

Ilek. Michał Janyst

**Zdolność wybranych leków i immunomodulatorów
do indukowania limfocytów T regulatorowych (Treg) człowieka
– badanie porównawcze**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Witold Lasek

Zakład Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

STRESZCZENIE

Limfocyty T regulatorowe (Treg) to subpopulacja limfocytów T CD4⁺ odpowiedzialna na supresję odpowiedzi immunologicznej. Są odpowiedzialne za utrzymywanie tolerancji na własne antygeny, hamowanie aktywności komórek autoreaktywnych, stymulację tolerancji pokarmowej, ograniczenie nadmiernej odpowiedzi komórek układu odpornościowego na patogeny oraz rozwój tolerancji immunologicznej po przeszczepieniach narządów.

Limfocyty T regulatorowe można podzielić na trzy różne populacje w zależności od powstawania. Pierwsza – to populacja limfocytów Treg, które rozwijają się w grasicy (tTreg – thymus-derived Treg), dawniej nazywane naturalnymi limfocytami T regulatorowymi (nTreg). Limfocyty T regulatorowe pochodzenia obwodowego (pTreg – peripheral Treg) stanowią populację limfocytów powstających z limfocytów T w warunkach indukcji odpowiedzi immunologicznej na obwodzie (z udziałem komórek prezentujących antygen). Trzecia populacja to limfocyty regulatorowe indukowane *in vitro* (iTreg).

Nieprawidłowa funkcja limfocytów T regulatorowych jest ważnym czynnikiem wpływającym na rozwój wielu chorób, takich jak choroby autoimmunizacyjne, alergie, nieswoiste choroby zapalne jelit i wiele innych. Dlatego podejmowanych jest wiele prób indukcji powstawania i modyfikacji aktywności tych limfocytów. Jedną z takich strategii jest stosowanie leków i immunomodulatorów do pozaustrojowej aktywacji/rozwoju limfocytów T regulatorowych tak, aby komórki te mogły być zastosowane w terapii adoptywnej. Jednym z leków oddziałujących na limfocyty Treg jest rapamycyna (sirolimus), zwyczajowo używana jako lek immunosupresyjny.

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej jest ocena wpływu wybranych immunomodulatorów i leków na aktywność indukowanych *in vitro* limfocytów T regulatorowych (iTreg). Limfocyty T regulatorowe pochodzenia grasiczego (tTreg) stanowią niewielki odsetek limfocytów T we krwi obwodowej w warunkach fizjologicznych. Z tego powodu alternatywną metodą pozyskania dużej liczby limfocytów T regulatorowych w celach terapeutycznych jest pozyskiwanie limfocytów iTreg z konwencjonalnych limfocytów CD4⁺CD25⁻ *in vitro*.

W pierwszym etapie badań opracowano metodykę otrzymywania indukowanych limfocytów T regulatorowych *in vitro* z limfocytów T CD4⁺. W

badaniach wykorzystano limfocyty T CD4⁺ separowane z zastosowaniem kolumn magnetycznych z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Otrzymane limfocyty stymulowano w obecności TGF- β kuleczkami opłaszczonymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 (CD3/CD28 microbeads).

W kolejnym etapie porównano wpływ leków i immunomodulatorów na fenotyp indukowanych limfocytów T regulatorowych w celu zoptymalizowania metodyki otrzymywania iTreg. W doświadczeniach badano działanie rapamycyny, prednizolonu, pranobeksu inozyliny, octanu glatirameru, maślanu sodu oraz atorwastatyny. W analizie cytometrycznej (FACS) wykazano, że wszystkie zastosowane leki i immunomodulatory, oprócz atorwastatyny, były efektywne w zwiększaniu liczby komórek o fenotypie limfocytów T regulatorowych (CD4⁺CD25^{high}FOXP3^{high}). Niektóre także zwiększały ekspresję FOXP3. Najsilniejszy efekt zaobserwowano w hodowlach z dodatkiem rapamycyny i prednizolonu. Z tego powodu w kolejnych etapach badań oceniano rapamycynę i prednizolon jako immunomodulatory o największym potencjale do potęgowania funkcji limfocytów iTreg.

W celu oceny aktywności otrzymanych limfocytów badano ich zdolność do hamowania proliferacji limfocytów T efektorowych CD4⁺ (responder cells) w teście reakcji komórek w mieszanej hodowli limfocytów (MLR – mixed lymphocyte reaction). Zahamowanie proliferacji oceniano poziomem syntezy DNA, mierzonym inkorporacją trytowanej tymidyny. Aktywność otrzymanych limfocytów oceniano również w teście stymulacji z CFSE. Wykazano, że prednizolon bardziej hamuje proliferację komórek efektorowych niż rapamycyna.

Dalsze badania dotyczyły zdolności do wydzielania cytokin: TGF- β , TNF- α , IL-6, IL-10 przez otrzymane indukowane limfocyty T regulatorowe. Dodatek rapamycyny do hodowli zwiększał ilość wydzielanego TNF- α , jednakże nie wpływał w sposób powtarzalny na wytwarzanie przez komórki TGF- β , IL-6 ani IL-10. W hodowlach z prednizolonem obserwowano natomiast zdecydowanie niższe ilości cytokin prozapalnych takich jak TNF- α i IL-6 w porównaniu do grupy kontrolnej.

Przeprowadzone badania pokazują, że prednizolon i rapamycyna mogą mieć zastosowanie w protokołach indukowania limfocytów T regulatorowych do użycia tych komórek w terapii adoptywnej. Badania mogą również tłumaczyć korzystne działanie badanych leków i immunomodulatorów w leczeniu niektórych chorób.