfocytami Tconv CD4+CD25- lub Treg CD4+CD25+ pochodzących od BALB/c z przeszczepem od BALB/c ('Tconv/ tx-Balb' oraz 'Treg/ tx=Balb') lub z przeszczepem od DBA/2 ('Tconv/ tx-DBA' oraz 'Treg/ tx=DBA') (n=8 dla każdej grupy, n=48 razem).

Wykazano, że istnieje związek między indukcją tolerancji a poziomem limfocytów T regulatorowych. Zależności statystyczne świadczą o tym, że populacją dominującą, jeśli chodzi o związek z indukcją tolerancji, są limfocyty Treg z ekspresją CD62L.

Należy jednak podkreślić znaczenie innych zjawisk i populacji w indukcji tolerancji. Korelacja fenotypu limfocytów naiwnych (CD62L+CD45RA+) wśród konwencjonalnych limfocytów T CD4+ z dłuższym utrzymywaniem przeszczepu od

BALB/c, była prawdopodobnie związana ze skuteczną prezentacją antygenów BALB/c w grasicy noworodków. U takich zwierząt przeszczep skóry BALB/c nie powodował aktywacji limfocytów konwencjonalnych, które pozostawały w przedziale komórek naiwnych.

6. Wnioski

Analiza właściwości tolerogennych limfocytów T regulatorowych w przeszczepach narządowych w świetle ich wykorzystania jako terapii zmniejszającej ryzyko odrzutu alop przeszczepów w modelu zwierzęcym pozwoliła nam potwierdzić wyjątkowe znaczenie limfocytów Treg. W niniejszej pracy udało się wykazać, że istnieje związek między indukcją tolerancji a poziomem limfocytów T regulatorowych, w szczególności limfocytów Treg z ekspresją CD62L, co potwierdzają zależności statystyczne. Należy jednak podkreślić znaczenie innych mechanizmów i populacji w procesie indukcji tolerancji. Fakt korelacji fenotypu limfocytów naiwnych (CD62L+CD45RA+) wśród konwencjonalnych limfocytów T CD4+ z dłuższym utrzymywaniem przeszczepu od BALB/c, można tłumaczyć prawdopodobną, skuteczną prezentacją antygenów BALB/c w grasicy noworodków, a co za tym idzie delecją klonów o specyficzności względem BALB/c.

Praca pokazuje, iż wiodącą rolę w indukcji tolerancji niezgodnych przeszczepów odgrywa tolerancja centralna. Niemniej jednak, immunoregulacja z limfocytami Treg na obwodzie daje szansę na znaczne wzmocnienie tego mechanizmu, aż do trwającej do końca życia, ciągłej tolerancji u pewnego odsetka osobników.

5. Dyskusja

Niniejszy projekt miał na celu wyjaśnić znaczenie aktywności limfocytów T regulatorowych (Treg) w zjawisku tolerancji immunologicznej. W szczególności chcieliśmy ocenić jakie jest znaczenie immunoregulacji mediowanej przez te komórki w tkankach obwodowych w odniesieniu do tolerancji centralnej, obecnej w centralnych narządach limfatycznych. Prawidłowe umiejscowienie znaczenia limfocytów Treg pomoże przybliżyć zastosowanie tych komórek jako realnej alternatywy dla obecnie powszechnie stosowanej immunosupresji farmakologicznej. Należy podkreślić, iż oprócz tolerancji centralnej i aktywności regulatorowej limfocytów Treg, opisano szereg innych mechanizmów odpowiedzialnych za stan tolerancji obwodowej, m. in.: ignorancję, anergie apoptozę i wyczerpanie (14). Wszystkie te mechanizmy mają swój udział w ochronie niezgodnego przeszczepu przed odrzucaniem. Zadaniem prezentowanych w niniejszej pracy modeli było ograniczenie do minimum wpływu wspomnianych mechanizmów na końcowy wynik przeszczepu i wyeksponowanie znaczenia tolerancji centralnej oraz immunoregulacji.

Założeniem projektu było rozwinięcie mysiego modelu aloprzeszczepu skóry opracowanego przez zespół Medawar'a (3) w kierunku wykorzystania naturalnych mechanizmów służących utrzymaniu homeostazy immunologicznej i tolerancji na autoantygeny, które hamują odrzucenie przeszczepu lub przedłużają jego żywotność. Zgodnie z modelem Medawar'a ekspozycja na antygeny dawcy w okresie płodowym zapewnia przyjęcie przeszczepu przez osobnika dojrzałego. Bazując na tym założeniu dokonaliśmy modyfikacji modelu przesuując granicę indukcji tolerancji immunologicznej. Iniekcji splenocytów wyizolowanych z tkanek dawcy pierwotnego poddaliśmy mysie oseski biorcy pierwotnego w pierwszej dobie po urodzeniu. Na podstawie uzyskanych w tym modelu wyników można wnioskować, iż ingerencja w mechanizmy tolerancji centralnej jest skuteczna jedynie w okresie płodowym. Przesunięcie tej granicy na czas bezpośrednio po urodzeniu i iniekcja niezgodnych limfocytów w pierwszej dobie życia, tak jak w naszym modelu, znacznie osłabia efekt tolerancji. Odpowiednio wczesna ekspozycja biorcy na komórki dawcy wydaje się więc mieć tu kluczowe znaczenie. Zgodnie z założeniami modelu wyjściowego indukcja tolerancji immunologicznej po urodzeniu okazała się niemożliwa do odtworzenia.

Alogeniczny przeszczep skóry poprzedzony iniekcją splenocytów dawcy BALB/c u biorcy C57BL/6 w okresie noworodkowym, niezależnie od zastosowanej dawki wszczepionych komórek jak i wieku zwierząt, u których dokonano przeszczepienia skóry zakończył się odrzutem we wszystkich przypadkach. Tym samym nie doprowadzono do indukcji tolerancji immunologicznej. Podobnie miało to miejsce w modelu gdzie jako dawców splenocytów wykorzystano hybrydy F1 szczepów C57BL/6 i BALB/c . Zaobserwowana przez zespół Medawar'a nabyta drogą eksperymentalną tolerancja możliwa jest jedynie w okresie prenatalnym.

Tolerancja centralna to złożony proces, w efekcie którego wyeliminowane zostają limfocyty T i B o wysokim powinowactwie do własnych antygenów. Ma to miejsce w grasicy (limfocyty T) i w szpiku kostnym (limfocyty B). Tymocyty o wysokim powinowactwie do autoantygenów są usuwane w tym narządzie w procesie selekcji negatywnej. Ponadto grasica jest źródłem limfocytów Treg (CD3+CD4+CD25^{high}FoxP3+), wykazujących tolerancję wobec autoantygenów, a w pewnych warunkach, gdy krążą już na obwodzie, także aloantygenów. Limfocyty Treg pochodzące z grasicy rozpoznają wprawdzie własne antygeny, ale charakteryzują się ograniczonym potencjałem proliferacyjnym, szerokim repertuarem mechanizmów immunosupresyjnych i dużą zdolnością do recyrkulacji, dzięki czemu działając w obwodowych narządach limfatycznych uzupełniają tam proces selekcji pozytywnej i negatywnej. Rozpoznając autoantygeny w tkankach nie tylko nie doprowadzają do rozpoczęcia odpowiedzi immunologicznej ale hamują już toczący się proces zapalny poprzez bezpośrednią supresję na drodze oddziaływań ligand-receptor z innymi komórkami układu odpornościowego. Tworzą w ten sposób mechanizm wzmacniający tolerancję immunologiczną wśród limfocytów, które są immunokompetentne i nabyły już zdolność rozpoznawania antygeny. Obecnie wiadomo, że są to tzw. naturalne limfocyty Treg (80). Efekt indukcji tolerancji centralnej uzyskany poprzez infuzję niezgodnych komórek jako źródła antygenów w okresie płodowym lub noworodkowym może być wzmacniany przez produkowane w odpowiedzi na te antygeny limfocyty Treg. Niemniej jednak oba te mechanizmy: **tolerancja centralna** oraz **immunoregulacja** poprzez limfocyty Treg nakładają się jedynie częściowo. W przypadku tolerancji centralnej proces kończy się na apoptozie potencjalnie autoreaktywnych komórek w grasicy lub szpiku kostnym. W przypadku

immunoregulacji zasadnicze znaczenie ma interakcja między krążącymi dojrzałymi limfocytami T efektorowymi (Tconv) a właśnie limfocytami Treg. Limfocyty Treg wywierają hamujący wpływ na limfocyty Tconv, szczególnie poprzez ograniczanie proliferacji tych komórek oraz hamowanie ich aktywacji, produkcję cytokin i innych mediatorów zapalenia. (75). Badania sugerują też, że istotne znaczenie dla zahamowania zapalenia i trwałego przyjęcia przeszczepu ma korzystny stosunek limfocytów Treg do limfocytów efektorowych, a nie tylko rzeczywisty wzrost liczby limfocytów Treg (7). Oprócz limfocytów Tconv, celem dla limfocytów Treg są także komórki NK, komórki dendrytyczne, limfocyty B i granulocyty (75). We wszystkich tych subpopulacjach limfocyty Treg są w stanie zahamować funkcje efektorowe, hamując tym samym zapalenie.

Badania dowiodły, iż komórki o potencjale regulatorowym mogą powstawać również poza grasicą (58, 63, 73, 93, 106). Obok naturalnych (albo inaczej grasiczych) limfocytów Treg (nTreg lub tTreg) ważną rolę w procesie podtrzymywania stanu tolerancji na aloantygeny dawców w przeszczepach odgrywają również tzw. indukowane albo obwodowe limfocyty Treg (pTreg). Jest to pula komórek T CD4+ przekształcająca się z dojrzałych limfocytów T w trakcie odpowiedzi immunologicznej przy współpracy z komórkami prezentującymi antygen (ang. antigen presenting cells – APC) w obwodowych narządach limfatycznych (41). Do indukowanych limfocytów pTreg wykazujących zmienną ekspresję CD25 i Foxp3, zaliczamy m. in. populację limfocytów regulatorowych typu 1 (ang. type 1 regulatory T cells – Tr1) oraz limfocyty T pomocnicze typu Th3 (ang. T helper-3 cells – Th3) (28). Istotną cechą tych komórek jest ich swoistość do antygeny, który je wyindukował. W przypadku limfocytów nTreg generowanych w grasicy nie jest to takie oczywiste, ponieważ rozpoznawane przez nie antygeny to głównie autoantygeny, które doprowadziły do ich selekcji w grasicy poprzez stymulację ich receptorów TCR (6, 23, 41, 88). Generowanie limfocytów pTreg na obwodzie wydaje się niezwykle istotne ze względu na związaną z wiekiem involucję grasicy i wynikające z tego faktu znaczne uszczuplenie puli limfocytów nTreg powstających w tym narządzie. Przypuszcza się, że obwodowe limfocyty pTreg uczestniczą we wzmacnianiu stanu tolerancji poprzez konkurowanie o miejsca prezentacji antygeny (69). Zarówno naturalne limfocyty nTreg jak i indukowane na obwodzie pTreg zapobiegają migracji komórek efektorowych oraz hamują ich

kooperację z komórkami prezentującymi antygen (76). Znaczenie indukowanych limfocytów pTreg podkreśla też fakt, że protekcyjne działanie tych komórek może mieć miejsce nawet bez obecności naturalnych limfocytów nTreg z grasicy (21).

Opisując fazę efektorową odrzucania po przeszczepie w układzie dawca-biorca, należy wskazać na kluczową dla tego procesu rolę limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺ Tconv. Zarówno limfocyty nTreg, jak i antygenowo indukowane limfocyty pTreg są w stanie zahamować reakcję odrzucenia przeszczepu poprzez supresję limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺ Tconv. Indukowane limfocyty pTreg hamują limfocyty T CD8⁺ i CD4⁺ Tconv w tkankach nielimfatycznych i we wtórnych narządach limfatycznych, proporcjonalnie do ich ilości i czasu w jakim napłynęły do tkanki objętej zapaleniem (17). Sukces przyjęcia przeszczepu zależy więc w dużej mierze od zachowania równowagi pomiędzy komórkami chroniącymi i odrzucającymi przeszczep.

W części doświadczalnej z wykorzystaniem hybryd F1 szczepów C57BL/6 i BALB/c (B6CF1) jako dawców splenocytów, wstrzykiwanych późniejszym biorcom przeszczepów udało się zaobserwować statystycznie nieistotną dłuższą żywotność przeszczepów od myszy BALB/c. Użycie hybryd B6CF1 miało na celu zmniejszenie poziomu dyskryminacji niezgodności MHC. Kontynuując pracę w tym modelu z puli splenocytów pozyskanych od hybryd B6CF1 izolowano limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺ oraz Tconv CD4⁺CD25⁻. Tak separowane komórki zostały następnie podane oseskom C57BL/6 (biorcy pierwotnemu). Założono, że wstrzyknięte limfocyty Treg będące nośnikami tolerancji wobec obcych antygenów są zdolne przeżyć w organizmie biorcy oraz wpłynąć na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty Treg pochodzące od mieszańców powinny być supresyjne, bo podczas selekcji rozpoznawały już antygeny BALB/c. Z drugiej strony, pozyskiwane od mieszańców limfocyty Tconv nie powinny zawierać komórek uczulonych przeciw BALB/c. Zastosowanie izolowanych populacji pozwoliło nie tylko ograniczyć odpowiedź do konkretnych antygenów, ale także istotnie zmienić proporcję limfocytów Treg do Tconv. Jako że naturalnie występujące limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺ biorą udział w utrzymaniu tolerancji na własne antygeny, spodziewano się efektu aktywniej regulacji odpowiedzi immunologicznej u osobnika dorosłego wobec antygenów przeszczepu od BALB/c. Badania potwierdzają, że zarówno naturalne limfocyty nTreg jak i indukowane na obwodzie pTreg zapobiegają migracji komórek efektorowych oraz

hamują ich kooperację z komórkami prezentującymi antygen (107). W modelach zwierzęcych wykazano, iż transfer hematopoetycznych komórek macierzystych szpiku kostnego u myszy wraz z podaniem komórek Treg powoduje spadek częstości wystąpienia GvHD, przy zachowanej odpowiedzi przeszczep przeciwko białaczce (62). Co więcej, wyniki badań klinicznych z zastosowaniem ludzkich limfocytów Treg w leczeniu GvHD w przeszczepach hematopoetycznych komórek macierzystych dają nadzieję na wykorzystanie limfocytów Treg jako skutecznego narzędzia w transplantologii narządowej (35, 59).

Otrzymane w projekcie wyniki pozwoliły zauważyć, że myszy C57BL/6, które jako oseski otrzymały iniekcję limfocytów Treg pochodzących od mieszańców B6CF1 istotnie dłużej utrzymywały przeszczep skóry od dawcy BALB/c w porównaniu do osobników, które były indukowane niesortowanymi splenocytami mieszańców albo otrzymały przeszczep od dawcy DBA/2. Co ciekawe, analiza uzyskanych wyników wykazała również, że myszy C57BL/6, które jako oseski otrzymały iniekcję limfocytów Tconv od mieszańców B6CF1 odrzucały przeszczep od BALB/c istotnie szybciej w porównaniu z osobnikami, które były indukowane niesortowanymi splenocytami hybryd i otrzymały przeszczep od dawcy DBA/2. Świadczyłoby to o możliwym uczuleniu na antygeny BALB/c pomimo transferu limfocytów Tconv pochodzących od B6CF1. O specyficzności odpowiedzi świadczyłoby też fakt, iż limfocyty Treg mieszańców nie chroniły przed odrzutem przeszczepu od dawcy DBA/2.

Analiza wyników przeszczepu skóry w modelu z wykorzystaniem myszy NIH III zasiedlanych układem odpornościowym myszy C57BL/6 (splenocytami, lub wybranymi frakcjami komórek Tconv, Treg), indukowanych splenocytami BALB/c w pierwszej dobie życia wykazała istotnie najdłuższe prawdopodobieństwo przeżycia przeszczepu od BALB/c u zwierząt zasiedlonych limfocytami Treg. W tym modelu zaobserwowano również protekcyjną rolę Treg dla przeszczepów skóry od DBA/2. Wyniki uzyskane u myszy NIH III z przeszczepem od BALB/c zasiedlonych całymi splenocytami okazały się nieco gorsze. Na podstawie tych obserwacji można wnioskować, że efekt tolerancji centralnej i immunoregulacja poprzez limfocyty T regulatorowe mogą działać synergistycznie. Limfocyty Treg zdecydowanie zwiększają szansę na akceptację przeszczepionej tkanki w porównaniu z populacją przetransferowanych splenocytów, które zapewne przeszły selekcję w grasicy. Natomiast proporcja limfocytów Treg była

w tej mieszance bardzo niska. Stąd, końcowy rezultat działania obu mechanizmów w zaprezentowanych modelach doświadczalnych zależy od wzajemnej proporcji konwencjonalnych limfocytów T i limfocytów Treg. Im więcej tych ostatnich, tym większa szansa akceptacji alop przeszczepu, a zatem indukcja tolerancji poprzez limfocyty Treg wymaga zastosowania znacznej ilości tych komórek w stosunku do limfocytów Tconv.

Limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺ (Treg) pomimo iż stanowią mniej niż 1% leukocytów krwi obwodowej, odgrywają kluczowe znaczenie w procesie regulacji odpowiedzi immunologicznej. Od dekady trwają próby manipulacji tymi komórkami w terapii licznych chorób, których podstawą są zaburzenia układu immunologicznego (25). Wczesne badania na myszach po przeszczepie szpiku kostnego wykazały skuteczność limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ w zapobieganiu powstawania choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) (16, 33, 99). Podobne doświadczenia przeprowadzono też w modelach chorób autoimmunologicznych i przeszczepach narządowych (82). Co więcej, w badaniach klinicznych, ich stosowanie w terapiach komórkowych u ludzi stało się faktem. Limfocyty Treg znalazły już zastosowanie, między innymi, w terapii cukrzycy typu I (24, 50-52) czy przeszczepach szpiku kostnego (66, 87, 97). Jak już wspomniano akceptacja i przeciwdziałanie odrzuceniu przeszczepionych tkanek zależy od równowagi między limfocytami T efektorowymi a limfocytami T regulatorowymi, a kluczową rolę w procesie indukcji stanu tolerancji immunologicznej odgrywają właśnie limfocyty Treg (84). Zdolność tych komórek do hamowania odpowiedzi limfocytów efektorowych CD4⁺ i CD8⁺ stwarza realną szansę na wykorzystanie ich w terapii immunosupresyjnej osób po przeszczepach alogenicznych (46, 101).

W poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie, które konkretnie mechanizmy: obwodowe czy centralne odgrywają nadrzędną rolę w procesie indukcji oraz podtrzymania stanu tolerancji, musimy się cofnąć i dokładnie przeanalizować doświadczenia Medawar'a. Badania Billingham'a, Brent'a, i Medawar'a opublikowane w *Nature* w 1953 roku inspirowane były pracą Raya Owena, który jako pierwszy zaobserwował fenomen tolerancji immunologicznej *in vivo* (110). W swoich doświadczeniach na cielętach zaobserwował on koegzystencję dwóch typów erytrocytów we krwi bliźniąt dwujajowych i założył, że jeszcze w łonie matki musiało dojść do wymiany tych

komórek między płodami, a komórki zdołały przeżyć nie prowokując odpowiedzi immunologicznej (60). Obserwacje te posłużyły do sformułowania hipotezy o prewencyjnej roli ekspozycji na obcy antygen we wczesnym dzieciństwie, którą Burnet i Fenner opublikowali w 1949 roku w swojej pracy "The production of Antibodies" (10).

Billingham i Medawar, którzy w tym samym czasie, zupełnie niezależnie prowadzili eksperymenty z przeszczepami skóry u bydła, nieoczekiwanie odkryli, że przeszczepy skóry między bliźniętami kończyły się sukcesem. Zebranie wszystkich tych obserwacji pozwoliło Medawar'owi założyć, że jeżeli hipoteza Burnet'a i Fenner'a, opisująca obserwacje Owena jest słuszna możliwe powinno być również wzbudzenie tolerancji immunologicznej poprzez wprowadzenie obcych antygenów do dojrzałego układu immunologicznego. Zespół Medawar'a postawił sobie za cel stworzenie modelu eksperymentalnego, który dowiedzie słuszności stwierdzenia, że stan tolerancji immunologicznej można indukować *in vivo*. Założyli, że mysz pład jednego szczepu wsobnego poddany dootrzewnowej infuzji w łonie matki zawiesiną żywych komórek innego szczepu wsobnego, dojrzewając rozwinię całą lub częściową tolerancję na przeszczep skóry od pierwotnego dawcy komórek. Innymi słowy, że uda się indukować zjawisko tolerancji immunologicznej, której naturalny mechanizm zaobserwowali w przypadku bliźniąt bydlęcych. W swoim modelu eksperymentalnym jako biorców wykorzystali myszy szczepu CBA, natomiast możliwie odległy genetycznie szczep A stanowił dawców komórek i przeszczepianych fragmentów skóry. Zgodnie z oczekiwaniami, dorosłe myszy CBA, które nie były stymulowane w okresie płodowym komórkami szczepu A, odrzucały przeszczepy skóry w ciągu 11 dni od dnia zabiegu. W przypadku przeprowadzenia kolejnego przeszczepu, niezależnie od dnia jego wykonania, ale maksymalnie w ciągu 60 dni od pierwszego, reakcja odrzucenia była znacznie szybsza i obserwowano ją do 6 dni od zabiegu jako, że zwierzę było już uwrażliwione na obce antygeny szczepu A. Taką przyspieszoną odpowiedź immunologiczną można było indukować w wyniku implantacji fragmentów gruczołów limfatycznych szczepu dawcy do otrzewnej dorosłego osobnika myszy biorcy, co sugerowało, że to właśnie limfocyty odpowiedzialne są za aktywną immunizację przeciwko obcym antygenom szczepu A. Następnym etapem doświadczenia była stymulacja płodów żywymi komórkami późniejszego dawcy przeszczepu. W 15 lub 16

dniu ciąży każdy z 6 płodów szczepu CBA indukowano dojrzałymi komórkami szczepu A (dootrzewnowe podanie zawiesiny komórek). Spośród 6, urodziło się 5 myszy, którym w 8 tygodniu życia wykonano przeszczep skóry od dawcy szczepu A. Fragmenty skóry uznano za przyjęte u 3 z 5 myszy z czego 2 utrzymały się przez dłuższy czas (z ang. long-term transplant). Pozostałe dwie myszy odrzuciły przeszczepy. Kontrolę stanowiły przeszczepy od myszy AU, zawsze kończące się odrzuceniem przez myszy mające kontakt z antygenami szczepu A w okresie płodowym.

Indukcja tolerancji w oparciu o opracowany model okazała się być procesem specyficznym, w którym kluczową rolę odgrywa układ zgodności tkankowej. Jak zauważyli Billingham, Brent i Medawar opisana przez nich strategia indukowania tolerancji dawała efekt immunologicznie specyficzny w odniesieniu do alogenicznych antygenów MHC. Wykazali oni również, że podstawowym gwarantem sukcesu w procedurze transplantacyjnej był właściwy czas wprowadzenia obcych komórek do ciągle jeszcze rozwijającego się układu odpornościowego. Zaobserwowano również obniżenie lub zahamowanie efektywności procedury w przypadku wszczepienia komórek w okresie postnatalnym (83, 110). Fakt ten potwierdzają również wyniki doświadczeń przeprowadzonych w ramach niniejszego projektu.

W 1960 roku Peter Medawar otrzymał razem z Frankiem Burnetem Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w uznaniu za wkład jaki jego prace z 1953 i 1956 roku odegrały w odkryciu nabytej tolerancji immunologicznej (71). Wnioski płynące z badań Medawar'a i wsp. (3, 4) do dziś stanowią podwaliny współczesnej transplantologii. W 1953 roku, tym samym, w którym Medawar opublikował swoją przełomową pracę, immunolog Milan Hasek przedstawił wyniki swoich badań nad parabiontami kurzych embrionów (30). Jemu również udało się indukować tolerancję immunologiczną ale z powodu błędnej interpretacji swoich wyników został pominięty jako odkrywca (83). Być może stało się tak również dlatego, iż pochodził z niewłaściwej strony „żelaznej kurtyny”.

Otrzymane przez nas wyniki sugerują, że tolerancja centralna ma nadrzędne znaczenie w uzyskaniu tolerancji immunologicznej. Niemniej jednak, wzmocnienie tego

mechanizmu przy pomocy limfocytów Treg może znacząco zwiększyć skuteczność tego procesu.

W tolerancji centralnej zasadniczym mechanizmem w odniesieniu do limfocytów T jest apoptoza, zaś w przypadku limfocytów B – redagowanie receptora BCR (ang. B-cell receptor) (91). Największy wpływ na selekcję tymocytów, z których różnicują się limfocyty nTreg, ma awidność receptorów TCR do własnych białek. Jeżeli jest ona zbyt duża tymocyt ulega apoptozie lub przechodzi próbę ponownej rearanżacji genów kodujących TCR, czyli podlega redagowaniu receptora. W ten sposób tolerancja centralna w odniesieniu do limfocytów T polega głównie na eliminacji potencjalnie autoreaktywnych komórek. Jest to proces niezwykle restrykcyjny, Uważa się, że dojrzewanie przeżywa mniej niż 5% początkowej puli tymocytów. Widać to wyraźnie w histologii grasicy, w której gęsto upakowana wczesnymi komórkami kora wyraźnie kontrastuje z ubogokomórkowym rdzeniem, do którego docierają nieliczne dojrzałe limfocyty T po selekcji. Jeśli na tym etapie uda się „prześlizgnąć” autoreaktywnym limfocytom Tconv i przejdą one do tkanek obwodowych to konsekwencją są choroby autoimmunologiczne. Zasadniczym zabezpieczeniem przed takim problemem są rozpoznające własne antygeny limfocyty Treg, które także opuszczają grasicę. Ich supresyjne działanie po napotkaniu własnych antygenów na obwodzie może skorygować zapalenie wywołane przez autoreaktywne limfocyty T. Podobne efekty mogą dotyczyć także reakcji na przeszczep, jako że około 10% limfocytów, zarówno w puli regulatorowej, jak i konwencjonalnej posiada receptory TCR o pewnym powinowactwie do aloantygenów. Wynika to z ogólnej budowy tych receptorów. Receptory TCR tymocytów są predysponowane do rozpoznawania struktury receptorów HLA, także obcych. Na wczesnym etapie dojrzewania w trakcie selekcji pozytywnej kontakt TCR z HLA warunkuje możliwość przeżycia tymocytów (105). Limfocyty, których TCR mają pewne powinowactwo do obcego HLA to tzw. prekursorzy odpowiedzi na aloantygeny. W sytuacji dokonania niezgodnego przeszczepu jest on rozpoznawany przez alogeniczne prekursorzy Tconv, które rozpoczynają jego odrzucanie. Z drugiej strony odpowiednio szybkie i silne działanie alogenicznych prekursorów Treg może zatrzymać ten proces i wywołać akceptację przeszczepionej niezgodnej tkanki (108).

Limfocyty B w szpiku kostnym podlegają podobnym procesom selekcji negatywnej, w wyniku której eliminowane są komórki o wysokiej awidności receptora BCR do antygenów własnych. Komórki podlegają apoptozie lub anergii. Podobnie jak w przypadku TCR tu również może dojść do ponownej rekombinacji genów immunoglobulinowych – redagowania receptora. Niedojrzałe limfocyty B z nowym łańcuchem receptorów IgM i IgD wędrują na obwód. Ze względu na specyfikę aktywacji limfocytów B proces ten nie jest jednak tak precyzyjny jak w grasicy. Limfocyty B są bowiem funkcjonalnie zależne od współpracujących z nimi limfocytów Th. Dawniej uważano, że wykazujące słabą autoreaktywność limfocyty B nie stanowią zagrożenia w kontekście rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Okazuje się jednak, że wspomagane przez limfocyty Th stanowią potencjalne niebezpieczeństwo (20). Może się tak dzieć w przypadku kiedy autoantygeny są prezentowane w tym samym czasie i miejscu z aloantygenami i limfocyty T pomocnicze są pierwotnie aktywowane przez aloantygeny. W takiej sytuacji na zasadzie stymulacji krzyżowej (tzw. bystander stimulation) limfocyt T może doprowadzić także do indukcji autoreaktywnych limfocytów B i dalej plazmacytów, a w konsekwencji do produkcji autoprzeciwciał (67). Mechanizmem zabezpieczającym jest tu prawdopodobnie interakcja limfocytu B z limfocytami Treg. Dziewicze limfocyty B prezentują antygeny własne limfocytom Treg, które swoiście je hamują (32). Co ciekawe, wiadomo też, że populacja limfocytów B pamięci (tzw. class switched memory B cells) wykazuje pewien stopień autoreaktywności *de novo*, z czego można wnioskować, iż przełamanie mechanizmów tolerancji może mieć miejsce nawet tak późno jak podczas dojrzewania limfocytów B w grudkach chłonnych (98).

W odniesieniu do naszych modeli, widoczna jest istotna rola tolerancji centralnej. W modelu z wykorzystaniem mieszkańców B6CF1 nie udało się uzyskać ciągłej tolerancji ani po doszczepieniu pełnych splenocytów, ani limfocytów T CD4+CD25-, a to z powodu istniejących u C57BL/6 dojrzałych alogenicznych prekursorów limfocytów Tconv, które szybko uczuły się na antygeny przeszczepu. W takiej sytuacji ośleski toleryzowane limfocytami Tconv CD4+CD25- niezależnie od otrzymanego przeszczepu odrzucały bardzo szybko. Dopiero podanie limfocytów Treg B6CF1 prowadziło do przedłużenia żywotności przeszczepu od BALB/c i był to efekt antygenowo-specyficzny, jako że myszy C57BL/6 toleryzowane limfocytami Treg

B6CF1, które otrzymały przeszczep od dawcy DBA/2 odrzucały go równie szybko co myszy toleryzowane limfocytami Tconv CD4+CD25-. Sukces przeszczepu korelował też z mierzonym cytometrycznie odsetkiem limfocytów Treg FoxP3+. Powyższe wyniki sugerują, iż akceptacja przeszczepu ściśle koreluje z poziomem limfocytów Treg, który jednak w tym modelu mimo wszystko nie był wystarczająco wysoki aby wywołać trwały stan tolerancji. Być może należałoby rozważyć inną, wyższą dawkę podawanych komórek. Znaczącą rolę mogą w tym przypadku odgrywać także, wspomniane na początku dyskusji, inne mechanizmy indukcji tolerancji, np. produkujące aloprzeciwciała limfocyty B, bądź inne mechanizmy zapalne.

Zależności te były jeszcze lepiej widoczne w dalszej części projektu, w której wykorzystano model przeszczepu skóry na myszach szczepu NIH III, pozbawionych własnego układu immunologicznego (rag^{-/-}). Jako, że zwierzęta te pozbawione są grasicy i nie wykazują limfopoetyzy szpikowej, a w związku z tym, nie posiadają limfocytów T, B i NK, pozwoliło to na zbadanie możliwości tworzenia tolerogennych limfocytów Treg bez udziału tolerancji centralnej, a jedynie przy udziale mechanizmów obwodowych. Analiza wyników przeszczepu skóry u myszy NIH III zasiedlanych układem odpornościowym myszy C57BL/6 (splenocytami lub wybranymi frakcjami limfocytów takimi jak Tconv, Treg), indukowanych splenocytami BALB/c w pierwszej dobie życia, wykazała istotnie najdłuższe prawdopodobieństwo przeżycia przeszczepu od BALB/c dla zwierząt zasiedlonych limfocytami Treg. We wszystkich grupach myszy NIH III, które w sposób długotrwały akceptowały przeszczepy zaobserwowano wyższe odsetki limfocytów Tregs FoxP3+ w porównaniu do grup, które przeszczep odrzucały.

Jednocześnie nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic między grupami w zakresie subpopulacji limfocytów Treg, tak jak to było w przypadku modelu z wykorzystaniem myszy C57BL/6. Może mieć to związek z proliferacją homeostatyczną indukowaną naturalną limfopenią u myszy NIH III. W takiej sytuacji przeszczepione limfocyty szybko proliferują i przyjmują fenotyp komórek pamięci pomimo braku stymulacji antygenowej. W izolowanym modelu NIH III szczególnie intensywnie fenotyp zmieniały limfocyty Tconv – we wszystkich grupach powyżej 80% komórek Tconv należało do przedziału efektorowego/memory-like CD62L-CD45RA-. Z tego powodu, w obrębie populacji limfocytów, w tym modelu nie znaleziono różnic między grupami. Najprawdopodobniej, po podaniu splenocytów lub sortowanych limfocytów zwierzętom

limfopenicznym NIH III, doszło do kompensacyjnej proliferacji wszystkich komórek, które przyjęły fenotyp limfocytów pamięci, pomimo braku bodźców antygenowych (68).

Należy jednak bliżej przyjrzeć się zmianom jakościowym limfocytów w modelu myszy C57BL/6, który oferuje analizę w pełni immunokompetentnego układu odpornościowego. W modelu tym na uwagę zasługuje korelacja między przeżyciem przeszczepu a wysokim odsetkiem limfocytów Treg CD62L⁺. Zależna od limfocytów T swoista odpowiedź nabyta (adaptacyjna) przebiega od fazy rozpoznania antygeny, przez aktywację, proliferację w układzie chłonnym, a następnie migrację do tkanek obwodowych, gdzie limfocyty T zwykle ponownie napotykają na swoiste antygeny prezentowane przez komórki APC i podlegają ponownemu wzbudzeniu - restymulacji i proliferacji. Możliwość migracji między układem chłonnym a tkankami zapewnia właśnie ekspresja receptora CD62L. Aktywowane limfocyty T CD4⁺ wykazują zróżnicowane fenotypy czynnościowe głównie w zakresie efektorowym/konwencjonalnym Tconv (Th1, Th2, Th17) oraz jako limfocyty pTreg. Szczególne znaczenie w tym procesie przypisuje się naturalnym limfocytom T regulatorowym nTreg, które regulują intensywność reakcji zapalnej i odpornościowej pozostałych populacji (68). Obecność wysokiej ekspresji CD62L na limfocytach Treg zapewnia im możliwość szybkiej migracji do miejsc zapalenia i precyzyjną regulację procesu jeszcze przed masywnym naciekiem z komórek efektorowych.

Z drugiej strony, w naszych doświadczeniach, wykładnikiem długiego przeżycia przeszczepu był także wysoki odsetek naiwnych limfocytów Tconv, co dobrze opisuje tolerancję centralną. Wydaje się, że wysoki odsetek naiwnych limfocytów Tconv u pacjentów z długim przeżyciem przeszczepu, świadczy o tym, iż obecne na obwodzie limfocyty nie mają powinowactwa do antygenów przeszczepu i dlatego nie różnicują się. Limfocyty, których TCR miały powinowactwo do tych antygenów zostały wyeliminowane w procesie selekcji centralnej i dlatego nie doszło do ich aktywacji. Brak limfocytów z ekspresją TCR dla testowanych haplotypów HLA ma zapewne związek z prezentacją aloantygenów komórek wstrzykniętych oseskom. Krążą one po organizmie biorcy, ale szczególne miejsce, do którego trafiają to grasica. Zaprezentowane tam antygeny tych komórek traktowane są jak autoantygeny, a co za tym idzie selekcja centralna wymusza deplecję rozpoznających je klonów gospodarza.

Klony wychodzące z grasicy nie są więc reaktywne wobec wstrzykniętych antygenów i pozostają naiwne. Aby uzmysłwić sobie jak bardzo ten mechanizm chroni przed odrzucaniem wystarczy przypomnieć charakterystykę limfocytów pamięci. W pierwszej fazie odpowiedzi immunologicznej – ekspansji, limfocyty gwałtownie proliferują. Natomiast po jej zakończeniu, w fazie kontrakcji, drastycznie zmniejszają swoją liczbę na skutek nasilonej apoptozy. Dzieje się tak w przypadku 90 % limfocytów Tconv (45). Pozostałe przy życiu limfocyty różnicują się w populację limfocytów T pamięci (53). Redukcja puli limfocytów T umożliwia odbudowę równowagi homeostatycznej układu odpornościowego, ograniczając zbędne koszty metaboliczne i zapobiegając autoimmunizacji (68). Jednak przeżywające limfocyty T pamięci charakteryzuje niższy próg aktywacji i wysoki potencjał proliferacyjny w porównaniu z limfocytami T dziewiczymi (44). Dzięki temu ponowna stymulacja rozpoznawanym antygenem doprowadza do bardzo szybkiej i nasilonej odpowiedzi odpornościowej. Limfocyty pamięci T są zabezpieczone przed apoptozą mechanizmem powtarzalnej aktywacji i mogą przetrwać przez wiele lat, nawet pozbawione swoistej stymulacji antygenowej, aby gwałtownie zareagować przy ponownym kontakcie z antygenem. Nie ma więc wątpliwości, że eliminacja potencjalnego zagrożenia w trakcie selekcji centralnej jest mechanizmem niezwykle istotnym dla ochrony przeszczepionego narządu.

W obliczu nieustannych poszukiwań efektywnych metod leczenia immunosupresyjnego po przeszczepie wiele uwagi poświęca się zrozumieniu mechanizmów tolerancji immunologicznej w celu manipulowania tym zjawiskiem. Jednym z celów jest wykorzystanie limfocytów Treg jako potencjalnych leków komórkowych mogących zastąpić powszechnie stosowaną immunosupresję. Analiza właściwości tolerogennych limfocytów T regulatorowych dowodzi jednoznacznie, że obecność Treg ściśle koreluje ze zmniejszeniem ryzyka odrzutu alop przeszczepów w modelu zwierzęcym. Powstawanie limfocytów Treg nie zostało dokładnie wyjaśnione, ale to, że spełniają szczególne funkcje w organizmie pozostaje bezdyskusyjne. Limfocyty Treg są w stanie przeciwdziałać reakcji odrzucania przeszczepu, czyli wywoływać tolerancję transplantacyjną. Prowadzenie dalszych badań nad tym zagadnieniem może wpłynąć na lepsze zrozumienie mechanizmów działania i wykorzystanie limfocytów Treg w zapobieganiu reakcjom odrzucania przeszczepu. Najnowsze badania nad szeroko rozumianym immunometabolizmem podkreślają znaczenie manipulacji mechanizmami

regulacji immunologicznej, w celu wykorzystania właściwości limfocytów Treg w długoterminowej tolerancji na przeszczep (95). Jednym z kluczowych wyzwań jest znalezienie właściwej drogi dla uzyskania funkcjonalnie stabilnej linii limfocytów Treg, bez zanieczyszczeń komórkami efektorowymi (94).

7. Streszczenie

Tolerancja immunologiczna, czyli wyselekcjonowany brak odpowiedzi organizmu na określone antygeny, sprawia, iż układ odpornościowy nie rozwija odpowiedzi immunologicznej na dany antygen przy zachowaniu prawidłowej odpowiedzi na inne antygeny, co ma duże znaczenie w przeszczepach tkankowych. Na całym świecie, od lat, prowadzi się badania nad możliwością modyfikowania aktywności układu immunologicznego w celu wyeliminowania szkodliwej immunosupresji przy jednoczesnym trwałym przyjęciu przeszczepu.

Podwaliny dla współczesnej transplantologii stworzył w 1953 roku zespół Medawar'a, który wykazał możliwość wywołania stanu tolerancji na obcą tkankę w mysim modelu przeszczepu skóry. W niniejszym projekcie rozwinięto i zmodyfikowano model przeszczepu zaproponowany przez Medawar'a w celu określenia roli komórek Treg oraz ich udziału w mechanizmach tolerancji centralnej i obwodowej.

W projekcie wykorzystano używany przez Medawar'a sposób wywoływania tolerancji na aloantygeny poprzez podawanie alogenicznych splenocytów myszy szczepu BALB/c oseskom myszy szczepu C57BL/6. Następnie użyto modelu niezgodnego przeszczepu skóry od myszy BALB/c do uprzednio toleryzowanych dorosłych myszy C57BL/6 w celu określenia w tym zjawisku roli limfocytów T regulatorowych CD4⁺FoxP3⁺ (Treg). Aby znieść efekt tolerancji centralnej powtórzono te doświadczenia w modelu przeszczepu skóry od myszy BALB/c do pozbawionych układu odpornościowego bezgranicznych myszy NIH III, które zasiedlono przed przeszczepem subpopulacjami limfocytów Treg CD4⁺FoxP3⁺ lub limfocytów T efektorowych CD4⁺FoxP3⁻ pochodzącymi od toleryzowanych myszy C57BL/6. We wszystkich doświadczeniach wykorzystano kontrolę negatywną (odrzućcia) przy użyciu przeszczepów od myszy DBA/2, a kontrolę dodatnią (tolerancji) stanowiły przeszczepy syngeniczne od myszy C57BL/6.

W pracy wykazano, iż indukcja tolerancji alogenicznymi komórkami u osesków nawet kilka godzin po porodzie nie jest w stanie wywołać w późniejszej ontogenezie obserwowanej przez Medawar'a tolerancji (w oryginalnym modelu komórki podawane płodom) na przeszczepioną niezgodną skórę. Niemniej jednak, użycie w indukcji

tolerancji subpopulacji limfocytów Treg CD4+FoxP3+ zamiast pełnej populacji splenocytów lub limfocytów T efektorowych, prowadzi do polepszenia żywotności przeszczepionej alogenicznej skóry. Efekt taki można uzyskać w szczególności poprzez użycie limfocytów Treg z ekspresją receptora CD62L.

Uzyskane wyniki dowodzą, iż wiodącą rolę w indukcji tolerancji odgrywa tolerancja centralna. Jest to bariera, która jest w pełni sprawna tuż po porodzie i nie pozwala na skuteczny przeszczep niezgodnej antygenowo tkanki. Niemniej jednak, immunoregulacja z limfocytami Treg na obwodzie daje szansę na osłabienie tego mechanizmu i rozwinięcie tolerancji na aloantygeny.

Abstract

Immune tolerance is defined as selected lack of response to some specific antigens without any immunosuppression given. It means that the immune system does not develop immune responses to a given antigen while maintaining the response to other antigens. The effect is important in tissue transplants. For years, research has been conducted on the possibility of modifying the activity of the immune system to eliminate harmful immunosuppression while permanently receiving a transplant.

The foundation of modern transplantology was the work by Medawar's group, who demonstrated the possibility of inducing a state of tolerance to allogeneic tissue in a mouse model of skin transplantation. Here, we have developed further this idea in order to address the question how interdependent is central tolerance and immunoregulation via CD4+FoxP3+ T regulatory cells (Treg).

We have used Medawar's approach of tolerance induction through injection of allogeneic BALB/c splenocytes to the C57BL/6 newborns. Then, allogeneic BALB/c skin fragments were transplanted to adult pretolerated C57BL/6 mice in order to assess the role of immunoregulation mediated by CD4+FoxP3+ T regulatory cells (Treg) in this process. In order to separate immunoregulation from central tolerance, we have used athymic NIH III mice adoptively transferred with either Treg cells or splenocytes or T effector cells from pretolerated C57BL/6 mice. NIH III mice were subsequently

transplanted with allogeneic BALB/c skin fragments. In all models the negative (rejection) control was performed with DBA/2 transplants and positive (tolerance) control was performed with syngeneic C57BL/6 transplants.

We have found that tolerance induction is impossible when the allogeneic tissue is administered postpartum, even few hours after the birth (original Medawar's model was performed with injection of allogeneic tissue to foetus). The allogeneic transplant given later through the life of tolerant adult animal is inevitably rejected. Nevertheless, the administration of CD4⁺FoxP3⁺ Treg cells, instead of splenocytes of T effector cells, to the newborns has improved survival of transplanted allogeneic skin. The efficacy of this effect correlated specifically with the percentage of transferred Treg cells expressing CD62L receptor.

These results proof pivotal role of central tolerance in tolerance induction. It is a principal barrier which is fully competent immediately after the birth and does not allow for the acceptance of transplanted allogeneic tissues. Nevertheless, immunoregulation with Treg cells can impair this barrier which subsequently allows for efficient tolerance induction of alloantigens.

8. Bibliografia

1. Bailey DW, Usama B. A rapid method of grafting skin on tails of mice. *Transplant Bull* 1960; 7:424-425.
2. Battaglia M, Roncarolo MG. Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006Sep; 5 (3): 157-165.
3. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953 Oct 3; 172 (4379): 603-606.
4. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 1956; 239: 357–414.
5. Billingham RE, Medawar PB. The technique of free skin grafting in mammals. *J Exp Biol* 1951; 28: 385.
6. Bluestone JA. Rregulatory t-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 343-349.
7. Boryczka K, Kuna P, Pietruczuk M. Regulatory lymphocytes in immune tolerance. *Journal of Laboratory Diagnostics*. 2010; 48(1): 71-76.
8. Boryczka K, Kuna P, Pietruczuk M. Rola czynnika transkrypcyjnego FOXP3 w rozwoju i funkcjonowaniu regulatorowych limfocytów T. *Diagnostyka Laboratoryjna* 2011; Volume 47, Number 3, 335-340.
9. Brook M, Wood KJ, Jones N. The impact of memory T cell on rejection and tolerance. *Transplantation*, 2006; 82: 1-9.
10. Burnet F, Fenner F. *The Production of Antibodies*. 1949. MacMillan, Melboure, Australia.
11. Bushell A, Morris P, Wood KJ. Transplantation tolerance induced by antigen pretreatment and depleting anti-CD4 antibody depends on CD4+ T cell regulation during the induction phase of the response. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 2643-2649.
12. Buskirk AM Van, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, Pelletier RP, Orosz CG. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J. Chin. Invest*. 2000 Jul; 106 (1): 145-155.

13. Canafax DM, Ascher NL Cyclosporine immunosuppression. *Clin. Pharm.* 1983; 2: 515–524.
14. Chan C, Lechler RI, George AJ. Tolerance mechanisms and recent progress. *Transplant. Proc.* 2004 Mar; 36 (2 Suppl): 561S-569S.
15. Chatenoud L. Natural and induced T CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Methods Mol Biol.* 2011; 677: 3-13.
16. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4+CD25 Immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 401–406.
17. Dai Z, Li Q, Wang Y, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress allograft rejection mediated by memory CD8+ T cells via a CD30-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2004; 2: 310-317.
18. Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Kuster JG, Metselaar HW, Tilanus HW, van der Laan LJ. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2006; 12: 277-284.
19. Diebold SS. Determination of T-cell fate by dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 2008 Jul; 86 (5): 389-397.
20. Ferrer IR, Hester J, Bushell A, Wood KJ. Induction of transplantation tolerance through regulatory cells: from mice to men. *Immunol Rev.* 2014 Mar; 258(1): 102-16.
21. Francis RS, Feng G, Tha-In T, Lyons I, Wood KJ, Bushell A. Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft protective regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2011; 41: 726-738.
22. Francis RS, Feng G, Tha-In T, Lyons IS, wood KJ, Bushell AR. Induction of transplantation Tolerance Converts Potential Effector T Cell into Graft-Protective Regulatory T Cell. *J Immunol* 2011; 41: 726-738.
23. Gavin M, Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15(6): 690-696.
24. Gitelman SE, Bluestone JA. Regulatory T cell therapy for type 1 diabetes: May the force be with you. *J Autoimmun.* 2016; 71: 78-87.
25. Gliwiński M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Trzonkowski P. Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells. *BioDrugs.* 2017; 31(4): 335-347.

26. Golshaya D, Buhler L, Lechler RI, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. *Transpl. Int.* 2007 Jan; 20 (1): 12-24.
27. Gregori S, Battaglia M, Roncarolo MG. Re-establishing immune tolerance in type 1 diabetes via regulatory T cells. *Novartis Found Symp.* 2008; 292: 174-83; discussion 183-6, 202-3.
28. Hall BM, Verma ND, Tran GT, Hodgkinson SJ: Distinct regulatory CD4+T cell subsets; differences between naïve and antigen specific T regulatory cells. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23: 641-647.
29. Haramati J, Soppe C, Zuniga MC. A rapid Method for Skin Grafting in Mice That Greatly Enhances Graft and Recipient Survival. *Transplantation* 2007; 84: 1364-1367.
30. Hasek M. Vegetative hybridization of animals by means of junction of the blood circulation of the blood during embryonic development. *Ceskoslov Biol.* 1953; 2: 267-282.
31. Helderman JH. Generic substitution for immunosuppressive drugs. *Dialysis Transplant.* 2011; 40: 31-40.
32. Herve M, Isnardi I, Ng YS, Bussell JB, Ochs HD. CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance. *J Exper Med.* 2007; 204: 1583-1593.
33. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 389-399.
34. Ingulli E. Mechanism in cellular rejection in transplantation. *Pediatr. Neonatal.* 2008 Oct; 24.
35. Issa F, Schiopu A, Wood KJ. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010 Jan; 6(1): 155-69.
36. Jaeckel E, Mpofu N, Saal N, Manns MP. Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 2008 Feb; 40(2): 126-36.

37. Jagła M, Cichocka-Jarosz W. Limfocyty Regulatorowe. *Alergia, Astma Immunologia* 2007; 12: 22-29.
38. Jong EC de, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26: 289-307.
39. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszczyk M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J. Immunol*, 2003; 33: 1205-1214.
40. Karim M, Bushnell AR, Wood KJ. Regulatory T Cells in Transplantation. *Current Opinion in Immunology* 2002; 14: 584-591.
41. Karim M, Kingsley CI, Bushnell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. Alloantigen induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol.* 2004; 172: 923-928.
42. Kingsley CI, Karim M, Bushnell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: CTLA-4 and IL-10-Dependent Immunoregulation of Alloresponses. *J Immunol* 2002; 168: 1080-1086.
43. Kręcis B, Chomiczewska D, Kieć-Świerczyńska M. Rola Limfocytów T Regulatorowych w Alergicznym Kontaktowym Zapaleniu Skóry. *Medycyna Pracy* 2009; 60: 315-319.
44. Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol. Rev.*, 2003; 193: 58-69.
45. Kurtulus S, Tripathi P, Opferman JT, Hildeman DA. Contracting the 'muscle cells' - does down-sizing suit us for diving into the memory pool? *Immunol. Rev.*, 2010; 236: 54-67.
46. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchórzewski H. CD4+CD25+ T regulatory cells in clinical immunology and therapy. *Postepy Hig Med Dosw.*, 2005; 59: 371-376.
47. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchórzewski H. Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+: fizjologia i rola tych komórek w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. *Postępy hig Med. Dosw.* 2005; 59: 362-370.

48. Long E, Wood KJ. Regulatory T cells in transplantation: Transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation*, 2009; 88, 1050-1056.
49. Long E, Wood KJ. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation*. 2009 Nov 15; 88 (9): 1050-1056.
50. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Derkowska I, Juścińska J, Owczuk R, Szadkowska A, Witkowski P, Młynarski W, Jarosz-Chobot P, Bossowski A, Siebert J, Trzonkowski P. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. *Clin Immunol*. 2014; 153(1): 23-30.
51. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Gliwiński M, Derkowska I, Żalińska M, Zieliński M, Grabowska M, Zielińska H, Piekarska K1, Jaźwińska-Curyłło A, Owczuk R, Szadkowska A, Wyka K, Witkowski P, Młynarski W, Jarosz-Chobot P, Bossowski A, Siebert J, Trzonkowski P. Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes. *J Transl Med*. 2016; 14(1): 332.(182)
52. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Siebert J, Trzonkowski P. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2013; 14(5): 322-32.
53. Marleau AM, Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 2005; 78: 575-584.
54. McCurry KR, Colvin BL, Zahorchak AF, Thomson AW. Regulatory dendritic cell therapy in organ transplantation. *Transpl Int*. 2006; 19(7): 525-38.
55. McDevitt HO. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annu. Rev. Immunol*. 2000; 18: 1-17.
56. Mellor A. The class I MHC gene family in mice. *Immunology Today*. 1986; 7(1): 19-24.
57. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, Paschette E, Morosini M, Cascina A, Mazzucchelli I, Ciardelli L, Oggionni T, Fietta AM, Pozzi E, Viganò M. Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant

- recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation*. 2004; 77: 762-766.
58. Mills KH, McGuirk P: Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol*. 2004; 16: 107-117.
59. Nikouejad H, Sharif MR, Amirzargar A, Mirshafiey A, Einollahi B. Regulatory T cells as a therapeutic tool to induce solid-organ transplant tolerance: current clinical experiences. *Exp Clin Transplant*. 2013 Oct; 11(5): 379-87.
60. Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science*. 1945; 102: 400-401.
61. Pączek L, Foronczewicz B. Tolerancja Immunologiczna – wiodącym problemem transplantologii XXI wieku. *Postępy Nauk Medycznych* 2003; 2-1: 40-44.
62. Pakravan N, Hassan AT, Hassan ZM. Naturally occurring selftolerance CD4+CD25+ regulatory T cells: universal immune code. *Cell Mol Immunol*. 2007; 4: 197-201.
63. Peterson RA: Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*. 2012; 40: 186-204.
64. Piccirillo CA, d'Hennezel E, Sgouroudis E, Yurchenko E. CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of autoimmunity: in vivo veritas. *Curr Opin Immunol*. 2008 Dec; 20(6): 655-62.
65. Piccirillo CA, Tritt M, Sgouroudis E, Albanese A, Pyzik M, Hay V. Control of type 1 autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun; 1051: 72-87.
66. Pilat N, Granofszky N, Wekerle T. Combining Adoptive Treg Transfer with Bone Marrow Transplantation for Transplantation Tolerance. *Curr Transplant Rep*. 2017; 4(4): 253-261.
67. Pillai S, Mattoo H, Cariappa A. B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2011; 23: 721-731.

68. Przybylski G, Wielikdzień J, Kopiński P. Mechanisms of programmed cell death of effector T lymphocytes. *Postępy Hig Med Dosw (Online)*. 2013; 67: 1374-90.
69. Qin SX, Wise M, Cobbold SP, Leong L, Kong YC, Parnes JR, Waldmann H. Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*. 1990 Dec; 20(12): 2737-45.
70. Resende MG, Fux B, Caetano BC, Mendes EA, Silva NM, Ferreira AM, Melo MN, Vitor RW, Gazzinelli RT. The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. *An Acad Bras Cienc*. 2008; 80(1): 85-99.
71. Ribatti D. Peter Brian Medawar and the discovery of acquired immunological tolerance. *Immunology Letters*. 2015; 167: 63-66.
72. Richter M, Machaliński B. Induction of Immunological Tolerance in Vascularized Organ Transplantation. *Postępy Biologii Komórki* 2005; tom 32: 215-230.
73. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK: Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006; 212: 28-50.
74. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1; 155 (3): 1151-1164.
75. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-562.
76. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells In immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005; 6: 345-352.
77. Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25⁺ T cells in human kidney transplantation recipients. *J. Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 1643-1651.

78. Schaefer SM, Süsal C, Sommerer C, Zeier M, Morath C. Current pharmacotherapeutical options for the prevention of kidney transplant rejection. *Expert Opin. Pharmacother.* 2013; 14: 1029–1041.
79. Schmalzer M, Broggi MA, Rossi SW. Transplantation of tail skin to study allogeneic CD4 T cell responses in mice. *J Vis Exp.* 2014 Jul 25; (89).
80. Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol.* 2005; 6(4): 327-30.
81. Sgouroudis E, Piccirillo CA. Control of type 1 diabetes by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: lessons from mouse models and implications for human disease. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009 Mar; 25(3): 208-18.
82. Sharma A, Rudra D. Regulatory T cells as therapeutic targets and mediators. *Int Rev Immunol.* 2019 Jun 2; 1-21.
83. Simpson E. Medawar's legacy to cellular immunology and clinical transplantation: a commentary on Billingham, Brent and Medawar (1956) 'Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 19; 370(1666): 20140382.
84. Śledź-Gawrońska B. Rola limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+ w rozwoju zaburzeń o podłożu immunologiczn. *Journal of Laboratory Diagnostics.* 2010; 46(2): 147-153.
85. Steger U, Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cell develop in mice not only during spontaneous acceptance of liver allografts but also after allograft rejection. *Transplantation.* 2006 Nov; 15;82 (9): 1202-10209.
86. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev. Immunol.* 2003; 21: 685-711.
87. Stokes J, Hoffman EA, Zeng Y, Larmonier N, Katsanis E. Post-transplant bendamustine reduces GvHD while preserving GvL in experimental haploidentical bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 2016; 174(1): 102-16.

88. Suffia IJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med*. 2006; 203(3): 777-788.
89. Sugarbaker PH, Chang AE. Uncovered skin grafts in mice. *J Immunol Methods* 1979; 31: 167-175.
90. Sykes M, Sachs DH: Tolerance. W: Transplantation, red. L.C. Ginns, A.B. Cosimi., P.J. Morris. Blackwell Science, Malden Massachusetts 1999; 79–93.
91. Szaflarska A, Rutkowska-Zapała M, Kowalczyk D. Immune tolerance mechanisms--brief review. *Przegl Lek*. 2015; 72(12): 765-9. Review. Polish.
92. Taams LS, Curnow SJ, Vukmanovic-Steje M, Akbar AN. The generation and antigen-specificity of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006 Sep; 5 (3): 149-156.
93. Taams LS, Vukmanovic-Steje M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM. et al: Antigen-specific T cell suppression by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2002; 32: 1621-1630.
94. Tanimine N, Germana SK, Fan M, Hippen K, Blazar BR, Markmann JF, Turka LA, Priyadharshini B. Differential effects of 2-deoxy-D-glucose on in vitro expanded human regulatory T cell subsets. *PLoS One*. 2019; 6: 14(6).
95. Tanimine N, Turka LA, Priyadharshini B. Navigating T-Cell Immunometabolism in Transplantation. *Transplantation*. 2018 Feb; 102(2): 230-239.
96. Taylor PA, Lee CJ, Blazar BR. The Infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002 May, 15; 99(10): 3493-3499.
97. Texier L, Lineburg KE, MacDonald KP. Harnessing bone marrow resident regulatory T cells to improve allogeneic stem cell transplant outcomes *Int J Hematol*. 2017 Feb; 105(2): 153-161.
98. Tille T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzwei MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells. *Immunity*. 2007; 26: 205-213.

99. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-host leukemia. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1688–1696.
100. Trendo A, Charlotte F, Fisson S., Yagello M, KlatzmannD, Salomon BL, Cohen JL. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-host leukemia. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112, 1688-1696.
101. Trzonkowski P, Bacchetta R, Battaglia M, Berglund D, Bohnenkamp HR, ten Brinke A, Bushell A, Cools N, Geissler EK, Gregori S, Marieke van Ham S, Hilkens C, Hutchinson JA, Lombardi G, Madrigal JA, Marek-Trzonkowska N, Martinez-Caceres EM, Roncarolo MG, Sanchez-Ramon S, Saudemont A, Sawitzki B. Hurdles in therapy with regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2015; 7(304): 304ps18.
102. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, Mysliwska J. Hellmann A. First-in-man clinic results of treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+ CD25+CD127-Tregulatory cells. *Clin Immunol.* 2009 Oct; 133(1): 22-26.
103. Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin. Immunol.* 2004; 112(3): 258-267.
104. Trzonkowski P, Zaucha JM, Mysliwska J, Balon J, Szmit E, Hałaburda K, Bieniaszewska M, Młotkowska M, Hellmann A, Myśliwski A. Differences in kinetics of donor lymphoid cells in response to G-SEF administration may affect the incidence and severity of acute GvHD in respective HLA-identical sibling recipients. *Med. Oncol.* 2004; 21(1): 81-94.
105. Viret C, Janeway CA. MHC and T cell development. *Jr. Rev Immunogenet.* 1999; 1(1): 91-104.

106. Weiner HL: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001; 3: 947-954.
107. Wilczynski JR, Radwan M, Kalinka J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci.* 2008; 13: 2266-74.
108. Wilkes DS, Burlingham WJ. *Immunobiology of Organ Transplantation.* Kluwer Academic/Plenum Publishers 2004 ISBN 0-306-48328-9.
109. Wood KJ, Bushell AR, Jones ND. Immunologic Unresponsiveness to Alloantigen in vivo: a role for regulatory T cells. *Immunological Reviews* 2011; 241: 119-132.
110. Wood KJ, Bushell AR, Jones ND. The discovery of immunological tolerance: now more than just a laboratory solution. *J Immunol.* 2010; 184: 3-4.
111. Yamada K, Sykes M, Sachs DH. Tolerance in Xenotransplantation *Curr Opin Organ Transplant.* 2017 Dec; 22(6): 522–528.