Przeszczep skóry jako model zwierzęcy w badaniach funkcji limfocytów T regulatorowych

ANNA ŻYŁKO, ANNA WARDOWSKA*, PIOTR TRZONKOWSKI*

Trójmiejska Akademicka Zwierzętarnia Doświadczalna – Centrum Badawczo-Usługowe,
Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Polska

*Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 7, 80-210 Gdańsk, Polska

Otrzymano 03.07.2017

Zaakceptowano 12.12.2017

Żyłko A., Wardowska A., Trzonkowski P.

Skin transplantation in mice as an animal model for functional analysis of T regulatory cells

Summary

The role of T regulatory cells (Tregs) in transplantology has been widely studied over the years. The mouse model of skin transplantation is used as a quick and easy way to monitor the immune response of Tregs, vital for creation and maintenance of homeostasis and immunological tolerance. This model is extremely useful in the assessment of allograft rejection and immune tolerance induction dependent on Tregs. The procedure of skin transplantation is widely used not only in transplantology, but also in studies on the effectiveness of various immunosuppressive compounds and studies on autoimmune diseases, including diabetes, multiple sclerosis and albinism. The improved protocol of mouse tail skin grafting is easy to master, and its wide application gives many opportunities for new solutions in biomedical research.

Keywords: transplantation, murine models, immunological tolerance, Treg cells

Model przeszczepu skóry u myszy ma długą historię w badaniach biomedycznych i jest stale ulepszany i modyfikowany, ze względu na swoje zastosowanie w medycynie. Jednym z tych zastosowań są badania nad limfocytami T regulatorowymi (Treg). Dowiedzono, że limfocyty T regulatorowe mają kluczowe znaczenie w powstawaniu i utrzymywaniu homeostazy oraz tolerancji immunologicznej, biorąc udział w patogenezie chorób autoimmunologicznych, alergicznych, nowotworowych i w transplantologii. Manipulacje Treg to obecnie duże pole do badań laboratoryjnych prowadzących do stworzenia skutecznych terapii komórkowych. Szereg projektów zajmujących się aktywnością komórek regulatorowych i ich rolą w procesach immunologicznych stanowią badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Mysi model przeszczepu skóry to szybki i stosunkowo prosty sposób monitorowania odpowiedzi immunologicznej mediowanej przez limfocyty T regulatorowe. Model ten ma szerokie zastosowanie w poszukiwaniu nowych leków immunosupresyjnych, w badaniach biomarkerów odrzucania przeszczepów narządowych, leczeniu chorób przeszczep przeciwko gospodarz (GVHD) (33), leczeniu ran czy w badaniach nad chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak cukrzyca (20, 21, 34), stwardnienie rozsiane czy bielactwo (7, 10, 17).

Rys historyczny

Pierwsi procedurę przeszczepu skóry u myszy szczegółowo opisali w 1951 r. Billingham i Medawar (3) w swoich badaniach nad odpowiedzią immunologiczną. Stworzyli doskonałe i użyteczne narzędzie dla badań biomedycznych nad odrzutami alloprzeszczepu. Ich dokonania stały się motorem do modyfikacji i poszukiwania nowych technik przeszczepiania skóry. Opracowali procedurę pobierania skrawków od dawcy, przygotowania łoża do przyjęcia skrawków u biorcy oraz metody zakładania opatrunku, chroniącego przeszczep. Opisali również pracę ze skrawkami różnego rodzaju i pochodzenia. Skrawki skóry pełnej grubości – pinch grafts pobierane były przy użyciu pincety i skalpela bądź nożyczek, tzw. thiersch grafts – cieńsze – składające się z warstwy naskórka i skóry właściwej bez tkanki podskórnej, pozyskiwane były poprzez rozdzielenie wzdłużne małżowiny usznej myszy lub poprzez zdjęcie skalpu z ogona (3). Jako właściwe miejsce do przyjęcia przeszczepu – graftu, wskazali skórę grzbietową i boczną część klatki piersiowej, wstępnie pozbawioną sierści, gdzie żebra pełnią funkcję stabilizatora miejsca przeszczepu i zmniejszają ryzyko przesunięcia się przeszczepianych skrawków. W swoich badaniach wyróżnili dwa rodzaje łoża: dopasowane (fitted grafts), w które idealnie wpasowuje

się przygotowany skrawek skóry oraz otwarte (open fit grafts), na powierzchni którego przeszczepić można było większą ilość skrawków jednocześnie. Stosowana przez nich anestezja wymagała dootrzewnowej iniekcji mieszaniny pentobarbitalu sodu (nembutal). Dla zabezpieczenia rany zakładano myszom opatrunek z gazy i plastra, który zdejmowany był po ok. 7 dniach od wykonanego zabiegu.

Donald i wsp. (2) w 1960 r. inspirowani wcześniejszymi dokonaniem, opracowali własną metodę przeszczepu skóry z ogona, w której łożo do przeszczepu wycinali również na ogonie biorcy. Skrawki skóry umieszczano 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 (2). Ten rodzaj opatrunku miał umożliwić obserwację miejsca przeszczepu od momentu jego wykonania. Podobnie dla uwidocznienia miejsca przeszczepu Sugarbaker i Chang (30) w 1979 r. opisali metodę przeszczepu skóry z ucha, gdzie dla skrawka wszywanego w łożo nie stosowano żadnego dodatkowego opatrunku czy zabezpieczenia rany. Umożliwiało to monitoring przeszczepu od pierwszego dnia.

Mayumi i wsp. (23) w swojej pracy z 1988 r. opisali metodykę przeszczepu skóry z tułowia. Mysz dawca poddawana była eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Następnie z całej powierzchni grzbietowej i bocznej ciała zwierzęcia, przy pomocy kremu depilacyjnego usuwana była sierść. Cała skóra na odcinku od szyi do bioder była pobierana, a w kolejnym etapie cięta przy pomocy skalpela na mniejsze fragmenty wielkości ok 1 cm². Tak przygotowane skrawki płucone były w roztworze Hanki i przetrzymywane na lodzie do momentu przeszczepu. Mysz biorca poddana anestezji poprzez dootrzewnową iniekcję roztworu pentobarbitalu sodu i ketaminy była golona w obrębie klatki piersiowej i grzbietu. Przy pomocy nożyczek wycinano dwa łoża, z obu stron ciała zwierzęcia, umieszczano w nich wcześniej przygotowane skrawki, które wszywano przy pomocy nici chirurgicznej. Opatrunek stanowiła jałowa gaza i bandaż oraz plaster zabezpieczający.

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, takiego, który umożliwi względne monitorowanie rany bez zbędnego narażania na stres biorcy przeszczepu. Obecnie stosuje się również bezopatrunkowe techniki przeszczepiania skóry, szczególnie przydatne w badaniach nad gojeniem się

ran, gdzie możliwość monitorowania procesu gojenia się przeszczepu jest bardzo istotna. W takim przypadku zamiast opatrunku łożo przeszczepu otacza specjalny krążek (ring) z tworzywa, który mocuje się wokół rany przy pomocy szwów (22) lub kleju tkankowego. Najnowsze zdobycze technologii pozwalają na założenie transparentnego, wodoodpornego i elastycznego, a jednocześnie oddychającego opatrunku w sprayu (1). Na przestrzeni lat badacze poszukiwali również właściwej metody znieczulania, która usprawni procedurę i umożliwi jej bezpieczny przebieg. Obecnie najpowszechniejszą stosowaną metodą jest anestezja wziewna z 3% izofluranu. Stosuje się również iniekcje mieszaniny ketaminy i ksylazyny lub ketaminy i medetomidyny (8, 29). Metodyka przeszczepu skóry u myszy była i jest szeroko opisywana, a sam model nadal jest często stosowany jako idealny dla badań nad chorobami autoimmunologicznymi, alergicznymi i nowotworowymi. Optymalną procedurę szczegółowo opisano w dalszej części pracy.

Procedura przeszczepu skóry z ogona myszy

Model przeszczepu skóry z ogona znakomicie sprawdza się w ocenie odrzutu alloprzeszczepu i indukcji tolerancji immunologicznej zależnej od limfocytów T regulatorowych. Przeszczep skóry z ogona jest procedurą stosunkowo prostą do przeprowadzenia, a sam transplant skóry z ogona jest znacznie mniej podatny na możliwość niedokrwienia niż graft skóry pełnej grubości, pobrany z części 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. Stosowana w tym modelu anestezja wziewna z 3% izofluranu jest dużo bezpieczniejsza i wiąże się z mniejszą ilością ewentualnych powikłań w porównaniu z iniekcyjną, ze względu na skrócony do minimum czas przebiegu samego zabiegu, jak i wybudzania się myszy, a co za tym idzie – ogranicza stres zwierzęcia związany z całą procedurą.

Przygotowania do zabiegu (ryc. 1):

- miejsce pracy powinno zostać właściwie zorganizowane, narzędzia, opatrunki i wszelkie pomoce ułożone tak, aby usprawnić przebieg procedury;
- niezbędne narzędzia chirurgiczne: nożyczki, pincety należy poddać sterylizacji;
- do wykonania zabiegu niezbędne będą: jałowe gaziki, plaster opatrunkowy, skalpel, środek dezynfekcyjny – roztwór 70% etanolu, octenisept, roztwór 0,9% NaCl, szalka Petriego, lód;
- zaleca się podanie myszy biorcy przed zabiegiem dootrzewnowej iniekcji analgetyku, (np. buprenorfiny w dawce 0,05 mg/kg masy ciała zwierzęcia), zapewniając w ten sposób działanie przeciwbólowe bezpośrednio po zabiegu (8, 29).

Przygotowanie skrawków skóry z ogona do przeszczepu (ryc. 2):

- mysz dawkę należy poddać eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych lub w aparacie do eutanazji z dwutlenkiem węgla;
- zdezynfekowany ogon należy naciąć skalpelem u nasady wzdłuż, a następnie przy pomocy pincety zdjęć delikatnie skalp z całej długości ogona, płat skóry umieścić w 0,9% NaCl w szalce i przetrzymać na lodzie;
- przy pomocy skalpela należy pociąć fragment skóry na mniejsze ok. 10 mm długości fragmenty i pozostawić w 0,9% NaCl.

Przebieg procedury (ryc. 3):

- mysz biorcą należy umieścić w pojemniku indukcyjnym aparatu do anestezji wziewnej dla małych gryzoni i poddać znieczuleniu 3% izofluranem;

- uśpione zwierzę należy ułożyć na boku ciała na płytce operacyjnej z maseczką inhalacyjną na pyszczku;

- dla potwierdzenia, że zwierzę wprowadzono w stan głębokiej anestezji, należy sprawdzić jej czucie głębokie, zaciskając fałd skórny między palcami kończyny tylnej;

- bok ciała należy dokładnie ogolić przy pomocy skalpela i zdezynfekować octeniseptem;

- używając pincety należy chwycić płat ogolonej skóry i unieść delikatnie do góry, a następnie przy pomocy nożyczek odciąć fragment skóry, tworząc łożo o średnicy ok. 8 mm²;

- w przypadku krwawienia należy osuszyć ranę przy pomocy jałowego gazika;

- przygotowany wcześniej pojedynczy skrawek skóry z ogona należy umiejscowić bezpośrednio w łożu i delikatnie przycisnąć jałowym gazikiem, jeżeli okaże się konieczne, w celu dopasowania graftu, nadmiar skóry można delikatnie przyciąć, używając nożyczek;

- jałowy gazik wielkości ok. 1 cm² należy umiejscowić bezpośrednio w miejscu przeszczepu, a następnie założyć plaster opatrunkowy wokół klatki piersiowej myszy, tak aby nie przesunąć przeszczepu, a jednocześnie solidnie przymocować opatrunek do powłok ciała;

- opatrunek powinien być odpowiednio ciasno założony, ale nie może powodować dyskomfortu zwierzęcia ani uniemożliwiać swobodnego poruszania się zwierzęcia, nie może też być założony zbyt luźno, co mogłoby skutkować jego zsunięciem się albo przesunięciem się samego graftu pod opatrunkiem;

- po przeszczepie mysz biorcą należy umieścić w oddzielnej klatce na czas odzyskania przez nią całkowitej przytomności i obserwo-

Ryc. 1. Miejsce pracy

Ryc. 2. Przygotowanie skrawków do przeszczepu

Ryc. 3. Etapy procedury przeszczepu skóry z ogona

Ryc. 4. Przeszczep skóry z ogona od myszy C57BL/6 do C57BL/6 w kolejnych dniach od wykonania procedury

wać, czy opatrunek nie powoduje dyskomfortu oraz czy zwierzę nie próbuje się go pozbyć;

- przed podjęciem czynności zabiegowych na kolejnej myszy, narzędzia należy zdezynfekować roztworem 70% etanolu.

Opieka pooperacyjna:

- powołując się na niektóre źródła ze względu na stosowaną w tej procedurze anestezję wziewną z izofluranem, który nie ma działania analgetycznego, zaleca się podawanie zwierzęciu po zabiegu syropu z paracetamolem w wodzie do picia (4 mg/ml), przez 7 dni (29);

- bezpośrednio po zabiegu zaleca się przetrzymywanie zwierząt w oddzielnych klatkach, ale jedynie do momentu upewnienia się, czy zwierzę dobrze zniosło procedurę. Następnie można myszy przełożyć do wspólnej klatki i przetrzymywać w grupach kilkuosobniczych;

- monitoring zwierzęcia po zabiegu powinien skupić się na ocenie ogólnego stanu zdrowia i behawioru myszy, pomiarach masy ciała i kontroli pobieranej paszy i wody;

- monitoring samego przeszczepu ze względu na opatrunek jest nieco utrudniony; zaleca się zmianę opatrunku i ocenę wizualną przeszczepu, udokumentowaną wykonaniem zdjęcia w 1., 3., 5. i 7. dniu od przeszczepu (ryc. 4, 5), przy czym całkowite usunięcie opatrunku możliwe jest już w 5. dniu od przeprowadzonej procedury przeszczepu skóry;

- każdorazowa zmiana opatrunku i wykonanie zdjęcia przeszczepu wymaga poddania zwierzęcia anestezji wziewnej 3% izofluranem. Mysz należy umieścić w pojemniku indukcyjnym aparatu do anestezji wziewnej dla małych gryzoni i poddać znieczuleniu 3%

Ryc. 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

izofluranem. Uśpione zwierzę należy ułożyć na boku ciała na płytce operacyjnej z масечką inhalacyjną na pyszczku, delikatnie przeciąć nożyczkami plaster wzdłuż ciała zwierzęcia, a następnie bardzo delikatnie usunąć plaster z gazikiem, starając się nie naruszyć miejsca przeszczepu;

- w przypadku, gdy gazik przyklei się do rany, należy zwilżyć go roztworem 0,9% NaCl, usunąć, a następnie osuszyć;

- nowy opatrunek należy przygotować identycznie jak pierwszy z jałowego gazika i plastra opatrunkowego.

Przedstawiony powyżej protokół opracowano na podstawie własnej praktyki w zakresie przeprowadzania procedury doświadczalnej przeszczepu skóry u myszy w badaniach nad analizą właściwości tolerogennych limfocytów T regulatorowych, w świetle ich wykorzystania jako terapii zmniejszającej ryzyko odrzutu alloprzeszczepów narządowych oraz z wykorzystaniem materiałów źródłowych (8, 29, 30). Przeszczep skóry w kolejnych dniach obrazują ryc. 4, 5, 6.

Ryc. 6. Dzień 14. – przeszczep przyjęty (A), przeszczep odrzucony (B)

Limfocyty T regulatorowe

Znaczenie limfocytów T regulatorowych (Treg) w transplantologii to obecnie szeroko badane zagadnienie. Zarówno u ludzi, jak i na modelach zwierzęcych wykazano, że za odrzucenie przeszczepu odpowiedzialny jest układ odpornościowy. Allogeniczne 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 znajdują się: wytwarzanie tolerancji na antygen, odpowiedź przeciwinfekcyjna, przeciwnowotworowa, poszczepienna odpowiedź immunologiczna, tolerancja wobec przeszczepów narządowych (16, 25). Komórki Treg to bardzo niejednorodna fenotypowo populacja limfocytów T, spośród których do najważniejszych subpopulacji wykazujących czynności regulatorowe zalicza się komórki o fenotypie CD4+CD25+, komórki NK oraz limfocyty Th1 i Th3 (4, 11). Do tej pory spośród nich najlepiej scharakteryzowaną grupę stanowią limfocyty T CD4+CD25+Foxp3, czyli tzw. naturalne Treg. W 1995 r. Sakaguchi i wsp. (28) 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 przeszczep przeciwko gospodarz (GVHD), jako że komórki te wpływają na utrzymanie tolerancji immunologicznej poprzez ujemną regulację odpowiedzi immunologicznej na antygen własny i egzogeny.

Powszechnie uważa się, że limfocyty T regulatorowe znoszą lub osłabiają zdolności limfocytów B do produkcji przeciwciał pod wpływem antygeny, czyli mają tzw. działanie supresyjne (18, 27, 30). Proces ten zachodzi poprzez bezpośrednie oddziaływanie na komórki efektorowe, czyli wymaga bezpośredniego kontaktu z komórką docelową lub pośrednio przez wpływ na komórki prezentujące antygen (komórki dendrytyczne i monocyty) w drodze mechanizmu opierającego się na produkcji i uwalnianiu supresyjnych cytokin (IL-10, TGF- β) (6, 14, 16). Specyficznym markerem limfocytów T regulatorowych jest czynnik transkrypcyjny Foxp3, mający decydujące znaczenie dla aktywności regulatorowej tych komórek. Czynnik Foxp3 powstaje w wyniku translacji genu FOXP3 zlokalizowanego w chromosomie X (4). Jest jednym z czynników zaangażowanych w rozwój i funkcjonowanie regulatorowych limfocytów T. Kluczowe znaczenie dla pełnienia przez nie funkcji ma budowa białka FOXP3. Badania wykazały, że mutacje w poszczególnych domenach czynnika Foxp3 prowadzą do rozwoju chorób z autoagresji czy przewlekłych zakażeń nie tylko u zwierząt, ale również u człowieka. Dowiedziono na

modelu mysim, że czynnik transkrypcyjny Foxp3 pełni bardzo ważną rolę w powstawaniu i różnicowaniu limfocytów T regulatorowych (4). Współczesne badania bez wątpienia potwierdzają znaczącą rolę populacji limfocytów T CD4+CD25+ w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej. W szczególności ma to znaczenie w badaniach nad chorobami o autoimmunizacyjnym podłożu, w alergiach i transplantologii. Odkrycie czynnika FoxP3 – głównego regulatora powstawania i funkcjonowania komórek Treg było krokiem milowym w poznaniu molekularnych mechanizmów, które nimi rządzą. Rola limfocytów regulatorowych została potwierdzona w wielu badaniach opartych na modelach zwierzęcych (6, 14, 15, 20, 21, 34).

Zastosowanie mysiego modelu przeszczepu skóry

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 allogenicznych. Jednym z głównych celów immunologii transplantacyjnej jest poszukiwanie skutecznych metod indukowania u biorcy specyficznej tolerancji wobec antygenów dawcy, która mogłaby skutecznie uchronić pacjenta przed późnym odrzuceniem przeszczepu oraz pozwoliłaby uniknąć przewlekłej terapii lekami immunosupresyjnymi (26). Większe zrozumienie właściwości limfocytów T regulatorowych ma realne, znaczne korzyści w dziedzinie badań nad przeszczepami. Fakt, że można by indukować powstawanie komórek regulatorowych przed przeszczepem lub we wczesnym okresie po przeszczepieniu, daje nadzieję na ograniczenie potrzeby nieswoistej terapii immunosupresyjnej bądź nawet całkowite jej wyeliminowanie (13).

Jak już wspomniano, model przeszczepu skóry u myszy to szybka i stosunkowo prosta metoda monitorowania odpowiedzi immunologicznej, w szczególności limfocytów T regulatorowych. Ma on szerokie zastosowanie w badaniach nad efektywnością najróżniejszych związków i preparatów o działaniu immunosupresyjnym, indukcją tolerancji immunologicznej oraz wpływem biologicznym przeciwciał blokujących (14). Long i wsp. w czasie wieloletniej pracy nad limfocytami T regulatorowymi wielokrotnie sięgali po ten właśnie model. Gdy mówi się o skutecznej, indukowanej tolerancji immunologicznej, należałoby przyjrzeć 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 reaktywnych komórek dawcy (19). Badania na myszach pozwoliły zrozumieć, jak wykorzystać odpowiedź immunologiczną organizmu i zjawisko tolerancji immunologicznej w transplantologii, jak leczyć pacjentów po przeszczepach, aby zminimalizować stosowanie leków immunosupresyj-

nych, indukując jednocześnie długofalową tolerancję na tkanki dawcy (19).

Specyficzna i selektywna obojętność (niewrażliwość) immunologiczna na alloantygeny dawcy może być wywołana *in vivo*, co potwierdzają badania. W oparciu o model przeszczepu skóry u myszy dowiedziono, że komórki T regulatorowe CD25+CD4+ wykazują długofalową tolerancję na alloantygeny dawcy (14). Limfocyty T regulatorowe można podzielić na dwie populacje: naturalnie występujące CD25+CD4+Treg, które wytwarzane są w grasicy, w obwodzie funkcjonujące jako dojrzałe komórki T oraz indukowane CD4+Treg, które pochodzą z prekursora CD25-CD4+ lub z obwodowych komórek CD25+CD4+ (19). Zdolność limfocytów Treg CD4+CD25+ do hamowania odpowiedzi limfocytów efektorowych stwarza realną szansę wykorzystania ich w terapii immunosupresyjnej osób po przeszczepach allogenicznym (18). Według niektórych badaczy, podawanie pacjentom limfocytów Treg CD4+CD25+ w okresie przedtransplantacyjnym, a następnie po transplantacji narządu może zapobiegać rozwojowi choroby GVHD (18, 32). W innych badaniach wykazano również, że limfocyty Treg zdolne są również do hamowania funkcji limfocytów Th1 oraz Th2, dzięki czemu mogą kontrolować odpowiedź immunologiczną w stosunku do alergenów (12, 18). Dowiedziono również, że naturalnie pojawiające się CD4+ Treg powstające w grasicy, pozostające pod transkrypcyjną kontrolą foxp3 mają kryterialne znaczenie dla obwodowej homeostazy. W badaniach nad naturalnie występującymi FOXP3+CD4+ przedstawiono dowody na ochronne działanie limfocyty Treg względem alloprzeszczepu w oparciu o naturalnie występujące FOXP3+CD4+ Treg, ale również FOXP3CD4+ nieregulatorowe (6). Udokumentowano, że indukowana tolerancja immunologicznej zależnej od alloantygenów może wielorako oddziaływać na cały układ immunologiczny. W odniesieniu do transplantacji klinicznych sugeruje się zwrócenie szczególnej uwagi nie tylko na protekcyjnie 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 alloreaktywnych nieregulatorowych limfocytów T wydaje się atrakcyjną metodą indukcji tolerancji immunologicznej w badaniach klinicznych (6).

Istnieją niepodważalne dowody na to, jak mysie modele eksperymentalne podkreśliły znaczenie limfocytów Treg w transplantologii. Dostarczyły one ważnych informacji odnośnie do działania środków immunosupresyjnych, pozwoliły lepiej zrozumieć znaczenie czynnika FOXP3 czy w końcu ułatwiły strategię planowania dalszych badań nad indukowaną tolerancją immunologiczną Treg-zależną. Ze względu na zasadniczą różnicę pomiędzy mysimi i ludzkimi limfocytami T regulatorowymi trudno jest jednak

dokonać bezpośredniego przeniesienia wyników do kliniki (19), dlatego też należy równocześnie rozwijać badania na modelach zwierzęcych oraz w ludzkich badaniach klinicznych.

Piśmiennictwo

1. Baharav E., Lider O., Margalit M., Cohen I. R.: A modified technique for experimental skin grafting. *J. Immunol. Methods* 1986, 90, 143.
2. Bailey D. W., Usama B.: A rapid method of grafting skin on tails of mice. *Transplant. Bill.* 1960, 7, 424-425.
3. Billingham R. E., Medawar P. B.: The technique of free skin grafting in mammals. *J. Exp. Biol.* 1951, 28, 385.
4. 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.
5. Cobbold S. P., Castejon R., Adams E., Zelenika D., Graca L., Humm S., Waldmann H.: Induction of foxP3+ Regulatory T Cell in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to transplants. *J. Immunol.* 2004, 172, 6003-6010.
6. Francis R. S., Feng G., Tha-In T., Lyons I. S., Wood K. J., Bushell A. R.: Induction of transplantation Tolerance Converts Potential Effector T Cell into Graft-Protective Regulatory T Cell. *J. Immunol.* 2011, 41, 726-738.
7. Gilhar A., Etzioni A.: The nude mouse model for the study of human skin disorders. *Dermatology* 1994, 189, 5-8.
8. Haramati J., Soppe C., Zuniga M. C.: A rapid Method for Skin Grafting in Mice That Greatly Enhances Graft and Recipient Survival. *Transplantation* 2007, 84, 1364-1367.
9. Issa F., Robb R. J., Wood K. J.: The where and when of t cell regulation in transplantation. *Trends in Immunology* 2013, 34, 107-113.
10. Iwakura Y., Ishigama H.: The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 1218-1222.
11. Jagla M., Cichocka-Jarosz W.: Limfocyty Regulatorowe. *Alergia, Astma Immunologia* 2007, 12, 22-29.
12. Jutel M., Akdis M., Budak F., Aebischer-Casaulta C., Wrzyszczyk M., Blaser K., Akdis C. A.: 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.
13. Karim M., Bushell A. R., Wood K. J.: Regulatory T Cells in Transplantation. *Current Opinion in Immunology* 2002, 14, 584-591.
14. Kingsley C. I., Karim M., Bushell A. R., Wood K. J.: CD25+CD4+ Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: CTLA-4 and IL-2/IL-10-Dependent Immunoregulation of Alloresponses. *J. Immunol.* 2002, 168, 1080-1086.
15. Kinnear G., Wood K. J., Fallah-Arani F., Jones N. D.: A Diametric Role for OX40 in the Response of Effector/memory CD4+T Cells and Regulatory T Cells to Alloantigen. *J. Immunol.* 2013, 191, 1465-1475.
16. Kręćisz B., Chomiczewska D., Kieć-Świerczyńska M.: Rola limfocytów T regulatorowych w alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry. *Medycyna Pracy* 2009, 60, 315-319.
17. Lerner A. B., Shiohara T., Boissy R. E., Jacobson K. A., Lamoreux M. L., Moellmann G. E.: A mouse model for vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 1989, 87, 299-304.
18. 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.
19. Long E., Kathryn J. W.: Regulatory T cells in transplantation: Transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation* 2009, 88, 1050-1056.
20. Marek-Trzonkowska N., Myśliwiec M., Dobyszek A., Grabowska M., Derkowska I., Juszczyńska J., Owczuk R., Szadkowska A., Witkowski P., Młynarski W., Jarosz-Chobot P., Bossowski A., Siebiert 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, 23-30.
21. Marek-Trzonkowska N., Myśliwiec M., Dobyszek A., Grabowska M., Techmańska I., Juźczyńska J., Wujtewicz M. A., Witkowski P., Młynarski W., Balcerska A., Myśliwska J., Trzonkowski P.: Administration of CD4+CD25^{high}CD127-regulatory T cells preserves β-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 2012, 35, 1817-1820.
22. Margalit M., Beldergin A., Berlatzky Y., Frenkel A., Cohen I. R.: Experimental animal skin grafting simplified. *J. Immunol. Methods* 1982, 51, 125.
23. Mayumi H., Nomoto K., Good R. A.: A surgical Technique for Experimental free skin Grafting in Mice. *Jpn. J. Surg.* 1988, 18, 548-557.

24. Miyagawa F., Gutermuth J., Zhang H., Katz S. I.: The Use of mouse to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance. *Journal of Autoimmunity* 2010, 35, 192-198.
25. Pączek L., Foroniewicz B.: Tolerancja Immunologiczna – wiodącym problemem transplantologii XXI wieku. *Postępy Nauk Medycznych* 2003, 2-1, 40-44.
26. Richter M., Machaliński B.: Induction of Immunological Tolerance in Vascularized Organ Transplantation. *Postępy Biologii Komórki* 2005, 32, 215-230.
27. Ryba M., Myśliwska J.: Biologia Naturalnych limfocytów Regulatorowych CD4+CD25+. *Postępy Biologii Komórki* 2006, 33, 427-436.
28. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M.: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995 Aug 1, 155, 1151-1164.
29. Schmalzer M., Broggi M. A., Rossi S. W.: Transplantation of tail skin to study allogeneic CD4 T cell responses in mice. *J. Vis. Exp.* 2014 Jul 25, (89), e51724. doi: 10.3791/51724.
30. Sugarbaker P. H., Chang A. E.: Uncovered skin grafts in mice. *J. Immunol. Methods* 1979, 31, 167-175.
31. Timmermann W., Gassel H. J., Ulrichs K. R., Zhong R., Theide A.: Organotransplantation in Rats and Mice, 1998, chapter 18.
32. Trender A., Charlotte F., Fisson S., Yagello M., Klatzmann D., Salomon B. L., Cohen J. L.: 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.
33. Trzonkowski P., Bacchetta R., Battaglia M., Berglund D., Bohnenkamp H. R., Brinke A., Bushell A., Cools N., Geissler E. K., Gregori S., Marieke van Ham S., Hilken C., Hutchinson J. A., Lombardi G., Madrigal J. A., Marek-Trzonkowska N., Martinez-Caceres E. M., Roncarolo M. G., Sanchez-Ramon S., Saudemont A., Sawitzki B.: Hurdles in therapy with regulatory T cells. *www.ScienceTranslationMedicine.org*, 9 September 2015; Vol 7 Issue 304 304ps18.
34. Trzonkowski P., Bieniaszewska M., Juścińska J., Dobyszek A., Krzystyniak A., Marek N., Myśliwska J., Hellmann A.: First-in-man clinical result of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127 – T regulatory cells. *Clin. Immunol.* 2009, 133, 22-26.
35. Wood K. J., Bushell A. R., Jones N. D.: Immunologic Unresponsiveness to Alloantigen in vivo: a role for regulatory T cells. *Immunological Reviews* 2011, 241, 119-132.

Adres autora: mgr Anna Żyłko, Dębinki 1, 80-211 Gdańsk; e-mail: aqna@gumed.edu.pl