

Folia
Medica

Lodziensia

Tom 38 suplement 1

2011

Mariusz Stasiótek

Znaczenie wybranych populacji
komórek immunologicznych
w leczeniu zaostrzeń
stwardnienia rozsianego
z zastosowaniem plazmaferezy
Rozprawa habilitacyjna



Łódzkie Towarzystwo Naukowe

ŁÓDZKIE TOWARZYSTWO NAUKOWE

90-505 Łódź, ul. M. Curie-Skłodowskiej 11
tel. (42) 665-54-59; tel./fax (42) 665-54-64
E-mail: ltn@ltn.lodz.pl www.ltn.lodz.pl

Naczelna Redakcja Wydawnictw Łódzkiego Towarzystwa Naukowego
Wanda M. Krajewska, Sławomir Gala, Jan Szymczak, Edward Karasiński

ADRES REDAKTORA *Folia Medica Lodziensia*:

Zakład Neuroendokrynologii, ul. Sterlinga 3, 91-425 Łódź
tel. 42 6644302; tel./fax (42) 675-76-13; e-mail: katarzyna.winczyk@umed.lodz.pl

REDAKTOR NACZELNY (EDITOR-IN-CHIEF)

Katarzyna Winczyk

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO (ASSOCIATE EDITOR)

Jerzy Krzysztof Wranicz

SEKRETARZ REDAKCJI (EDITORIAL SECRETARY)

Karolina Beda-Maluga

SEKRETARZ TECHNICZNY (TECHNICAL SECRETARY)

Jacek Świętosławski

KOMITET NAUKOWY (SCIENTIFIC COMMITTEE)

Przewodniczący (Chairman): *Marek Pawlikowski*

Członkowie (Members): *Danuta Chlebna-Sokół (Łódź), Józef Drzewoski (Łódź),
Kazimierz Jędrzejewski (Łódź), Marcin Kamiński (Katowice),
Jarosław Kasprzak (Łódź), Radziśław Kordek (Łódź),
Kazimierz Kochman (Warszawa), Beata Kos-Kudła (Zabrze),
Jacek Kuśmierek (Łódź), Andrzej Lewiński (Łódź), Ludwik Malendowicz (Poznań),
Dariusz Nowak (Łódź), Włodzimierz Olszewski (Warszawa),
Daria Orszulak-Michalak (Łódź), Teresa Pajszczyk-Kieszkiewicz (Łódź),
Marek Paradowski (Łódź), Andrzej Radek (Łódź),
Magdalena Wochna-Sobańska (Łódź), Krzysztof Zeman (Łódź)*

PROJEKT GRAFICZNY - *Hanna Stańska*

Wydano z pomocą finansową
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Copyright by Łódzkie Towarzystwo Naukowe
Printed in Poland

Wyd. I Nakład 200 egz.

DRUK: **GRAFIX** - www.grafix-poligrafia.pl
tel./fax (42) 651-96-35 e-mail: grafix@grafix-poligrafia.pl

ISSN 0071-6731

Mariusz Stasiótek

Znaczenie wybranych populacji komórek immunologicznych
w leczeniu zaostrzeń stwardnienia rozsianego
z zastosowaniem plazmaferezy

The role of selected immune cell populations
in plasma exchange treatment of multiple sclerosis relapses

**Praca została wykonana w
Klinice Neurologii Uniwersytetu-Ruhr w Bochum, Niemcy**

**Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi**

**Łódź
2011**

Podziękowania

Od początku mojej działalności naukowej miałem możliwość i zaszczyt korzystania z wiedzy, pomocy i wzorców prezentowanych przez wybitnego naukowca i wspaniałego człowieka –

Profesora Andrzeja Lewińskiego.

Tajniki neurologii i neuroimmunologii poznawałem pod okiem znamienitego badacza i niezrównanego klinicysty –

Profesora Krzysztofa Selmaja.

W ostatnich latach moje doświadczenie badawcze zostało wzbogacone poprzez współpracę z Profesorem Ralfem Goldem.

Obecna praca nie mogłaby powstać bez życzliwości i wielokierunkowej pomocy Profesora Przemysława Oszukowskiego.

Pani Magister Joanna Kędzierska służyła radą zawsze, gdy jej potrzebowałem.

Osobom tym serdecznie dziękuję.

Spis treści

Wykaz używanych skrótów

I. WSTĘP	5
I-1. Stwardnienie rozsiane	5
I-2. Komórki prezentujące antygen	8
I-3. Regulatorowe limfocyty T CD4+CD25+FoxP3+	18
I-4. Inne komórki o znaczeniu immunoregulacyjnym	21
I-5. Leczenie rzutu stwardnienia rozsianego	21
II. CEL PRACY	31
III. MATERIAŁ I METODY	33
III-1. Pacjenci	33
III-2. Pobranie krwi obwodowej	35
III-3. Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej	36
III-4. Cytometria przepływowa	36
III-5. Charakteryzacja fenotypowa poszczególnych populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej	37
III-6. Sortowanie magnetyczne monocytów	41
III-7. Hodowle komórkowe	42
III-8. Sekrecja cytokin	43
III-9. Analiza statystyczna	44
IV. WYNIKI	45
IV-1. Wpływ plazmaferezy na dystrybucję głównych populacji limfocytarnych krwi obwodowej	45
IV-2. Wpływ plazmaferezy na strukturę populacji komórek dendrytycznych krwi obwodowej	45
IV-3. Wpływ plazmaferezy na subpopulację monocytów wykazujących ekspresję CD16	49

IV-4. Zmiany subpopulacji CD14 ^{high} CD16+ w przebiegu terapii plazmaferezą	51
IV-5. Wpływ terapii glukokortykosteroidami na obserwowane w przebiegu terapii plazmaferezą zmiany subpopulacji monocytów	51
IV-6. Zależność odpowiedzi klinicznej na terapię plazmaferezą od struktury subpopulacji monocytów krwi obwodowej	56
IV-7. Wpływ plazmaferezy na profil ekspresji powierzchniowej molekuł kostymulacyjnych <i>ex vivo</i>	59
IV-8. Wpływ plazmaferezy na ekspresję powierzchniową cząsteczek MHC klasy II <i>ex vivo</i>	63
IV-9. Wpływ plazmaferezy na generację monocytów CD16+ z monocytów CD14 ^{high} CD16- <i>in vitro</i>	70
IV-10. Profil ekspresji powierzchniowej monocytów <i>in vitro</i> w przebiegu terapii plazmaferezą	70
IV-11. Profil sekrecji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej <i>in vitro</i> w przebiegu terapii plazmaferezą	73
IV-12. Zmiany profilu sekrecji monocytów <i>in vitro</i> w przebiegu terapii plazmaferezą	75
V. DYSKUSJA	77
VI. WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE	89
VII. WNIOSKI OGÓLNE	91
VIII. SPIS PUBLIKACJI WŁASNYCH	93
IX. PIŚMIENNICTWO	95
X. STRESZCZENIE	119
XI. SUMMARY	123

Wykaz używanych skrótów

ACE	– enzym konwertujący angiotensynę (ang. <i>angiotensin converting enzyme</i>)
AP-1	– czynnik transkrypcyjny activator protein-1
APC	– komórki prezentujące antygen (ang. <i>antigen presenting cells</i>)
BDCA	– antygen komórek dendrytycznych krwi (ang. <i>Blood Dendritic Cell Antigen</i>)
CTLA	– antygen cytotoksycznego limfocyta T (ang. <i>cytotoxic T lymphocyte antigen</i>)
EAE	– eksperymentalne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (ang. <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)
EDSS	– Rozszerzona Skala Niewydolności Ruchowej (ang. <i>Expanded Disability State Scale</i>)
FcγRIII	– receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny G typu III
FoxP3	– czynnik transkrypcyjny z grupy “ <i>forkhead box</i> ” typu P3
GCS	– glukokortykosteroidy (ang. <i>glucocorticosteroids</i>)
GR	– receptor glukokortykosteroidów (ang. <i>glucocorticosteroid receptor</i>)
Hsp	– białko szoku cieplnego (ang. <i>heat shock-protein</i>)
IFN	– interferon
IL	– interleukina
komórka NK	– komórka cytotoksyczna (ang. <i>natural killer cell</i>)
komórka NKT	– limfocyt T o charakterystyce fenotypowej komórek NK (ang. <i>NK T cell</i>)
limfocyt Th	– limfocyt T pomocniczy (ang. <i>T helper</i>)
LPS	– lipopolisacharyd
MAG	– glikoproteina związana z mieliną (ang. <i>myelin associated glycoprotein</i>)

MAPK	– aktywowana mitogenem kinaza proteinowa (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MBP	– białko zasadowe mieliny (ang. <i>myelin basic protein</i>)
MHC	– główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i>)
MKP	– fosfataza MAPK (ang. <i>MAPK phosphatase</i>)
MOG	– glikoproteina mieliny i oligodendrocytów (ang. <i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>)
NF-κB	– czynnik transkrypcyjny nuclear factor- κB
OUN	– ośrodkowy układ nerwowy
PBMC	– komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	– zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PHA	– fitohemaglutynina (ang. <i>phytohemagglutinin</i>)
PLP	– białko proteolipidowe mieliny (ang. <i>myelin proteolipid protein</i>)
SM	– stwardnienie rozsiane, (łac. <i>sclerosis multiplex</i>)
PP-SM	– postać pierwotnie przewlekła (ang. <i>primary progressive</i>) SM
RR-SM	– postać rzutowo-remitująca (ang. <i>relapsing-remitting</i>) SM
SP-SM	– postać wtórnie przewlekła (ang. <i>secondary progressive</i>) SM
TcR	– receptor limfocyty T (ang. <i>T cell receptor</i>)
TGF	– transformujący czynnik wzrostu (ang. <i>transforming growth factor</i>)
TLR	– receptory z rodziny Toll (ang. <i>Toll like receptors</i>)
TNF	– czynnik martwicy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
TNFR	– receptor TNF
Tregs	– limfocyty T regulatorowe (ang. <i>regulatory T cells</i>)

I. WSTĘP

I-1. Stwardnienie rozsiane

Stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex* - SM) jest przewlekłym demielinizacyjnym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Charakterystyczne dla tej choroby rozsiane ogniska uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego stają się przyczyną różnego rodzaju i stopnia zaburzeń neurologicznych. Objawy kliniczne SM mogą występować w postaci zaostrzeń stanu neurologicznego - tzw. rzutów choroby lub w sposób przewlekłe postępujący. Postać choroby przebiegająca z ostrymi pogorszeniami nosi nazwę remitująco-rzutowego SM (ang. *relapsing-remitting SM* - RR-SM). Z biegiem czasu progresja choroby może zmienić charakter z rzutowego na przewlekłe postępujący – określane wtedy jako postać wtórnie przewlekła SM (ang. *secondary progressive SM* – SP-SM). W przypadku przewlekłego postępu objawów neurologicznych od początku choroby mamy do czynienia z tzw. pierwotnie przewlekłą postacią SM (ang. *primary progressive SM* - PP-SM). Wyróżnia się także postać przewlekłe postępującą z nakładającymi się rzutami czyli tzw. postacią rzutowo-przewlekłą SM, mogącą stanowić odrębny typ przebiegu klinicznego bądź formę przejściową pomiędzy rzutową i wtórnie przewlekłą postacią SM. W zależności od nasilenia i tempa progresji choroby, we wszystkich z wymienionych typów przebiegu klinicznego SM może dojść z czasem do bardzo nasilonych deficytów neurologicznych, prowadzących niejednokrotnie do znacznego ograniczenia funkcjonowania pacjenta i obniżenia komfortu życia [1].

Etiopatogeneza SM stała się tematem wieloletnich dociekań naukowych, których wyniki wskazują na zaburzenia autoagresyjne jako podłoże zmian demielinizacyjnych zachodzących w OUN [2-4]. Wykładnikiem patomorfologicznym toczącego się procesu chorobowego jest ogniskowe uszkodzenie

osłonek mielinowych z towarzyszącym naciekiem zapalnym nazywane ze względu na swoją makroskopową charakterystykę, plaką demielinizacyjną [5]. Szczegółowe badania immunopatologiczne umożliwiły podział aktywnych plak demielinizacyjnych na kilka odrębnych podtypów charakteryzujących się odmiennymi cechami akumulacji komórkowych i humoralnych elementów układu immunologicznego oraz zróżnicowanymi zmianami demielinizacyjnymi [6]. Odmiennie wzorce demielinizacji i remielinizacji struktur OUN opisywano również w zależności od przebiegu klinicznego SM [7]. Poza destrukcją osłonek mielinowych, w ogniskach chorobowych SM stwierdzono również istotne uszkodzenia aksonalne, a stopień zaawansowania tych zmian sugerowany jest jako jeden z głównych korelatów morfologicznych nasilenia niepełnosprawności w przebiegu SM [8, 9]. W ostatnich latach wzajemne interakcje pomiędzy procesem zapalnym i zmianami degeneracyjnymi aksonów i komórek nerwowych w SM stały się punktem ożywionej dyskusji naukowej [10]. Jednakże, wyniki najnowszych badań wydają się potwierdzać pierwotną rolę reakcji immunologicznej w kaskadzie procesów patologicznych prowadzących do rozwoju tej choroby [11, 12]. Obserwacje poczynione na poziomie komórkowym, sugerują oligodendrocyt i formowaną przez niego osłonkę mielinową jako źródło autoantygenów stymulujących reakcję autoagresyjną w SM [13]. Białka mieliny stwierdzano w ziarnistościach komórek fagocytarnych obecnych w obrębie aktywnych ognisk demielinizacyjnych [6]. W warunkach laboratoryjnych wykazano znaczną immunogenność cząsteczek z tej grupy. Dotyczy to m.in. białka zasadowego mieliny (ang. *myelin basic protein* - MBP), białka proteolipidowego mieliny (ang. *myelin proteolipid protein* - PLP), glikoproteiny związanej z mieliną (ang. *myelin associated glycoprotein* - MAG), glikoproteiny mieliny i oligodendrocytów (ang. *myelin oligodendrocyte glycoprotein* - MOG) oraz $\alpha\beta$ -krystaliny [14-18].

Dalszym doświadczalnym potwierdzeniem powyższych założeń jest eksperymentalne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis* - EAE), Choroba ta, wywoływana u zwierząt laboratoryjnych poprzez immunizację niektórymi z białek mieliny (np. MBP,

PLP, MOG), cechuje się występowaniem zespołu objawów neurologicznych, na który składają się m.in. niedowłady mięśni, zaburzenia równowagi, a także zmiany zachowania odpowiadające stanom depresyjnym i lękowym. W zależności od protokołu immunizacji i użytego szczepu zwierząt laboratoryjnych, objawy EAE mogą przebiegać w sposób ostry - jednofazowy lub - przewlekły - z rzutami i remisjami [19, 20]. Podłożem histopatologicznym objawów klinicznych EAE są rozsiane w OUN ogniska zapalnej demielinizacji oraz uszkodzenia aksonalnego [13, 21, 22]. Ze względu na przypominającą SM charakterystykę kliniczną i patologiczną, EAE uważane jest za najlepszy dostępny model zwierzęcy tej choroby [4, 23]. Badania eksperymentalne, przeprowadzone z użyciem EAE, wykazały zaangażowanie w fazie efektorowej procesu autoimmunologicznej demielinizacji specyficznych dla antygenów mielinowych limfocytów pomocniczych T typu 1 (ang. *T helper type 1*, Th1), charakteryzujących się prozapalnym profilem sekrecji cytokin (m.in. IL-2, IFN- γ) [24-27]. Jako przyczynę ekspansji autoreaktywnych limfocytów Th1 sugerowano zaburzenie równowagi pomiędzy mediowaną przez te komórki odpowiedzią zapalną typu 1 oraz odpowiedzią typu 2, zależną od limfocytów Th2 wydzielających preferencyjnie cytokiny o działaniu przeciwzapalnym lub regulacyjnym (m.in. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) [28, 29]. Obraz ten uległ w ostatnich latach komplikacji, ze względu na opisanie nowego typu komórkowej odpowiedzi immunologicznej, związanej z limfocytami Th wydzielającymi IL-17 (limfocyty Th17) [30]. W krótkim czasie wykazano kluczowe znaczenie tych komórek w schorzeniach o podłożu autoimmunologicznym, w tym w patogenezie EAE, podważając tym samym pierwszorzędną rolę limfocytów Th1 [31, 32]. Jednakże wyniki najnowszych badań, prowadzonych w warunkach eksperymentalnych z zastosowaniem EAE [33, 34], jak i obserwacje poczynione u pacjentów z SM [35-37], sugerują zaangażowanie w fazę efektorową procesu patologicznego obu tych populacji komórek prozapalnych, podkreślając istotne znaczenie interakcji pomiędzy limfocytami Th1 i Th17 w autoimmunologicznych schorzeniach OUN.

Znaczącą rolę w patogenezie SM wydają się również odgrywać elementy humoralnego układu odpornościowego [38]. W płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów stwierdza się lokalną produkcję immunoglobulin oraz klonalną ekspansję limfocytów B [39, 40]. Przeciwciała przeciwko antygenom mielino- wym obserwowane były w surowicy chorych na SM, a ich obecność we wczes- nej fazie choroby sugerowana była jako jeden z czynników diagnostyczno- prognostycznych [41].

Dla zrozumienia stwierdzanych w SM i EAE zaburzeń immunologicznych ogromne znaczenie ma fakt, iż autoreaktywne limfocyty T, specyficzne dla antygenów mieliny, są normalną składową układu odpornościowego u ludzi zdrowych, nie wykazujących żadnych cech autoimmunologicznej demielinizacji [42]. Ze względu na tak złożony i heterogenny obraz immuno- patologii SM, sugeruje się obecność w tej chorobie nieprawidłowości na poziomie immunoregulacyjnym, mogących być wynikiem zaburzeń funkcji oraz wzajemnych interakcji wielu zróżnicowanych składników komórkowych układu odpornościowego, a zwłaszcza: komórek prezentujących antygen i regulatoro- wych limfocytów T (ang. *regulatory T cells* - Tregs) [43-48].

I-2. Komórki prezentujące antygen

Komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells* - APC) stanowią zróżnicowaną populację komórek, których wspólną cechą jest zdolność do wychwytywania, obróbki i prezentacji antygeny specyficznym limfocytom w kontekście cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex* - MHC). Poza grupą tzw. profesjonalnych APC, obejmującą komórki dendrytyczne, monocyty oraz limfocyty B, zdolność do prezentacji antygeny stwierdzono – w specyficznych warunkach – również w przypadku komórek śródbłonna naczyń, fibroblastów, a także astrocytów [49-51]. Ze względu na ich potencjalnie bardzo istotną rolę w procesach immunoregulacyjnych wiodących do demielinizacji OUN oraz ściśle wzajemne

zależności, w opracowaniu tym podczas analizy APC, zwrócono szczególną uwagę na komórki dendrytyczne i monocyty.

Komórki dendrytyczne. Komórki dendrytyczne uważane są za jedno z najważniejszych ogniw łączących wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną. Dzięki ekspresji powierzchniowej szerokiego spektrum receptorów rozpoznających składniki organizmów patogennych (ang. *pattern recognition receptors* - PRR m.in. *toll like receptors* - TLR), komórki dendrytyczne są w stanie w sposób bezpośredni reagować na sygnały zagrożenia związane z infekcją i w ten sposób wpływać na charakter, nasilenie i przebieg nieswoistej reakcji immunologicznej [52, 53]. Jako najbardziej efektywne APC, komórki dendrytyczne pełnią również rolę kluczowego ogniwa regulacyjnego nabytej odpowiedzi immunologicznej, łącząc w ten sposób oba główne ramiona układu odpornościowego. Wyjątkową cechą komórek dendrytycznych jest rozbudowana zdolność do aktywacji i różnicowania naiwnych limfocytów T i B, co kształtuje charakter pierwotnej odpowiedzi immunologicznej [54, 55]. Dodatkowo, komórki dendrytyczne są zdolne do prezentacji obcych antygenów zarówno w kontekście cząsteczek MHC klasy II jak i cząsteczek MHC klasy I. Proces ten, nazywany „prezentacją krzyżową” umożliwia reakcję odpornościową przeciwko pozyskiwanym z martwych komórek antygenom wirusowym i nowotworowym („aktywacja krzyżowa”), jak również warunkuje powstawanie i utrzymywanie tolerancji obwodowej wobec antygenów własnych („tolerancja krzyżowa”) [56]. Komórki dendrytyczne biorą również udział w powstawaniu tolerancji centralnej, poprzez wykrywanie i delecję autoreaktywnych tymocytów w procesie selekcji negatywnej, zachodzącej w grasicy [57]. Działanie immunoregulacyjne, wywierane przez komórkę dendrytyczną, jest zależne od wielu czynników, do których należą: mikrośrodowisko reakcji immunologicznej, interakcja z innymi komórkami immunologicznymi, a także stopień dojrzewania i podtyp komórki dendrytycznej. We krwi obwodowej człowieka występują dwa podstawowe podtypy komórek dendrytycznych – mieloidalny i plazmacytoidalny. Podtypy te różnią się pochodzeniem (odpowiednio mieloidalna i limfoidalna linia

różnicowania), a także reakcją na czynniki infekcyjne, zdolnością prezentacji antygenów, profilem wydzielania cytokin oraz rodzajem mediowanej przez nie odpowiedzi immunologicznej. Mieloidalne komórki dendrytyczne stają się, pod wpływem aktywacji, wydajnym źródłem IL-12 oraz IL-23, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju reakcji immunologicznej zależnej od limfocytów Th1 i Th17 [58, 59]. Plazmacytoidalne komórki dendrytyczne charakteryzują się natomiast zdolnością do wyjątkowo wysokiej produkcji interferonów typu I oraz znacznie mniejszą od mieloidalnych komórek dendrytycznych sekrecją IL-12. Temu profilowi wydzielniczemu towarzyszy skłonność do indukcji odpowiedzi immunologicznej związanej z limfocytami Th2 i komórkami regulatorowymi [60-62].

Niedawno, na podstawie nowo opisanych - specyficznych dla komórek dendrytycznych krwi obwodowej antygenów (ang. *blood dendritic cell antigen - BDCA*) obejmujących cząsteczki CD1c (BDCA1), CD303 (BDCA2), CD141 (BDCA3) oraz CD304 (BDCA4), populację krążących we krwi komórek dendrytycznych podzielono na trzy podtypy – jeden z nich CD303+ odpowiada plazmacytoidalnym komórkom dendrytycznym, a dwa pozostałe: CD1c+ i CD141+ składają się na frakcję komórek dendrytycznych mieloidalnych [63].

Zaangażowanie komórek dendrytycznych w regulację procesu demielinizacji zapalnej zostało wykazane w licznych pracach z wykorzystaniem EAE. Komórki dendrytyczne okazały się bardzo efektywnymi aktywatorami encefalitogennych limfocytów T. Co więcej, przeszczep komórek dendrytycznych, inkubowanych uprzednio z immunogennymi peptydami mieliny, wywoływał EAE u zwierząt nie poddanych aktywnej immunizacji [64, 65]. W naturalnym przebiegu EAE, akumulacja i stan dojrzewania komórek dendrytycznych w OUN zwierząt doświadczalnych korelowały z przebiegiem klinicznym choroby [66]. Z drugiej strony, w zależności od zastosowanych warunków eksperymentalnych, komórki dendrytyczne prezentujące antygeny mielinowe wykazywały również korzystny wpływ na przebieg kliniczny EAE [67, 68]. Co więcej, różne podtypy komórek dendrytycznych wywierały

przeciwstawne lub wzajemnie ograniczające efekty na reakcję autoimmunologiczną w EAE [69, 70].

Dane pochodzące od pacjentów z SM wydają się potwierdzać istotną rolę komórek dendrytycznych w patogenezie tej choroby. Przeprowadzona przez autora tego opracowania fenotypowa i funkcjonalna analiza podtypów komórek dendrytycznych krwi obwodowej, wykazała u pacjentów z RR-SM obecność wielopoziomowych nieprawidłowości plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych, objawiających się niedojrzałym profilem ekspresji molekuł kostymulacyjnych *ex vivo* oraz zaburzeniem procesu dojrzewania i obniżeniem zdolności immunoregulacyjnych tych komórek w warunkach *in vitro* [43]. W dalszej części eksperymentów stwierdzono, iż dysfunkcja plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych w SM obejmuje także nieprawidłowości ekspresji receptorów z grupy TLR oraz sekrecji interferonu (IFN)- α w odpowiedzi na bodźce patogenne [44]. U pacjentów z RR-SM opisywano również nieprawidłowości w strukturze populacji komórek dendrytycznych, których wynikiem było przesunięcie równowagi immunologicznej w stronę reakcji prozapalnej [71]. Także w postaci przewlekłej SM obserwowano niedojrzały profil fenotypowy komórek dendrytycznych krwi obwodowej [72]. Obecność komórek dendrytycznych stwierdzano ponadto w płynie mózgowo rdzeniowym pacjentów z SM [73], a ich zwiększoną akumulację obserwowano w trakcie rzutu choroby [74]. Również wyniki badań histopatologicznych sugerują aktywną rolę komórek dendrytycznych w regulacji lokalnego procesu autoimmunologicznego w OUN pacjentów z SM [75]. Znaczenie funkcjonalne wspomnianych nieprawidłowości komórek dendrytycznych potwierdzają obserwacje na temat korekcji tych zaburzeń w przebiegu leczenia pacjentów z SM za pomocą octanu glatirameru [43]. Zmiany w populacji komórek dendrytycznych stwierdzano ponadto w trakcie terapii preparatami IFN- β [76] oraz podczas podawania glukokortykosteroidów (ang. *glucocorticosteroids* – GCS) w rzucie choroby [77].

Monocyty. Monocyty krwi obwodowej ustępują komórkom dendrytycznym pod względem efektywności prezentacji antygeny oraz interakcji z komórkami

efektorowymi. Monocyty nie są też typowo zaangażowane w inicjowanie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej ani w proces prezentacji krzyżowej [78]. Jednakże, komórki te uważane są za bardzo istotny element układu odpornościowego, nie tylko jako APC warunkujące w dużej mierze przebieg wtórnej reakcji immunologicznej, ale również jako źródło wielu cytokin prozapalnych takich jak IL-1, IL-6 czy czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor- α* - TNF- α). Co istotne, aktywność monocytów uzależniona jest od równowagi pomiędzy obecnymi w mikrośrodkowisku cytokinami o działaniu hamującym np.: IL-4, IL-10, transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor- β* - TGF- β) a czynnikami pobudzającymi takimi jak IFN- γ lub substancje pochodzenia bakteryjnego, rozpoznawane przez receptory z rodziny TLR np. lipopolisacharyd (LPS) [79-82]. Olbrzymie znaczenie dla funkcji monocytów ma również bezpośredni kontakt z komórkami efektorowymi, w którego przebieg zaangażowane są m.in. związane z błoną komórkową molekuly z nadrodziny TNF [83, 84]. Dodatkowo, ze względu na ich zdolność do przechowywania pochłoniętego antygeny, monocyty uważane są za komórki mogące brać udział w transporcie specyficznych tkankowo antygenów do centralnych organów limfatycznych [78, 85].

Na właściwości funkcjonalne monocytów istotny wpływ ma niejednorodność ich populacji. Pośród zaproponowanych do tej pory sposobów klasyfikacji monocytów na odmienne subpopulacje, najbardziej ugruntowany wydaje się podział uwzględniający intensywność ekspresji powierzchniowej molekuly CD14 (specyficznego dla całej populacji monocytów receptora LPS) oraz obecność na powierzchni komórki molekuly CD16, będącej receptorem dla fragmentu Fc immunoglobuliny G typu III (Fc γ RIII) [86]. Na podstawie tych parametrów, monocyty podzielono na główną – „klasyczną” – frakcję o bardzo wysokiej ekspresji CD14, charakteryzującą się brakiem ekspresji CD16 (CD14^{high}CD16-) oraz znacznie mniejszą subpopulację cechującą się niskim do pośredniego stopniem ekspresji CD14 oraz wysoką ekspresją powierzchniową CD16 (CD14^{low}CD16+) [87, 88]. Ze względu na przypominający makrofagi profil ekspresji molekuł powierzchniowych [88] oraz możliwość otrzymania tej

populacji *de novo* z „klasycznych” monocytów CD14^{high}CD16⁻ w warunkach hodowli *in vitro*, subpopulację CD14^{low}CD16⁺ uważa się za monocyty o wyższym stopniu dojrzałości [89]. Ostatnio opisano kolejną subpopulację monocytów wykazujących ekspresję molekuly CD16 [90, 91]. W odróżnieniu od monocytów CD14^{low}CD16⁺, komórki te posiadają porównywalną z „klasycznymi” monocytami wysoką ekspresję CD14, co nadaje im łącznie charakterystykę fenotypową CD14^{high}CD16⁺.

Proces różnicowania się monocytów w wyniku migracji do tkanek narządów obwodowych objętych procesem zapalnym jest kolejną bardzo ważną właściwością tej populacji komórkowej. Podczas ekstrawazacji, pod wpływem kontaktu z komórkami śródbłonna oraz czynnikami lokalnej reakcji immunologicznej, monocyty różnicują się do makrofagów lub komórek dendrytycznych o mieloidalnym charakterze [92-95]. Zjawisko to ma szczególne znaczenie w świetle wyników badań immunopatologicznych przeprowadzonych na materiale pozyskanym od pacjentów z SM. Zgodnie ze wspomnianymi wcześniej pracami, naciek komórek monocytarno-makrofagalnych jest stałym elementem wszystkich z opisanych wzorców aktywnych ognisk demielinizacyjnych [5, 6]. Również mieloidalne komórki dendrytyczne, reprezentujące różne etapy dojrzewania, wydają się być typowym składnikiem aktywnych zmian chorobowych w SM oraz w EAE [66, 75]. W badaniach doświadczalnych z zastosowaniem komórek ludzkiego śródbłonna bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier* - BBB) stwierdzono, iż subpopulacja prozapalnych monocytów krwi obwodowej wykazywała szczególnie nasiloną tendencję do migracji przez warstwę komórek endotelium. W wyniku tego procesu, migrujące monocyty nabierały cech fenotypowych mieloidalnych komórek dendrytycznych, które w kolejnych eksperymentach promowały ekspansję prozapalnych limfocytów Th1 oraz Th17 [95]. Potwierdzeniem znaczenia monocytów w procesie autoimmunologicznej demielinizacji są również badania wskazujące na złożoną kinetykę akumulacji prozapalnych i supresyjnych subpopulacji monocytów w OUN zwierząt laboratoryjnych, u których wywołano EAE [96-99].

Poza wynikami badań histopatologicznych, istotne są również obserwacje dokonane w trakcie analizy fenotypu i funkcji monocytów krwi obwodowej pacjentów z SM. Po inkubacji z antygenami mieliny, komórki te okazały się efektywnymi stymulatorami specyficznymi dla antygenów mielinowych auto-reaktywnych limfocytów T pamięci [100]. Nieprawidłowości ekspresji molekuł o charakterze immunoregulacyjnym na monocytach krwi obwodowej stwierdzano u pacjentów z RR-SM, zarówno w trakcie remisji choroby jak i podczas ostrego pogorszenia objawów neurologicznych [101, 102]. Ponadto, liczne badania nad mechanizmem działania leków immunomodulacyjnych w SM sugerują nasilenie procesu apoptozy monocytów [102], jak również zmianę profilu ekspresji molekuł immunoregulacyjnych [101, 102], adhezyjnych [104] oraz kostymulacyjnych [105], a także modulację profilu sekrecji monocytów [106, 107] jako korelat pozytywnej odpowiedzi klinicznej na terapię.

Zwiększoną sekrecję interferonów klasy I przez te komórki sugerowano natomiast jako marker oporności na terapię IFN- β w SM [108].

Wiedzę o znaczeniu monocytów w immunopatologii SM poszerzają prace analizujące funkcję komórek dendrytycznych pozyskiwanych w warunkach doświadczalnych z monocytów krwi obwodowej. W badaniach tych stwierdzono, że komórki dendrytyczne, różnicowane *in vitro* z monocytów uzyskanych od pacjentów z SM, charakteryzują się zaburzoną ekspresją molekuł kostymulacyjnych oraz skłonnością do indukcji prozapalnej odpowiedzi immunologicznej [109, 110]. Co ważne, również i w tym przypadku stwierdzone nieprawidłowości ulegały częściowej korekcji u pacjentów poddawanych terapii immunomodulacyjnej [111-113].

Powierzchniowe molekuły immunoregulacyjne. Ekspresja powierzchniowa wiążących antygen cząsteczek MHC umożliwia komórkom z grupy APC antygenowo specyficzną aktywację limfocytów T. Jednakże, przebieg tej interakcji zależy w znacznym stopniu od ekspresji na powierzchni APC szeregu molekuł, które w wyniku oddziaływania z odpowiednimi ligandami lub receptorami na powierzchni limfocytów, wpływają na funkcję obu typów

komórek, a w konsekwencji również na rodzaj, nasilenie i ostateczny wynik promowanej odpowiedzi immunologicznej. Pośród licznej grupy cząsteczek zaangażowanych w to zjawisko (nazywane procesem przekazywania drugiego sygnału lub kostymulacją), na szczególną uwagę zasługuje m.in. molekula CD83, uważana za marker dojrzewania komórek dendrytycznych, jak również cząsteczki CD80 i CD86 oraz CD40 należące do dwóch podstawowych grup molekuł kostymulacyjnych (odpowiednio: rodziny B7 oraz nadrodziny TNF).

CD83. Cząsteczka CD83 jest glikoproteiną należącą do rodziny molekuł o budowie immunoglobulinowej [114]. Ekspresja CD83 na powierzchni komórek dendrytycznych koreluje ze wzrostem ekspresji cząsteczek MHC klasy II i jest uważana powszechnie za znacznik dojrzałości komórki dendrytycznej [115]. Jednakże, molekula ta ulega ekspresji również na wybranych subpopulacjach limfocytów B i T, a jej obecność stwierdzano także na aktywowanych neutrofilach [116-118]. Oprócz formy powierzchniowej CD83 opisano również tzw. formę rozpuszczalną tego białka [119]. Jest ona produkowana poprzez uwalnianie, związanej z powierzchnią komórki, cząsteczki CD83, a natężenie tego procesu jest skorelowane z poziomem ekspresji powierzchniowej CD83. Nieliczne przeprowadzone do tej pory badania wskazują, że CD83 może wchodzić w interakcję z bliżej niescharakteryzowanym ligandem na monocytach oraz na aktywowanych limfocytach T CD8⁺ i CD4⁺ [120-122]. Wykazano również, że zewnątrzkomórkowa część CD83 wiąże niedojrzałe i dojrzałe komórki dendrytyczne [123]. Chociaż oddziaływanie to nie jest dostatecznie zbadane, poprzez interakcję ze swoim ligandem, CD83 najprawdopodobniej bierze udział w regulacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Odbywa się to częściowo na poziomie komórki dendrytycznej, poprzez zahamowanie ekspresji CD80 i CD83 w trakcie dojrzewania [123]. Poza tym CD83 może wpływać zarówno hamująco jak i aktywująco na proliferację limfocytów T w hodowli, a także zmieniać proporcje pomiędzy poszczególnymi ich populacjami [121, 123]. Co istotne, ekspresja CD83 na APC wydaje się warunkować prawidłowy przebieg

antygenowo specyficznej aktywacji naiwnych limfocytów T CD8+ [122]. Badania na zwierzętach doświadczalnych, obejmujące m.in. szczep myszy pozbawionych w wyniku mutacji genetycznej ekspresji CD83 (CD83^{-/-}) wykazały, że cząsteczka ta ulega ekspresji również na komórkach śródbłonna grasicy oraz rezydujących tam komórkach dendrytycznych i jest istotnym elementem właściwego procesu dojrzewania limfocytów T [124, 125]. Deficyt ekspresji CD83 na dojrzałych komórkach dendrytycznych u pacjentów z zespołem Wiskott-Aldrich (ang. *Wiskott-Aldrich Syndrome* - WAS) sugerowany był jako jeden z mechanizmów warunkujących postępujące zaburzenia funkcji immunologicznych w tym schorzeniu [126].

Rodzina B7. Rodzina B7 obejmuje stale rosnącą grupę cząsteczek powierzchniowych, charakteryzujących się podobieństwem strukturalnym oraz zaangażowaniem w proces kostymulacji limfocytów [127, 128]. Najlepiej poznanymi członkami tej rodziny są cząsteczki CD80 (B7.1) oraz CD86 (B7.2). Ulegają one ekspresji prawie wyłącznie na elementach układu odpornościowego, a zwłaszcza na APC – komórkach dendrytycznych, monocytach, makrofagach, limfocytach B [129]. Podczas, gdy niski poziom ekspresji CD86 utrzymywany jest na APC konstytutywnie i wzrasta po aktywacji w przeciągu kilku godzin, CD80 jest nieobecny na komórkach spoczynkowych, a jego ekspresja wzrasta znacznie wolniej – w przeciągu godzin i dni od otrzymania bodźca aktywującego. Szczególne znaczenie CD80 i CD86 w procesie prezentacji antygeny wynika z faktu, że są one ligandami dla podstawowych molekuł kostymulacyjnych limfocyty T – CD28 i CD152, czyli antygeny cytotoksycznego limfocyty T (ang. *cytotoxic T lymphocyte antigen* - CTLA)-4. Ligacja CD28 spełnia bardzo istotną rolę w biologii limfocyty T. Dostarczany w ten sposób sygnał wpływa na pobudliwość komórki, nasila produkcję cytokin, zwiększa zdolność komórki do adhezji, ułatwia tworzenie synapsy immunologicznej oraz zapobiega anergii i apoptozie [129, 130]. Drugi z receptorów – CD152, w odróżnieniu od konstytutywnego CD28, pojawia się na powierzchni limfocyty T dopiero po aktywacji komórki [131]. Wiąże on CD80 i CD86 ze

znacznie większym powinowactwem niż CD28 i pełni rolę inhibitora dróg przekazywania uruchamianych przez CD28 i receptor limfocyta T (ang. *T cell receptor* - TcR) [132]. Sugeruje się również, że oddziaływanie CD152 ze swoimi ligandami może być jednym z mechanizmów powstawania tolerancji obwodowej [133]. Różna funkcja oraz czasowy wzorzec ekspresji poszczególnych składników układu CD80/CD86 - CD28/CD152 stwarza bardzo duże możliwości regulacyjne. Częsteczka CD86 wydaje się być bardziej istotna w trakcie początkowej stymulacji, podczas gdy molekula CD80 pełni rolę w utrzymywaniu zainicjowanej wcześniej aktywacji limfocytów. Podobnie częsteczka CD28, niezbędna początkowo dla prawidłowego przebiegu inicjacji odpowiedzi immunologicznej, w późniejszej fazie zostaje zastąpiona przez ograniczającą reakcję zapalną molekulę CD152.

Nadrodzina TNF. Częsteczki z rodzin TNF i receptora TNF (TNFR) tworzą wspólnie nadrodzinę receptorów i odpowiadających im ligandów. Członkowie rodziny TNFR wykazują podobieństwo domen zewnątrzkomórkowych, jednakże takiego podobieństwa nie stwierdza się w przypadku domen cytoplazmatycznych. Odmiennosc wewnątrzkomórkowych odcinków receptorów umożliwia znaczne zróżnicowanie pełnionych funkcji [134]. Część spośród tej dużej grupy receptorów i ligandów pełni bardzo istotną rolę w kontakcie pomiędzy APC a komórkami efektorowymi. Do tej podgrupy należy m.in. ulegający ekspresji na APC receptor CD40 i jego ligand CD154 [135]. CD40 jest molekulą powierzchniową należącą do rodziny TNFR. Ulega ona ekspresji m.in. na limfocytach B, komórkach dendrytycznych, monocytach, aktywowanych makrofagach, limfocytach T, eozynofilach, a także na komórkach śródbłonna naczyń, nabłonka grasicy i nerek. Z bardzo szerokim rozpowszechnieniem CD40 kontrastuje ekspresja ligandu tego receptora – CD154. Obecność tej częsteczki stwierdza się przede wszystkim na aktywowanych limfocytach T, aczkolwiek jej ekspresję obserwowano także m.in. na aktywowanych limfocytach B i komórkach dendrytycznych [136, 137]. Molekula CD40 ulegająca ekspresji na APC spełnia jedną z kluczowych ról w odpowiedzi

immunologicznej. Ligacja tego receptora przez CD154 obecne na powierzchni limfocyty T, jest bardzo ważnym momentem w procesie aktywacji limfocytów specyficznych dla prezentowanego antygeny. APC w wyniku wspomnianej interakcji nasila produkcję cytokin oraz zwiększa ekspresję molekuł adhezyjnych i kostymulacyjnych (w tym CD80 i CD86) [138, 139]. W konsekwencji dzięki pobudzeniu receptora CD40 wzrasta znacznie efektywność prezentacji antygeny oraz procesu kostymulacji. Zaburzenie tej interakcji np. w przypadku interakcji APC z anergicznymi limfocytami T, cechującymi się obniżoną ekspresją CD154, może prowadzić do zaburzeń aktywacji oraz apoptozy APC [140]. Znaczenie funkcjonalne układu CD40/CD154 podkreślają badania nad tzw. „Zespołem Hiper – IgM”, będącym wynikiem mutacji genu CD154. Schorzenie to objawia się niedoborem odporności polegającym na ciężkim uszkodzeniu odpowiedzi humoralnej zależnej od limfocytów T, brakiem limfocytów B pamięci i niedoborem produkcji immunoglobulin klasy IgG, IgA i IgE [141]. W sytuacji przeciwnej - u zwierząt doświadczalnych ze zwiększoną, w wyniku manipulacji genetycznej, ekspresją CD154, dochodzi do przewlekłych stanów zapalnych i do ogólnoustrojowych reakcji autoimmunologicznych [142].

I-3. Regulatorowe limfocyty T CD4+CD25+FoxP3+

Limfocyty T pełniące funkcje immunoregulacyjne stanowią heterogenną i ciągle poszerzaną grupę komórek, obejmującą m. in.: wydzielające IL-10 limfocyty regulatorowe typu 1 (Tr1) [143], limfocyty Th3 produkujące TGF- β [144] oraz regulatorowe limfocyty T CD8+ [145]. Badania ostatnich lat dowodzą jednakże, iż najważniejszą rolę w tej grupie komórek immunologicznych pełnią limfocyty T CD4+ charakteryzujące się wysoką ekspresją powierzchniową receptora IL-2 (CD25) oraz obecnością czynnika transkrypcyjnego z grupy „*forkhead box*” typu P3 (FoxP3) czyli regulatorowe limfocyty T CD4+CD25+FoxP3+ (*Tregs*) [146].

Znaczna część komórek tworzących populację Tregs pochodzi bezpośrednio z grasicy, gdzie komórki te podlegają selekcji uwarunkowanej powinowactwem ich TcR do prezentowanych antygenów [147]. Istotne znaczenie w tym procesie ma również IL-2, której działanie warunkuje powstawanie i ekspansję Tregs od najwcześniejszych etapów ich rozwoju [148, 149]. Pochodzące z grasicy Tregs nazywane są naturalnymi (ang. *natural Tregs* - nTregs), w odróżnieniu od generowanych w obrębie obwodowego układu immunologicznego Tregs adaptacyjnych lub indukowalnych (ang. *adaptive/inducible Tregs* - iTregs). Indukowalne Tregs powstają z prekursorowych limfocytów CD4+CD25- pod wpływem specyficznej aktywacji antygenowej, w warunkach stymulacji cytokinami immunoregulacyjnymi takimi jak: TGF- β , IL-10 i IL-4 [146, 150, 151]. Co ważne, dane eksperymentalne wskazują na istotną rolę prezentujących antygen komórek dendrytycznych w ekspansji zarówno naturalnych jak i indukowalnych Tregs [152, 153].

Supresja reakcji immunologicznej mediowana przez Tregs wymaga specyficznej antygenowo aktywacji tych komórek [154, 155]. Uważa się, że Tregs najwydajniej hamują komórki efektorowe specyficzne dla tego samego antygeny, aczkolwiek istnieją również prace wskazujące na regulowanie przez Tregs odpowiedzi zapalnej mediowanej przez limfocyty Th o odmiennej specyficzności antygenowej [156-158].

Repertuar TcR komórek Tregs jest zbliżony do normalnego repertuaru limfocytów T i obejmuje zarówno antygeny obce jak i własne [159-161]. Umożliwia to udział Tregs zarówno w regulacji odpowiedzi obronnej organizmu przeciwko różnego rodzaju patogenom [162], jak i w indukcji matczynej tolerancji płodu [163] oraz kontroli reakcji alergicznych [164] i auto-agresyjnych [158, 165].

Opisano kilka możliwych mechanizmów efektu immunoregulacyjnego wywieranego przez Tregs [150]. Pierwszym z nich jest efekt metaboliczny polegający na wychwytywaniu przez Tregs IL-2 i tym samym zubażaniu środowiska reakcji immunologicznej w ten kluczowy czynnik aktywujący komórki efektorowe [166]. Kolejny mechanizm opiera się na bezpośrednim

kontakcie Tregs z komórkami immunologicznymi, a zwłaszcza z APC, w wyniku którego dochodzi do wiązania hamujących molekuł Tregs z ich ligandami i receptorami, a w dalszej kolejności do supresji procesu kostymulacji. Do grupy tego typu molekuł ulegających ekspresji na Tregs należą między innymi CTLA-4/CD152 i białko genu aktywacji limfocytów 3 (ang. *lymphocyte activation gene-3* - LAG-3) [167, 168]. Efekt regulacyjny może być również osiągnięty za pomocą wydzielanych przez Tregs czynników humoralnych, takich jak TGF- β czy IL-10 [169]. Dodatkowo, Tregs mogą również eliminować komórki efektorowe w mechanizmie cytotoksycznym zależnym od granzymu A i perforyny [170].

Specyficzny antygenowo, korzystny wpływ Tregs na proces auto-immunologicznej demielinizacji wykazano w EAE z zastosowaniem różnych peptydów immunogennych [157, 171]. Zmiany liczebności oraz właściwości funkcjonalnych Tregs sugerowano także jako mechanizm działania licznych substancji modulujących przebieg kliniczny EAE, włączając w to czynniki wzrostowe, immunoglobuliny oraz cząsteczki o aktywności hormonalnej [172-176]. W odróżnieniu od EAE, rola Tregs w immunopatogenezie SM nie została dotychczas dobrze zrozumiana. Częstość występowania Tregs we krwi obwodowej pacjentów z RR-SM była opisywana jako obniżona [177-179] lub niezmienną w porównaniu z osobami zdrowymi [43, 180, 181]. Istotnym jest, iż w niektórych pracach wyniki oceny ilościowej Tregs we krwi obwodowej pacjentów z SM były zależne od zastosowanych kryteriów profilu ekspresji specyficznych dla Tregs molekuł zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych [182, 183]. Jednak niemalże wszystkie badania nad właściwościami immunomodulacyjnymi Tregs sugerują obecność złożonych zaburzeń funkcjonalnych tych komórek u pacjentów cierpiących na SM [179, 181, 183-185], a nieprawidłowości te wydają się być zależne od postaci przebiegu klinicznego choroby [178, 180, 186]. We własnych doświadczeniach autora tego opracowania, u pacjentów z RR-SM obserwowano zaburzenia interakcji pomiędzy Tregs i plazmacytoidalnymi komórkami dendrytycznymi [43]. Co ciekawe, niektóre z leków, wykazujących skuteczność kliniczną w SM, wpływają modulująco na

funkcję Tregs w tej chorobie, co może dodatkowo potwierdzać znaczenie funkcjonalne obserwowanych nieprawidłowości [177, 178, 186, 187].

I-4. Inne komórki o znaczeniu immunoregulacyjnym

Obok wymienionych komórek układu odpornościowego, w patogenezie SM istotne znaczenie mogą mieć również zaburzenia funkcji innych populacji komórek immunologicznych, do których należą m. in. naturalne komórki cytotoksyczne (ang. *natural killer cells* – komórki NK), czy też limfocyty T o charakterystyce fenotypowej komórek NK (ang. *NK T cells* - komórki NKT) [45-48]. Podobnie, składniki lokalnego mikrośrodowiska OUN, takie jak komórki mikrogleju [188, 189], czy astrocyty [190, 191] są z dużym prawdopodobieństwem zaangażowane w złożone procesy immunopatologiczne warunkujące rozwój SM. Co więcej, ostatnie doniesienia sugerują podobną rolę także w przypadku neuronów korowych OUN, które w preparatach histopatologicznych pozyskanych od pacjentów z SM wykazywały zarówno ekspresję IL-21 jak i receptora tej prozapalnej cytokiny [192].

I-5. Leczenie rzutu stwardnienia rozsianego

Glukokortykosteroidy. Obserwacje eksperymentalne i kliniczne stały się podstawą do powstania i zastosowania w przewlekłej terapii SM rosnącej grupy środków terapeutycznych o zróżnicowanym działaniu immunomodulacyjnym obejmującym m.in. zmianę profilu komórkowej odpowiedzi immunologicznej, promowanie ekspansji komórek regulatorowych, deplecję wybranych populacji komórek immunologicznych oraz ingerencję w migrację komórek efektorowych [193, 194]. Niezależnie od leczenia przewlekłego, mającego na celu zahamowanie lub spowolnienie akumulacji deficytów neurologicznych, w ostrej terapii rzutów SM stosuje się glukokortykosteroidy (GCS). Brak jest niestety dużych,

kontrolowanych badań klinicznych wskazujących na preferowane preparaty lub najkorzystniejszą drogę podania GCS w leczeniu zaostrzeń SM. Jednakże, na podstawie wieloletnich doświadczeń terapeutycznych, w leczeniu rzutu SM zaleca się obecnie stosowanie w sposób pulsacyjny (przez 3 – 5 dni) wysokich dawek metylprednizolonu dożylnie [195]. W większości przypadków, tego typu terapia przynosi zadowalający efekt leczniczy w postaci ustąpienia bądź zmniejszenia intensywności ostrych objawów neurologicznych i skrócenia trwania rzutu choroby.

Skuteczność kliniczna GCS oparta jest na złożonym działaniu substancji z tej grupy na zróżnicowane populacje komórek immunologicznych [77, 196, 197], jak również na elementy komórkowe spoza klasycznie pojmowanego układu odpornościowego takie jak: komórki śródbłonna naczyń [198, 199] czy komórki glejowe w OUN [200, 201]. Uważa się, że działanie GCS na docelowe komórki ma charakter wielofazowy i obejmuje: (i) bardzo szybki, następujący w przeciągu sekund, niespecyficzny efekt związany najprawdopodobniej z bezpośrednią interakcją leku z błoną komórkową; (ii) efekt wywierany w ciągu kilku minut, mediowany przez niedawno scharakteryzowane, specyficzne receptory błonowe GCS [202]; (iii) efekt długofalowy zależny od wiązania przez GCS ich wewnątrzkomórkowego receptora (ang. *glucocorticosteroid receptor* - GR), który w wyniku aktywacji wywiera szereg działań o charakterze przeciwzapalnym [203, 204]. Ligacja znajdującego się pierwotnie w cytoplazmie GR powoduje uruchomienie procesu translokacji jądrowej receptora, jego dimeryzację, a następnie wiązanie ze specyficznymi sekwencjami DNA (ang. *glucocorticoids response elements*) w obszarze promotorów genów odpowiadających na GCS [205, 206]. Rezultatem tego typu bezpośredniej interakcji GR z promotorem jest aktywacja lub rzadziej hamowanie aktywności transkrypcyjnej poszczególnych genów. W grupie cząsteczek, których ekspresja ulega nasileniu pod wpływem działania GCS znajdują się białka silnie zaangażowane w supresję reakcji immunologicznej m.in. fosfataza aktywowanej mitogenem kinazy proteinowej-1 (ang. *mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1* - MKP-1). MKP-1,

poprzez inhibicję szlaku przekąźnictwa MAPK, może hamować ekspresję genów licznych cząsteczek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną, takich jak cytokiny prozapalne: TNF- α , IL1- β , IL-6 czy też substancje o aktywności enzymatycznej [207-201]. Kolejnym, bardzo istotnym mechanizmem molekularnym działania GCS jest, niezależny od wiązania DNA, wpływ cząsteczki GR na funkcjonowanie szlaków przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego. Poprzez ingerencję w proces acetylacji i deacetylacji histonu, GR może powodować obniżenie transkrypcji genów zależnych od kluczowych dla reakcji zapalnej czynników transkrypcyjnych takich jak *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) czy activator protein-1 (AP-1), co w konsekwencji prowadzi do hamowania produkcji szerokiego spektrum cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych i innych molekuł istotnych dla przebiegu reakcji immunologicznej [206, 211-213]. Oddziaływanie GR ze szlakami przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego zaangażowanymi w kształtowanie odpowiedzi odpornościowej zachodzić może również na etapie translokacji molekuł cytoplazmatycznych do jądra komórkowego. Ma to m.in. miejsce w przypadku czynnika transkrypcyjnego GATA3, konkurującego o molekuły transportujące z aktywowanym GR [214].

W odróżnieniu od mechanizmów działania GCS zależnych od ligacji GR, niespecyficzny efekt błonowy występuje wyłącznie w warunkach bardzo wysokiego stężenia leku w mikrośrodowisku, możliwego do osiągnięcia klinicznie jedynie w trakcie pulsacyjnej terapii dożylną wysokimi dawkami GCS. Ma to szczególne znaczenie w świetle badań eksperymentalnych nad mechanizmem działania GCS w EAE. Doświadczenia te wykazały, że związana z terapią apoptoza limfocytów T, naciekających OUN zwierząt doświadczalnych, zależna była od wysokich dawek GCS. Sugeruje to związek niespecyficznego efektu błonowego GCS z indukcją apoptozy komórek immunologicznych [215, 216].

Oporność na GCS. Pomimo przedstawionego powyżej, szerokiego spektrum działania przeciwzapalnego GCS, zastosowanie nawet bardzo wysokich dawek tych leków w części przypadków rzutów SM nie przynosi

oczekiwanej poprawy klinicznej. Przyczyny i mechanizmy molekularne braku efektu terapeutycznego GCS w tej specyficznej grupie pacjentów pozostają nierozwiązanym problemem współczesnej neurologii.

Przeprowadzone do tej pory badania pozwalają wyróżnić kilka odmiennych typów zaburzonej reaktywności na GCS. Pierwszy z nich reprezentuje tzw. zespół rodzinnej oporności na GCS [217, 218]. To występujące bardzo rzadko schorzenie dziedziczne spowodowane jest różnego rodzaju mutacjami genu GR. Mutacjom tym towarzyszą nieprawidłowości czynnościowe GR, obejmujące u poszczególnych chorych m.in.: zaburzenia wiązania GCS, zmniejszoną ekspresję GR czy obniżoną zdolność wiązania DNA przez receptor [217, 218]. Zaburzenia funkcji GR objawiają się wysokimi stężeniami kortyzolu w surowicy krwi pacjentów bez towarzyszących objawów zespołu Cushinga. Jednakże, w niektórych przypadkach, symptomatyka kliniczna obejmuje objawy związane z - wtórnym do nadprodukcji hormonu adrenokortykotropowego - nadmiarem innych niż GCS hormonów kory nadnerczy (mineralokortykosteroidy, androgeny) [217, 218].

Kolejny typ zaburzonej reaktywności na GCS nie ma charakteru uogólnionego, ale związany jest ze specyficznymi tkankami i sytuacjami chorobowymi. Bardzo dobry efekt terapeutyczny GCS stwierdzono w wielu chorobach o podłożu zapalnym m. in. w reumatoidalnym zapaleniu stawów, astmie oskrzelowej czy zapalnej chorobie jelit. Jednakże, istnieje również grupa chorób, przebiegających z wyraźnym zaangażowaniem układu immunologicznego – takich jak np. przewlekła obturacyjna choroba płuc, w których podawanie GCS nie przynosi oczekiwanego efektu przeciwzapalnego [217]. Co więcej, oporność na leczenie za pomocą GCS obserwuje się również u części pacjentów cierpiących na choroby charakteryzujące się, w większości przypadków, bardzo dobrą reakcją na tego typu terapię [219-221]. Istotnym jest fakt, iż pacjenci z opornym na GCS procesem zapalnym, wykazują niezmienną podatność na wszystkie efekty uboczne terapii, co podkreśla specyficzność tkankową stwierdzanych nieprawidłowości.

Powyższe obserwacje sugerują, że na efekt terapeutyczny GCS mogą mieć wpływ zarówno czynniki osobnicze jak i charakterystyka zachodzącej w przebiegu procesu chorobowego reakcji immunologicznej. Wyniki licznych badań nad mechanizmami molekularnymi oporności na GCS w chorobach zapalnych sugerują istnienie wielopoziomowych zaburzeń regulacyjnych, o zróżnicowanym, w zależności od badanej populacji chorych, charakterze [206]. W odróżnieniu od rodzinnej oporności na GCS, nie udało się wykazać konkretnego podłoża genetycznego, determinującego wystąpienie niewrażliwości na GCS związanej z chorobami zapalnymi. Podatność na ujawnienie się tego typu zaburzeń w astmie oskrzelowej wydaje się mieć charakter wielogenowy [222]. Znaczną uwagę poświęcono ekspresji izoform GR, spośród których jedynie cząsteczka GR α uważana jest za funkcjonalny receptor GCS, podczas gdy dwie pozostałe izoformy - GR β oraz GR γ mogą na zasadzie kompetycji zaburzać translokację GR α do jądra komórkowego i wiązanie z odpowiednimi sekwencjami DNA [223-225]. Zaburzone proporcje pomiędzy poszczególnymi izoformami GR były sugerowane jako jeden z mechanizmów oporności na terapię GCS m.in. w astmie oskrzelowej, reumatoidalnym zapaleniu stawów, zapalnej chorobie jelit oraz w ostrej białaczkę limfoblastycznej [225-228]. Następnym z sugerowanych mechanizmów molekularnych zmienionej wrażliwości na GCS w komórkach immunologicznych jest modyfikacja cząsteczki GR pod wpływem bodźców prozapalnych. Indukowane mediatorami zapalenia, takimi jak: IL-2, IL-4, TNF- α , kinazy z grupy MAPK mają zdolność do fosforylacji GR, co w konsekwencji powoduje zaburzenia translokacji receptora do jądra komórkowego oraz nieprawidłowości jego interakcji z innymi molekułami i wiązania DNA [229-231]. Co ważne, fosforylacja GR może następować także na skutek działania produktów organizmów patogennych na komórki układu odpornościowego [232]. Bodźce prozapalne mogą powodować również nasiloną ekspresję molekuł wchodzących w bezpośrednią interakcję z GR i zaburzających w ten sposób funkcję receptora. Dotyczy to m. in. czynnika transkrypcyjnego AP-1, ulegającego wzmożonej aktywacji w przebiegu reakcji immunologicznej w odpornej na GCS astmie

oskrzelowej [233]. Kolejnymi z proponowanych mechanizmów molekularnych leżących u podstaw zaburzonej reaktywności na GCS w chorobach zapalnych są: nieprawidłowości procesu acetylacji i deacetylacji histonu [234] oraz wzmożona aktywność systemu białek transportujących leki, w tym GCS, na zewnątrz komórki [235]. Co ciekawe, u pacjentów z opornością na GCS w przebiegu astmy oskrzelowej opisywano również zaburzenie funkcji regulatorowych limfocytów T [236, 237].

Pomimo pochodzących z badań nad patogenezą SM danych wskazujących na nieprawidłowości osi podwzgórze-przysadka-nadnercza [238, 239] oraz na zaburzenia funkcji GR u pacjentów z SM, niewiele wiadomo na temat podłoża molekularnego i immunologicznego rzutów tej choroby opornych na terapię GCS. W pojedynczych przeprowadzonych do tej pory badaniach, u pacjentów z opornymi na GCS rzutami SM stwierdzono zmniejszoną zdolność GCS do hamowania sekrecji cytokin prozapalnych (TNF- α) oraz proliferacji komórek krwi obwodowej *in vitro* [240, 241]. Na poziomie molekularnym, nieprawidłowy efekt działania GCS u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM, wiązany był ze zmniejszoną ekspresją GR w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jednakże bez zaburzeń proporcji pomiędzy poszczególnymi izoformami receptora. W badaniu tym stwierdzono również zaburzone proporcje kompleksu cytoplazmatycznego GR z białkami szoku cieplnego (ang. *heat shock protein* - hsp), będące wynikiem nadmiernego wiązania hsp90 z receptorem. Zaburzenie to może potencjalnie prowadzić do nieprawidłowej translokacji jądrowej GR i w konsekwencji obniżonej wrażliwości na terapię GCS w tej grupie pacjentów [241].

Wyraźny związek klinicznych zaostrzeń SM z zaburzeniami immunologicznymi oraz z aktywnością zmian zapalnych w OUN stał się motorem poszukiwań metod modulacji układu immunologicznego, skutecznych w przypadkach rzutów SM opornych na terapię GCS. Dobrym rozwiązaniem tego problemu okazała się terapeutyczna wymiana osocza czyli plazmafereza.

Plazmafereza. Plazmafereza jest nieselektywną procedurą immunologiczną pozwalającą na oddzielenie całkowitej frakcji osocza od składników morfotycznych krwi poprzez wirowanie krwi obwodowej w specjalnie do tego przeznaczonych wirówkach lub w procesie filtracji membranowej. Separacja metodą wirówkową opiera się na różnicy gęstości komórkowych i niekomórkowych składników krwi. Wynik filtracji membranowej jest uwarunkowany wielkością porów membrany, które w typowych warunkach umożliwiają przechodzenie cząsteczek o wielkości do 30×10^6 Da, co gwarantuje usunięcie molekuł takich jak przeciwciała czy kompleksy immunologiczne [242].

Po raz pierwszy procedura ta znalazła zastosowanie terapeutyczne u ludzi w przypadkach zespołu nadlepkoci krwi w chorobach hematologicznych [243, 244]. Obecnie wiadomo, że różnego rodzaju zabiegi aferezy mogą prowadzić do istotnej poprawy klinicznej w wielu zróżnicowanych jednostkach chorobowych. Dotyczy to zwłaszcza schorzeń, których patogenezą związana jest z nieprawidłowościami składu osocza. Zaburzenia tego typu mogą być m.in. wynikiem nagromadzenia w osoczu produktów pośrednich procesów metabolicznych, toksyn, a także humoralnych elementów układu odpornościowego, takich jak cytokiny, składniki dopełniacza czy przeciwciała [245]. Do tej pory największy pozytywny efekt kliniczny zabiegów aferezy stwierdzono w ostrych schorzeniach autoimmunologicznych, takich jak małopłytkowość samoistna [246], oraz w przypadkach odrzucenia przeszczepionego narządu np. u pacjentów po transplantacji nerki [247]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują również na skuteczność stosowania plazmaferezy w schorzeniach o charakterze przewlekłym, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów [248], kardiomiopatia rozstrzeniowa [249], zaostrzona przewlekła niewydolność wątroby [250], czy też wrzodziejące zapalenie jelita grubego [251]. Już w latach 80-tych ubiegłego wieku wykazano efektywność plazmaferezy także w terapii przełomu miastenicznego [252] oraz zespołu Guillain-Barre [253, 254]. Prace te przyczyniły się do wzrostu zainteresowania zastosowaniem plazmaferezy w innych stanach i schorzeniach neurologicznych o niepewnym rokowaniu i niewielkich możliwościach terapeutycznych.

Badania kliniczne nad zastosowaniem plazmaferezy jako długofalowej terapii podstawowej lub terapii dodanej w kombinacji z lekami immunosupresyjnymi, u pacjentów z remitująco-rzutową lub przewlekle postępującą postacią SM, nie przyniosły przekonujących danych na temat skuteczności klinicznej tego typu leczenia [255-259]. W przeciwieństwie do zastosowań w terapii długofalowej, efektywność plazmaferezy została wykazana w terapii ostrych pogorszeń stanu neurologicznego w SM [260]. Obserwacja ta ma bardzo istotne znaczenie kliniczne zwłaszcza w przypadku rzutów SM opornych na standardowe dożylnie leczenie wysokimi dawkami GCS. W przeprowadzonym u pacjentów z opornymi na terapię GCS rzutami SM, zrandomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu klinicznym, terapia plazmaferezą prowadziła do istotnej poprawy objawów rzutu w 42% przypadków, podczas gdy w grupie z terapią pozorowaną pozytywny efekt kliniczny obserwowano jedynie u 6% chorych [261]. Wyniki te zostały potwierdzone w kolejnych grupach pacjentów z RR-SM [262-264], jak również u pacjentów z chorobą o przebiegu wtórnie przewlekłym z nakładającymi się rzutami [265]. Pozytywny efekt kliniczny stosowania plazmaferezy w tych grupach badawczych obserwowano powtarzalnie u około 70% pacjentów, a początek poprawy objawów odnotowywano przeciętnie po trzecim zabiegu wymiany osocza. Wyniki te stały się podstawą do uznania plazmaferezy jako efektywnej opcji terapeutycznej u pacjentów z rzutami SM, ze szczególnym uwzględnieniem zaostrzeń stanu neurologicznego opornych na dożylnie podawanie wysokich dawek GCS. Znalazło to odzwierciedlenie w najnowszych rekomendacjach Amerykańskiej Akademii Neurologii na temat zastosowania plazmaferezy w schorzeniach neurologicznych [266].

Mechanizm działania plazmaferezy w leczeniu rzutów SM. Efekt terapeutyczny stosowania plazmaferezy w chorobach związanych z zaburzeniami układu odpornościowego wiązany jest powszechnie z usuwaniem z krwi obwodowej przeciwciał, kompleksów immunologicznych, cytokin, składników dopełniacza oraz innych cząsteczek immunologicznie czynnych [267]. Jednakże,

elementy humoralnego układu odpornościowego znajdujące się w krwioobieganiu stanowią często jedynie fragment całkowitej puli dostępnej w organizmie i mogą być relatywnie szybko uzupełniane z przestrzeni pozanaczyniowej [242]. W związku z tym sugeruje się, iż efekt terapeutyczny plazmaferezy może być wywierany również poprzez redystrybucję substancji aktywnych immunologicznie. Sugestie te znajdują potwierdzenie w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach, w których wzrost stężenia immunoglobulin w krwi obwodowej po uprzednim ich usunięciu drogą plazmaferezy, zależny był od ich napływu z przestrzeni pozanaczyniowej oraz od zmniejszonego katabolizmu [268]. Podobne obserwacje poczyniono również u pacjentów poddawanych zabiegowi deplecji immunoglobulin za pomocą immunoadsorpcji [269].

Za analogicznymi mechanizmami działania plazmaferezy w leczeniu rzutów SM mogą przemawiać, wspomniane powyżej, dane na temat zaangażowania humoralnego układu odpornościowego w immunopatogenezę tej choroby. Istotnym jest również fakt, iż w zaproponowanej niedawno klasyfikacji aktywnych ognisk demielinizacyjnych OUN u pacjentów z SM jeden z czterech podstawowych wzorców immunopatologicznych (tzw. wzorzec II) charakteryzuje się, obok typowego nacieku limfocytów T i makrofagów, akumulacją immunoglobulin i składowych dopełniacza [6]. Ponadto, w grupie pacjentów z opornym na GCS rzutem SM, stwierdzono wyraźną korelację pomiędzy pozytywną odpowiedzią kliniczną na wymianę osocza a obecnością w materiale biopsyjnym ognisk demielinizacyjnych odpowiadających humoralnej charakterystyce wzorca II [270]. Skuteczność kliniczna plazmaferez została również wykazana w zapaleniu nerwów wzrokowych i rdzenia (ang. *neuromyelitis optica* - NMO) [271, 272], jednostce chorobowej spokrewnionej z SM, której patogenezę wiązano jest z występowaniem autoantyprzeciwciała przeciwko akwaporynie 4 (ang. *aquaporin 4*) – głównemu kanałowi wodnemu OUN [273, 274].

Pomimo przedstawionych powyżej specyficznych przypadków klinicznych, immunopatogeneza SM wykracza znacznie poza nieprawidłowości humoralnych mechanizmów systemu odpornościowego. Dlatego też istotnym jest poznanie wpływu zabiegów plazmaferezy również na komórkowe składniki układu

immunologicznego. W pojedynczych, przeprowadzonych dotychczas pracach nad komórkowymi mechanizmami immunologicznymi związanymi z terapeutyczną wymianą osocza u pacjentów z SM postulowano regulacyjny wpływ plazmaferezy na aktywność limfocytów supresorowych [275], jak również na spontaniczną proliferację limfocytów i komórek jednojądrzastych krwi obwodowej [276, 277]. W badaniu przeprowadzonym na grupie pacjentów z SM poddanych kombinowanej terapii plazmaferezą i IFN- α , obserwowano wzrost we krwi obwodowej liczebności zarówno limfocytów T jak i komórek NK oraz monocytów [278]. Immunologię komórkową oceniano także u pacjentów leczonych plazmaferezami z innych niż SM wskazań, obejmujących przede wszystkim schorzenia zapalne obwodowego układu nerwowego [279, 280] i mięśni [281], choroby tkanki łącznej [282-286] oraz stany nadlepkoci krwi związane z zaburzeniami hematologicznymi [287-288]. Po przeprowadzeniu terapii plazmaferezami, we krwi obwodowej pacjentów uczestniczących w powyższych badaniach stwierdzano wzrost [280, 287] lub spadek liczebności całkowitej populacji limfocytów T [281-283], a także różnokierunkowe zmiany proporcji pomiędzy limfocytami T CD4+ i limfocytami T CD8+ oraz zaburzenia funkcji i dojrzewania tych komórek [280-284, 288]. Opisywano również zmiany liczebności komórek NK [279, 281, 283, 288], a także zmniejszenie populacji limfocytów B [280, 281, 283, 284] oraz obniżenie liczebności i funkcji fagocytarnej monocytów [288]. Ponadto, w jednej z prac wykazano, korelujący pozytywnie z efektem terapeutycznym plazmaferezy, wzrost liczebności regulatorowych limfocytów T u pacjentów z toczniem układowym [286]. Obserwowano także wzrost spontanicznej proliferacji limfocytów [281, 283] oraz zmiany profilu sekrecji wybranych cytokin *ex vivo* [285, 289] oraz *in vitro* [290]. Niedawno badanie wpływu plazmaferezy na elementy komórkowe układu immunologicznego przeprowadzono również na grupie zdrowych ochotników, u których zabieg wymiany osocza powodował wzrost proporcji limfocytów T CD4+/CD8+ oraz liczebności limfocytów B, bez wpływu na całkowitą populację limfocytów T [291].

II. CEL PRACY

Zaostrzenie objawów SM nie wykazujące reakcji klinicznej na leczenie wysokimi dawkami GCS jest tematem badawczym leżącym na pograniczu neurologii, endokrynologii i immunologii. Badania ostatnich lat wskazują na plazmaferezę jako efektywną opcję terapeutyczną dla dużej części pacjentów cierpiących z powodu rzutu SM opornego na GCS. Jednakże, mechanizmy warunkujące pozytywny efekt kliniczny terapii plazmaferezą w tej grupie pacjentów, pozostają w znacznej mierze niejasne. Niedostatecznie zbadane jest również podłoże immunologiczne zróżnicowanej wrażliwości na poszczególne metody terapeutyczne w rzucie SM.

Z tego względu bardzo istotnym jest poznanie potencjalnych zaburzeń układu immunologicznego związanych z opornością na GCS w SM, jak również mechanizmów leżących u podstaw pozytywnej lub negatywnej odpowiedzi terapeutycznej na leczenie plazmaferezą w tym schorzeniu.

Celami niniejszej pracy były:

1. szczegółowa analiza wpływu terapii plazmaferezą, prowadzonej u pacjentów z opornym na leczenie GCS rzutem SM, na główne populacje komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, z uwzględnieniem podtypów limfocytów T pomocniczych, komórek NK, komórek NKT, limfocytów T regulatorowych, limfocytów B oraz subpopulacji monocytów i komórek dendrytycznych.
2. poszukiwanie korelacji stwierdzanych zaburzeń immunologicznych z efektem klinicznym zabiegów plazmaferezy oraz porównanie z wynikami analogicznych pomiarów u pacjentów z rzutem SM wrażliwym na standardową terapię GCS oraz grupą zdrowych ochotników.

III. MATERIAŁ I METODY

III-1. Pacjenci

Badaniem zostało objętych łącznie 30 uczestników, w tym: 14 pacjentów z rzutem SM opornym na terapię GCS, 6 pacjentów z rzutem SM wykazującym pozytywną odpowiedź kliniczną na GCS oraz 10 zdrowych ochotników. Celem wykluczenia towarzyszącej infekcji, jako czynnika potencjalnie wpływającego na analizowane parametry immunologiczne, u wszystkich uczestników, przed włączeniem do badania, wykonano ocenę morfologii krwi oraz oznaczenie białka C-reaktywnego (ang. *C reactive protein* - CRP) w surowicy. Do badania zostali zakwalifikowani jedynie pacjenci z wynikami powyższych oznaczeń mieszczącymi się w zakresie wartości normalnych. W grupie pacjentów z opornym na GCS rzutem SM znalazło się 11 chorych z postacią remitująco-rzutową choroby oraz 3 pacjentów z rzutowo-przewlekłym SM, u których obrazowanie OUN metodą magnetycznego rezonansu jądrowego wykazało obecność ognisk chorobowych ulegających wzmocnieniu w sekwencjach po podaniu środka kontrastowego, stanowiąc dodatkowe, poza stanem klinicznym, potwierdzenie wysokiej aktywności procesu chorobowego. Żaden z zakwalifikowanych do badania pacjentów nie przyjmował leczenia immunosupresyjnego, pacjenci byli również wolni od innej niż GCS terapii immunomodulującej przez co najmniej 60 dni od rozpoczęcia cyklu plazmaferez. Grupa pacjentów z rzutem SM opornym na GCS objęła 10 kobiet (71%) oraz 4 mężczyzn (29%), średnia wieku w grupie wyniosła 38,1 lat ($\pm 9,8$ SD). Stopień nasilenia objawów neurologicznych pacjentów oceniany był z zastosowaniem Rozszerzonej Skali Niewydolności Ruchowej (ang. *expanded disability state scale* - EDSS) [292]. Wartość EDSS w grupie pacjentów z rzutem SM opornym na GCS wyniosła średnio 6,5 punktu, przy rozpiętości wyniku od 2,5 do 8,5 punktu. Wszyscy pacjenci w tej grupie badawczej doznali ostrego pogorszenia stanu

neurologicznego w przebiegu SM, które nie uległo poprawie pomimo dwukrotnej dożylniej terapii metylprednizolonem (średnia kumulacyjna dawka metylprednizolonu wyniosła 10g). Brak efektu klinicznego w przeciągu 7 dni od zakończenia drugiego cyklu dożylniej terapii GCS stanowił podstawę kwalifikacji pacjenta do leczenia plazmaferezami. Plazmafereza prowadzona była z użyciem aparatu Octo Nova® (Diamed Medizintechnik GmbH, Kolonia, Niemcy). Pacjenci otrzymywali standardowo od 4 do 5 zabiegów plazmaferez (średnia liczba wykonanych zabiegów wyniosła 4,8), w trakcie których dokonywano każdorazowo wymiany osocza w ilości około 50 mL/kg masy ciała. Substytucji osocza dokonywano za pomocą 5% roztworu ludzkiej albuminy. Celem osiągnięcia w trakcie zabiegu efektywnej antykoagulacji, stosowano heparynę pod kontrolą APTT. W wyniku przeprowadzonej terapii u 11 pacjentów doszło do poprawy stanu neurologicznego, podczas gdy u pozostałych 3 pacjentów nie zaobserwowano żadnego efektu klinicznego zastosowanego leczenia. Odpowiedź kliniczna na terapię plazmaferezami była klasyfikowana w 4 stopniowej skali, której punkty zostały zdefiniowane w następujący sposób: „0” – brak odpowiedzi na terapię; „1” – poprawa funkcjonalna bez zmiany w punktacji EDSS; „2” – dobra odpowiedź kliniczna odzwierciedlająca się poprawą wyniku skali EDSS o co najmniej 1 punkt; „3” – bardzo dobra odpowiedź kliniczna równoznaczna z poprawą wyniku skali EDSS o co najmniej 1,5 punktu lub powrotem stanu neurologicznego do sytuacji sprzed rzutu. Tak jak to opisywano w uprzednich publikacjach, początek efektu klinicznego terapii obserwowano średnio po trzecim zabiegu plazmaferezy.

Dziesięciu, dobranych pod względem płci i wieku, zdrowych ochotników, nieprzyjmujących żadnych leków oraz z negatywnym wywiadem dotyczącym chorób przewlekłych (w szczególności: chorób neurologicznych, zaburzeń układu odpornościowego, chorób alergicznych, chorób o podłożu autoimmunologicznym oraz chorób nowotworowych) służyło jako grupa kontrolna. Jako kontrolę zmian układu immunologicznego związanych z terapią GCS, do badania włączono również dodatkową grupę 6, dobranych pod względem płci i wieku, pacjentów z RR-SM, leczonych z powodu zaostrzenia choroby

wysokimi dawkami GCS (metylprednizolon, 1 g/dobę dożylnie przez 5 dni) oraz wykazujących poprawę objawów rzutu w wyniku tego typu leczenia.

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyki Uniwersytetu-Ruhr w Bochum. Wszyscy z uczestników wyrazili pisemną zgodę na udział w tym badaniu.

III-2. Pobranie krwi obwodowej

Badanie prowadzone było na krwi obwodowej, pobieranej od uczestników badania drogą nakłucia żyły przedramienia, każdorazowo w ilości około 15 mL. Pobranie krwi następowało, we wszystkich przypadkach, w godzinach porannych (pomiędzy godziną 9:00 a 10:00), na czczo. W grupie pacjentów poddawanych terapii plazmaferezą próbki krwi pobierane były w trzech następujących po sobie punktach czasowych: „punkt czasowy I” – bezpośrednio przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy; „punkt czasowy II” – po trzecim zabiegu plazmaferezy; „punkt czasowy III” – po zakończeniu terapii plazmaferezami. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń z procedurami wykorzystującymi krążenie pozaustrojowe (takimi jak np. hemodializa) wiadomo, iż zabiegi te mogą prowadzić do bezpośrednich zmian w strukturze populacji komórkowych krwi obwodowej [291, 293, 294]. Jednakże, analizy kinetyki tego typu zaburzeń wskazują na powrót do wartości wyjściowych (sprzed zabiegu) w czasie krótszym niż 10 godzin [86, 293, 294]. Z tego względu, w obecnym badaniu pobrania krwi obwodowej w trakcie trwania terapii plazmaferezami oraz po jej zakończeniu (punkty czasowe „II” i „III”), odbywały się każdorazowo około 20 godzin po zakończeniu uprzedniego zabiegu plazmaferezy.

III-3. Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells* - PBMC) pozyskiwano z próbek krwi osób biorących udział w badaniu z zastosowaniem metody gradientowej. Krew obwodowa (15 mL) mieszana była w stosunku 1:1 z jałowym zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline* - PBS), nawarstwiana na płyn gradientowy (10 mL) (Histopaque-1077; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), a następnie wirowana przez 30 minut, w temperaturze pokojowej, z prędkością obrotową 300g. Po odzyskaniu, ze środkowej warstwy gradientu, frakcja komórek jednojądrzastych była płukana trzykrotnie w jałowym buforze PBS (10 minut, temperatura 5°C, prędkość obrotowa 300g). Część uzyskanych w ten sposób PBMC zawieszano w schłodzonym buforze PBS celem oceny fenotypowej na cytometrze przepływowym. Pozostałe komórki zawieszano w jałowym medium hodowlanym zawierającym: RPMI 1640, streptomycynę 100 µg/mL, penicylinę 100 U/mL, 2 mM L-Glutaminę (Gibco, Life technologies, Vienna, Austria) oraz 5% inaktywowaną płodową surowicę cielęcą (ang. *fetal calf serum* - FCS; Boehringer, Mannheim, Germany), celem zastosowania w doświadczeniach z wykorzystaniem izolacji magnetycznej subpopulacji komórkowych oraz hodowli *in vitro*.

III-4. Cytometria przepływowa

Ocena ilościowa oraz fenotypowa populacji komórek immunologicznych krwi obwodowej we frakcji PBMC oraz komórek poddanych hodowli *in vitro* została przeprowadzona z zastosowaniem wielokolorowej cytometrii przepływowej na aparacie BD FACSCanto II® z zastosowaniem oprogramowania BD FACSDiva® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). W tym celu, badane komórki zostały zawieszone w schłodzonym buforze PBS w stężeniu 10^5 komórek/100 µL buforu. Niespecyficzne wiązanie związanych z fluoro-

chromem przeciwciał monoklonalnych było blokowane poprzez dodanie do zawiesiny barwionych komórek odczynnika Fc-Blocking-Reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) w ilości 10 μ L na próbkę. Następnie komórki inkubowano w ciemności z odpowiednimi monoklonalnymi przeciwciałami znakowanymi fluorochromem, w stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta (30 minut, temperatura 4-8°C). Po zakończeniu inkubacji, niezwiązane z powierzchnią komórki przeciwciała usuwano z próbek poprzez dwukrotne płukanie w buforze PBS (10 minut, temperatura 5°C, prędkość obrotowa 300g). W dalszej kolejności komórki były zawieszane w 200 μ L buforu PBS i poddawane analizie. Jako kontroli specyficzności wiązania zastosowanych przeciwciał monoklonalnych użyto przeciwciał izotypowych odpowiadających pod względem klasy i podklasy immunoglobulin oraz pod względem związanego z nimi fluorochromu poszczególnym przeciwciałom zastosowanym w badaniu.

III-5. Charakteryzacja fenotypowa poszczególnych populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej

Celem uniknięcia potencjalnego wpływu przypadkowych zanieczyszczeń erytrocytarnych na analizę ilościową, poszczególne populacje PBMC oceniano w grupie komórek wykazujących ekspresję powierzchniową CD45, czyli wspólnego antygenu leukocytnego (ang. *common leucocyte antigen*), z zastosowaniem następujących kryteriów fenotypowych: limfocyty T CD4+ oraz limfocyty T CD8+ odpowiednio – CD3+CD4+ oraz CD3+CD8+; komórki NK – CD56+CD3-; komórki NKT – CD56+CD3+; limfocyty B – CD19+. Całkowita populacja monocytów rozpoznawana była jako komórki o fenotypie CD14+. W dalszej kolejności frakcja monocytów została podzielona, na podstawie intensywności ekspresji molekuly CD14 oraz obecności lub nie ekspresji molekuly CD16, na następujące subpopulacje: (i) monocyty o wysokiej ekspresji CD14, nie wykazujące ekspresji CD16 (CD14^{high}CD16-); (ii) monocyty

o wysokiej ekspresji CD14, wykazujące ekspresję CD16 (CD14^{high}CD16+); (iii) monocyty o niskiej ekspresji CD14 wykazujące ekspresję CD16 (CD14^{low}CD16+). Identyfikacja poszczególnych podtypów komórek dendrytycznych oparta została na panelu przeciwciał specyficznych dla antygenów z grupy BDCA. W przypadku komórek dendrytycznych plazmacytoidalnych oraz mieloidalnego podtypu CD141+, różnicującą cechą była ekspresja powierzchniowa odpowiednio molekuly CD303 oraz CD141. Natomiast ze względu na możliwość występowania antygeny CD1c również na limfocytach B, jako mieloidalny podtyp CD1c+ komórek dendrytycznych kwalifikowano komórki wykazujące ekspresję CD1c i nie wykazujące ekspresji specyficznego dla limfocytów B antygeny CD19 (CD1c+CD19-) [63].

Zestawienie molekuł powierzchniowych ocenianych za pomocą opisanej metody przedstawiono w Tabeli 1. Przeciwciała monoklonalne specyficzne dla antygenów z grupy BDCA uzyskano z firmy Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany. Pozostałe, zastosowane w tej metodzie, przeciwciała monoklonalne i odpowiadające im kontrole izotypowe uzyskano z firmy BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA.

Limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD4+CD25+FoxP3+ identyfikowane były za pomocą złożonego zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego barwienia z wykorzystaniem zestawu „Human Regulatory T Cell Staining Kit” (eBioscience, San Diego, CA, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. W skrócie: w pierwszym etapie PBMCs były barwione zewnątrzkomórkowo z użyciem monoklonalnych przeciwciał specyficznych dla CD4 i CD25, analogicznie do przedstawionej powyżej procedury barwienia zewnątrzkomórkowego. W kolejnym etapie, wybarwione komórki były utrwalane w roztworze utrwalającym przez 60 minut, w temperaturze pokojowej, a następnie dwukrotnie wypłukane i zawieszane w roztworze permeabilizacyjnym. Następnie, komórki były inkubowane przez 30 min, w temperaturze 4-8°C, ze związanym z fluorochromem monoklonalnym przeciwciałem specyficznym

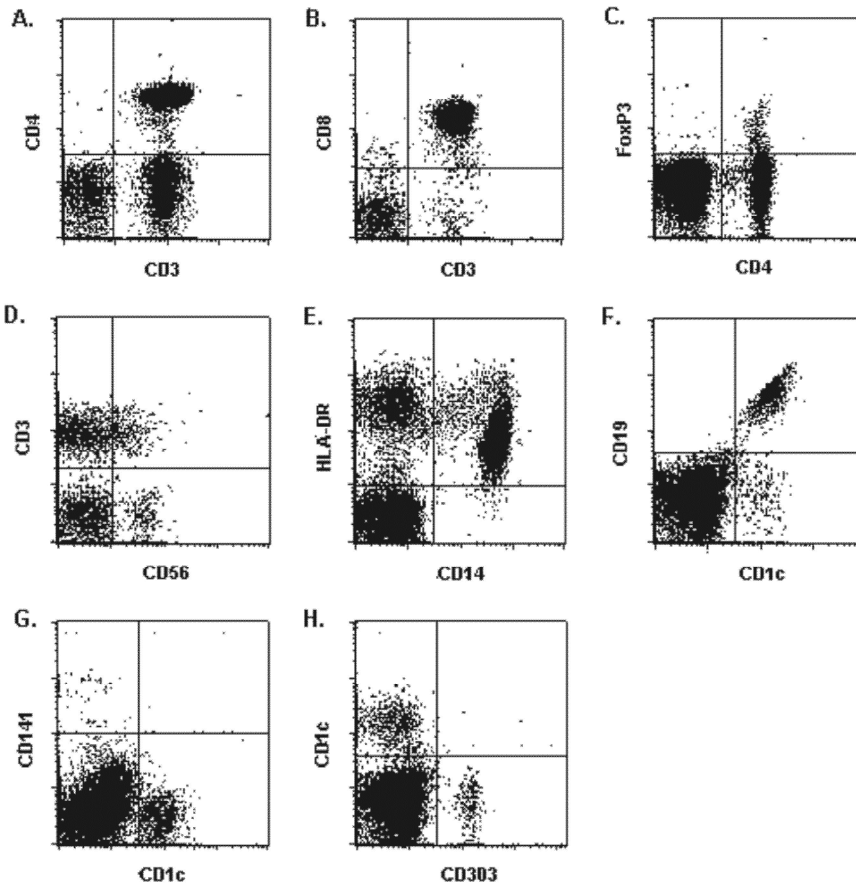
dla czynnika transkrypcyjnego FoxP3, dwukrotnie płukane roztworem permeabilizacyjnym i zawieszane w buforze PBS.

Przykładowe obrazy analizy cytometrycznej poszczególnych populacji komórek immunologicznych ocenianych w badaniu zostały przedstawione na rycinie 1.

Tabela 1. Oceniane w badaniu antygeny powierzchniowe oraz zastosowane w ocenie cytometrycznej przeciwciała monoklonalne.

Table 1. Surface molecules assessed in the study and appropriate monoclonal antibodies for FACS analysis.

Antygen	Przeciwciało	Klon	Izotyp
CD1c/BDCA1	Anty-CD1c-APC	AD5-8E7	Mouse IgG2a
CD303/BDCA2	Anty-CD303-FITC	AC144	Mouse IgG1
CD141/BDCA3	Anty-BDCA3-FITC	AD5-14H12	Mouse IgG1
HLA-DR	Anti-HLA-DR-APC	L243 (G46-6)	Mouse IgG2a
CD3	Anti-CD3-FITC	UCHT1	Mouse IgG1
CD4	Anty-CD4-APC	RPA-T4	Mouse IgG1
CD8	Anty-CD8-PE	HIT8a	Mouse IgG1
CD14	Anty-CD14-PerCP-Cy5.5	M5E2	Mouse IgG2a
CD16	Anty-CD16-FITC	3G8	Mouse IgG1
CD19	Anty-CD19-PE-Cy5	HIB19	Mouse IgG1
CD40	Anty-CD40-APC	5C3	Mouse IgG1
CD45	Anty-CD45- PerCP-Cy5.5	TÜ116	Mouse IgG1
CD56	Anty-CD56-PE	B159	Mouse IgG1
CD83	Anty-CD83-FITC	HB15e	Mouse IgG1
CD80	Anty-CD80-FITC	L307.4	Mouse IgG1
CD86	Anty-CD86-PE	2331 (FUN-1)	Mouse IgG1



Ryc. 1. Populacje komórek jednojądrzastych krwi obwodowej oceniane w badaniu.

Przykładowe obrazy oceny cytometrycznej poszczególnych populacji PBMC *ex vivo*, z zastosowaniem barwienia monoklonalnymi przeciwciałami związanymi z fluorochromem, tak jak to opisano w sekcji „Materiały i metody”: (A.) limfocyty T CD3+CD4+; (B.) limfocyty T CD3+CD8+; (C.) Tregs (CD4+FoxP3+); (D.) komórki NKT (CD56+CD3+) oraz komórki NK (CD56+CD3-); (E.) monocyty (CD14+); (F.) limfocyty B (CD19+) oraz mieloidalne komórki dendrytyczne typu 1 (CD1c+CD19-); (G.) mieloidalne komórki dendrytyczne typu 2 (CD141+); (H.) plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (CD303+).

Fig. 1. PBMC populations assessed in the study.

Representative flow cytometry analysis of particular PBMC populations *ex vivo*. PBMC were stained with monoclonal antibodies, as described in “Materials and methods” section: (A.)

CD3+CD4+ T cells; (B.) CD3+CD8+ T cells; (C.) Tregs (CD4+FoxP3+); (D.) NKT cells (CD56+CD3+) and NK cells (CD56+CD3-); (E.) monocytes (CD14+); (F.) B cells (CD19+) and myeloid dendritic cells type 1 (CD1c+CD19-); (G.) myeloid dendritic cells type 2 (CD141+++); (H.) plasmacytoid dendritic cells (CD303+).

III-6. Sortowanie magnetyczne monocytów

Monocyty pacjentów z rzutami SM opornymi na GCS izolowane były z krwi obwodowej, w trzech – opisanych powyżej – punktach czasowych terapii plazmaferezami. Izolację prowadzono drogą sortowania negatywnego z zastosowaniem zestawu „Monocyte Isolation Kit II” oraz sortera MidiMACS® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie: bezpośrednio po uzyskaniu metodą gradientową frakcji PBMC, $2-4 \times 10^7$ komórek było płukane (10 minut, temperatura 5°C, prędkość obrotowa 300g), a następnie zawieszane w jałowym, odgazowanym „Buforze do separacji komórek” zawierającym PBS, 0,5% BSA oraz 2 mM EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). W dalszej kolejności komórki były inkubowane z panelem przeciwciał monoklonalnych związanych z biotyną (specyficznych dla molekuł charakteryzujących inne niż monocyty populacje leukocytarne), a następnie z mikrokuleczkami magnetycznymi wiążącymi biotynę. Po zakończeniu inkubacji, niezwiązane przeciwciała monoklonalne oraz mikrokuleczki usuwano z próbek poprzez dwukrotne płukanie w „Buforze do separacji komórek” (10 minut, temperatura 5°C, prędkość obrotowa 300g).

Przygotowane w ten sposób komórki były poddawane sortowaniu na specjalnie do tego przeznaczonych kolumnach, w polu magnetycznym sortera MidiMACS®. Związane z mikrokuleczkami magnetycznymi komórki (obejmujące inne niż monocyty populacje komórkowe) były zatrzymywane w polu magnetycznym na macierzy kolumny. Przepływająca swobodnie przez kolumnę frakcja negatywna zawierała w przeprowadzonych eksperymentach powtarzalnie powyżej 95% monocytów CD14+.

III-7. Hodowle komórkowe

Uzyskane od pacjentów z rzutami SM opornymi na GCS komórki pełnej frakcji PBMC oraz izolowane magnetycznie monocyty zostały poddane hodowli *in vitro*.

PBMC. Niesortowane PBMC były zawieszane w jałowym medium hodowlanym (o składzie opisanym powyżej), w stężeniu 2×10^6 komórek/mL, a następnie umieszczane na 96-dołkowej, okrągłodennej płytce hodowlanej celem 48-godzinnej hodowli (temperatura 37°C, stężenie CO₂ 5%), bez stymulacji lub w warunkach niespecyficznego stymulacji fitohemaglutyniną (ang. *phytohemagglutinin* - PHA, 5 µg/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po zakończeniu hodowli nadsączka hodowlana była zamrażana celem późniejszego wykorzystania do pomiaru stężenia wybranych cytokin.

Monocyty. Izolowane magnetycznie monocyty, po uprzedniej cytometrycznej kontroli czystości frakcji, były umieszczane na 96-dołkowych, okrągłodennych płytkach hodowlanych w stężeniu 2×10^6 komórek/mL, a następnie poddawane 48-godzinnej hodowli (temperatura 37°C, stężenie CO₂ 5%) w medium hodowlanym bez czynników stymulujących lub w medium hodowlanym z dodatkiem LPS (100 pg/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) albo rekombinowanego ludzkiego IFN-γ (100 UI/mL; R&D Systems Inc., Minnesota, MN, USA). Po zakończeniu hodowli monocyty były pozyskiwane i oceniane fenotypowo za pomocą cytometrii przepływowej. Nadsączka hodowlana była

zamrażane celem późniejszego wykorzystania do pomiaru stężenia wybranych cytokin.

III-8. Sekrecja cytokin

Zawartość wybranych cytokin w nadsączach hodowlanych była oceniana metodą BD Cytometric Bead Array System™ na cytometrze przepływowym BD FACSCanto II® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), zgodnie z instrukcjami producenta, z zastosowaniem zestawów FlexSets specyficznych dla ludzkiej IL-1 β , ludzkiej IL-6, ludzkiej IL-10, ludzkiej podjednostki p40 wspólnej dla IL-12 i IL-23 (IL-12/IL-23p40), ludzkiego IFN- γ , ludzkiego TNF- α (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Zakres czułości pomiaru wynosił dla wszystkich zastosowanych zestawów FlexSets od 10 pg/mL do 2500 pg/mL. Przechowywane w temperaturze -70°C nadsącza hodowlane były rozmrażane, w każdym przypadku, bezpośrednio przed dokonaniem analizy. Natychmiast po rozmrożeniu, nadsącza były inkubowane z, będącymi składnikiem odpowiednich zestawów FlexSets, kuleczkami opłaszczonymi fabrycznie przeciwciałami specyficznymi dla poszczególnych cytokin, a następnie z mieszaniną związaną z fluorochromem specyficznych przeciwciał wychwytyjących poszczególne cytokiny związane na powierzchni kuleczek. Po zakończeniu inkubacji i wypłukaniu nadmiaru przeciwciał, intensywność fluorescencji właściwych dla poszczególnych cytokin typów kuleczek była oceniana na cytometrze przepływowym. Korelacja wyników pomiaru intensywności fluorescencji ze stężeniem cytokin w supernatancie dokonywana była na podstawie odpowiednich krzywych wzorcowych za pomocą programu FCAP Array (Soft Flow, Burnsville, MN, USA).

III-9. Analiza statystyczna

Całkowita analiza przeprowadzonych pomiarów została dokonana przez badacza w sposób zaślepiony co do danych osobowych i klinicznych uczestników badania. Przypisanie poszczególnych wyników do odpowiednich grup badawczych oraz ocena statystyczna nastąpiły dopiero po zakończeniu wszystkich jednostkowych analiz (specyficznych dla konkretnych próbek krwi obwodowej). Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu GraphPad Prism 5 (Graph Pad, La Jolla, CA, USA). Więcej niż dwie grupy były porównywane z zastosowaniem nieparametrycznej analizy ANOVA (test Kruskal-Wallis). W przypadku uzyskania wartości $p < 0,05$ dalsze porównanie par grup było prowadzone z zastosowaniem nieparametrycznego testu t w przypadku cytometrycznej analizy fenotypowej lub testu Mann-Whitney'a dla wyników pomiaru sekrecji cytokin. Wartość $p = 0,05$ została przyjęta jako próg istotności statystycznej.

IV. WYNIKI

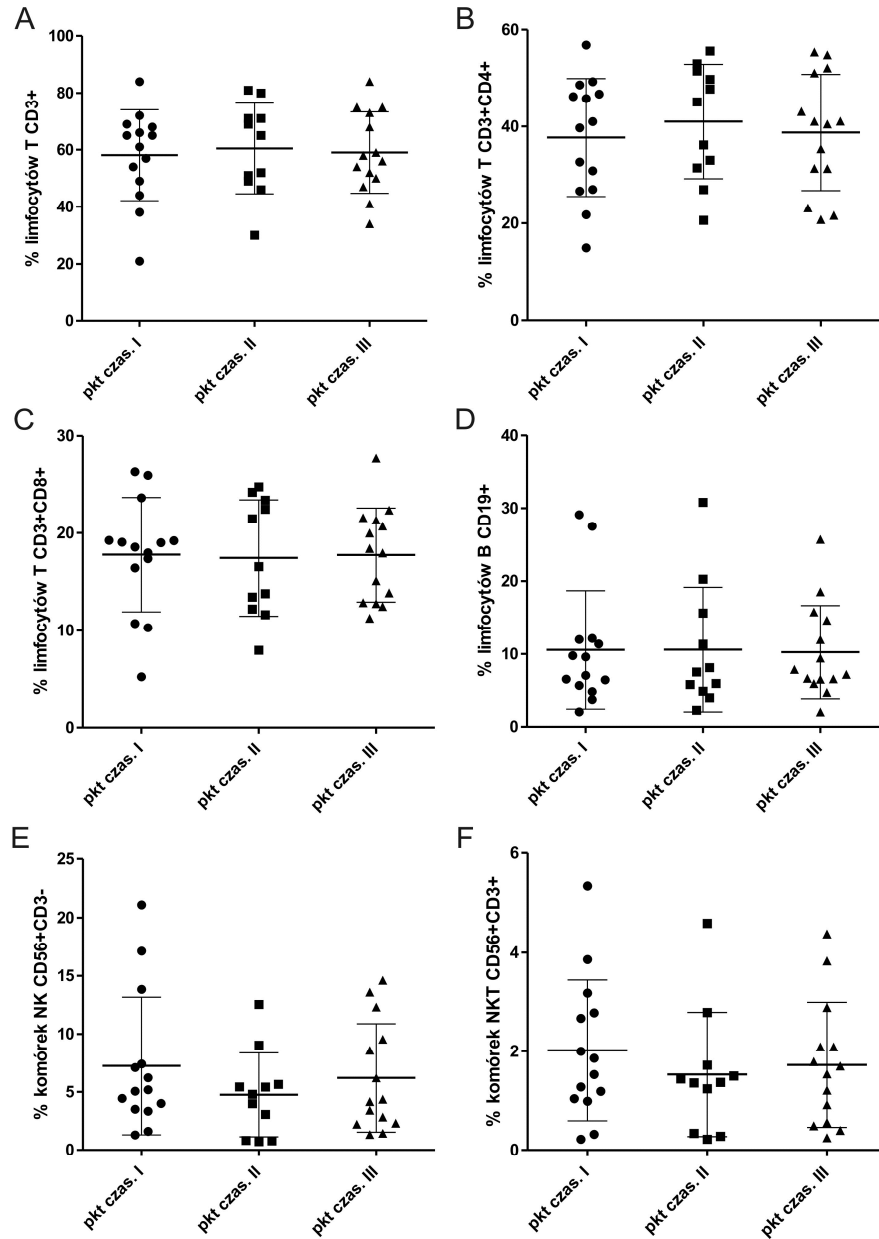
IV-1. Wpływ plazmaferezy na dystrybucję głównych populacji limfocytarnych krwi obwodowej

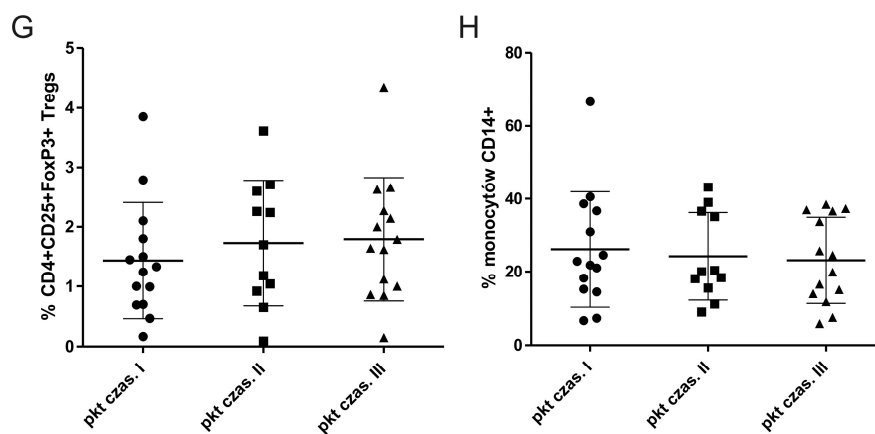
W trakcie trwania i po zakończeniu cyklu plazmaferez nie obserwowano zmian ilościowych populacji limfocytów T CD3+ oraz ich dwóch podstawowych subpopulacji: limfocytów T CD3+CD4+ i limfocytów T CD3+CD8+ (ryc. 2. A-C). Nie stwierdzono również wpływu zabiegów plazmaferezy na dystrybucję limfocytów B CD19+, komórek NK CD56+CD3- oraz komórek NKT CD56+CD3+ (ryc. 2. D-F). W przebiegu terapii nie doszło do istotnych zmian we frakcji limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+ (Tregs) (ryc. 2. G).

IV-2. Wpływ plazmaferezy na strukturę populacji komórek dendrytycznych krwi obwodowej

W przebiegu terapii plazmaferezą nie stwierdzono zmian częstości występowania dwóch badanych subpopulacji mieloidalnych komórek dendrytycznych (ryc. 3. A-B). Niewielka tendencja wzrostowa subpopulacji plazmacytoidalnej (ryc. 3. C) nie osiągnęła wartości istotnych statystycznie, a częstość występowania plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych po zakończeniu cyklu plazmaferez mieściła się, niezmiennie, w zakresie wartości typowych dla zdrowych dorosłych [43, 63]. Terapia plazmaferezą nie wpłynęła również na proporcję subpopulacji mieloidalnych i plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych we krwi obwodowej pacjentów (ryc. 3. D). Ekspresja markera dojrzewania komórek dendrytycznych (CD83) utrzymywała się we wszystkich punktach czasowych badania na bardzo niskim poziomie, nie wykazując

istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (dane nie zostały zawarte w rycinach).



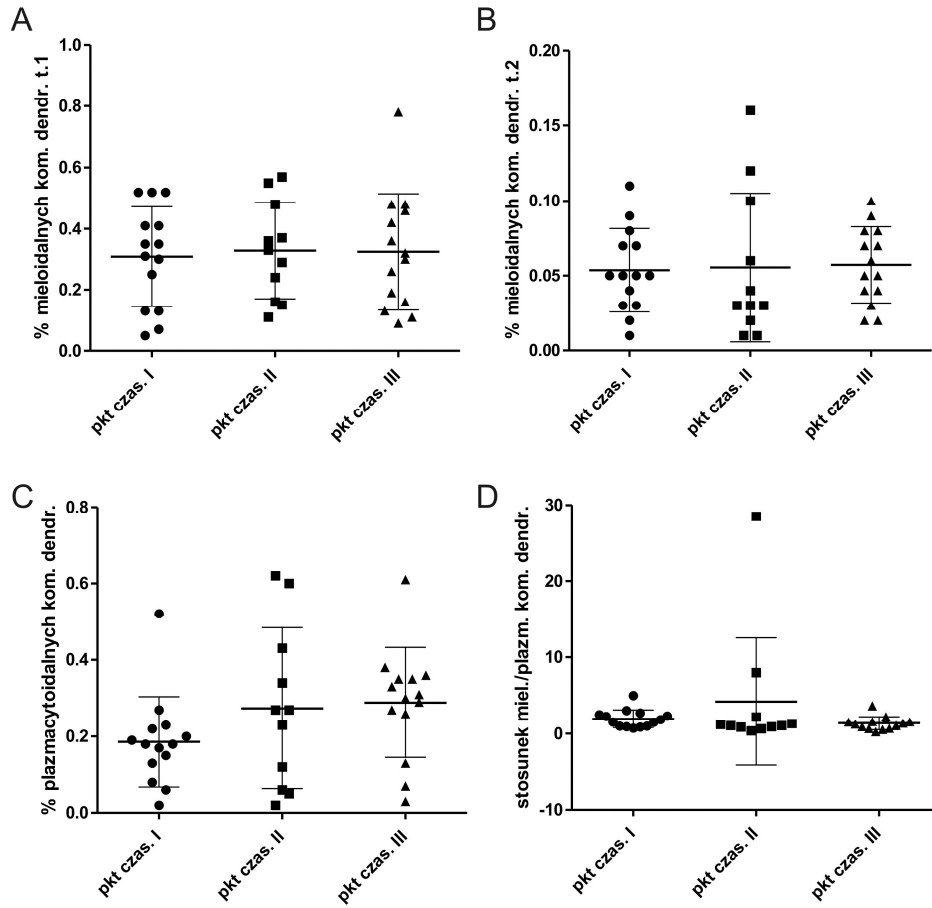


Ryc. 2. Dystrybucja głównych populacji limfocytarnych oraz monocyty krwi obwodowej *ex vivo* w przebiegu terapii plazmaferezą.

Dystrybucja podstawowych populacji limfocytów T (A.-C.), limfocytów B (D.), komórek NK (E.), komórek NKT (F.), Tregs (G.) i całkowitej populacji monocyty (H.) we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej uzyskanej od pacjentów z opornym na GCS rzutem SM, przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I), po trzecim zabiegu plazmaferezy (pkt czas. II) i po zakończeniu cyklu plazmaferez (pkt czas. III). Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 2. Distribution of the main peripheral blood lymphocyte populations and monocytes *ex vivo* over the course of plasma exchange treatment.

Distribution of the main T cell populations (A.-C.), B cells (D.), NK cells (E.), NKT cells (F.), Tregs (G.) and the whole monocyte population (H.) in PBMC fraction obtained from patients with glucocorticoid (GCS) resistant multiple sclerosis relapse before the first plasma exchange (pkt czas. I), after the 3rd plasma exchange (pkt czas. II) and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III). Horizontal lines represent mean values, vertical lines represent \pm SD.



Ryc. 3. Struktura populacji komórek dendrytycznych krwi obwodowej *ex vivo* w przebiegu terapii plazmaferezą.

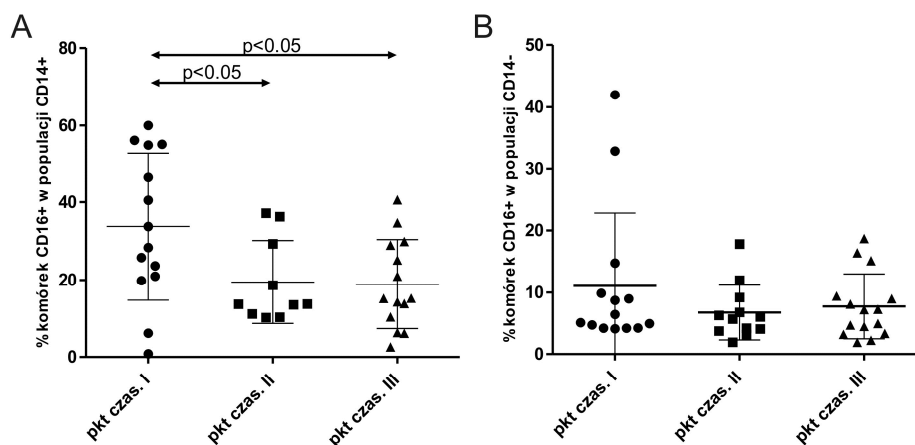
Dystrybucja mieloidalnych komórek dendrytycznych typu 1 (A.), mieloidalnych komórek dendrytycznych typu 2 (B.), plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych (C.) oraz stosunek ilościowy mieloidalnych do plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych (D.) we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej uzyskanej od pacjentów z opornym na GCS rzutem SM, przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I), po trzecim zabiegu plazmaferezy (pkt czas. II) i po zakończeniu cyklu plazmaferez (pkt czas. III). Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 3. Structure of the peripheral blood dendritic cell population *ex vivo* over the course of plasma exchange treatment.

Distribution of myeloid dendritic cells type 1 (A.), myeloid dendritic cells type 2 (B.), plasmacytoid dendritic cells (c.), and the ratio between myeloid and plasmacytoid dendritic cells (D.) in PBMC fraction obtained from patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse before the first plasma exchange (pkt czas. I), after the 3rd plasma exchange (pkt czas. II) and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III). Horizontal lines represent mean values, vertical lines represent \pm SD.

IV-3. Wpływ plazmaferezy na subpopulację monocytów wykazujących ekspresję CD16

Całkowita populacja monocytów (CD14+) nie uległa w przebiegu cyklu plazmaferez zmianom ilościowym (ryc. 2. H). Jednakże, na podstawie analizy subpopulacji tych komórek, stwierdzono istotny statystycznie spadek procentu monocytów wykazujących ekspresję powierzchniową molekuly CD16, już po trzecim zabiegu plazmaferezy (punkt czasowy II i III) (ryc. 4. A). Terapia plazmaferezą nie miała wpływu na ekspresję CD16 w obrębie innych niż monocyty populacji komórkowych (komórki CD14-) (ryc. 4. B).



Ryc. 4. Ekspresja CD16 na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej *ex vivo* w przebiegu terapii plazmaferezą.

Procent komórek wykazujących ekspresję CD16 w populacji monocytów (CD14+) (A.) oraz w populacji komórek innych niż monocyty (CD14-) (B.) we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej uzyskanej od pacjentów z opornym na GCS rzutem SM, przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I), po trzecim zabiegu plazmaferezy (pkt czas. II) i po zakończeniu cyklu plazmaferez (pkt czas. III). Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 4. Expression of CD16 in PBMC fraction *ex vivo* over the course of plasma exchange treatment.

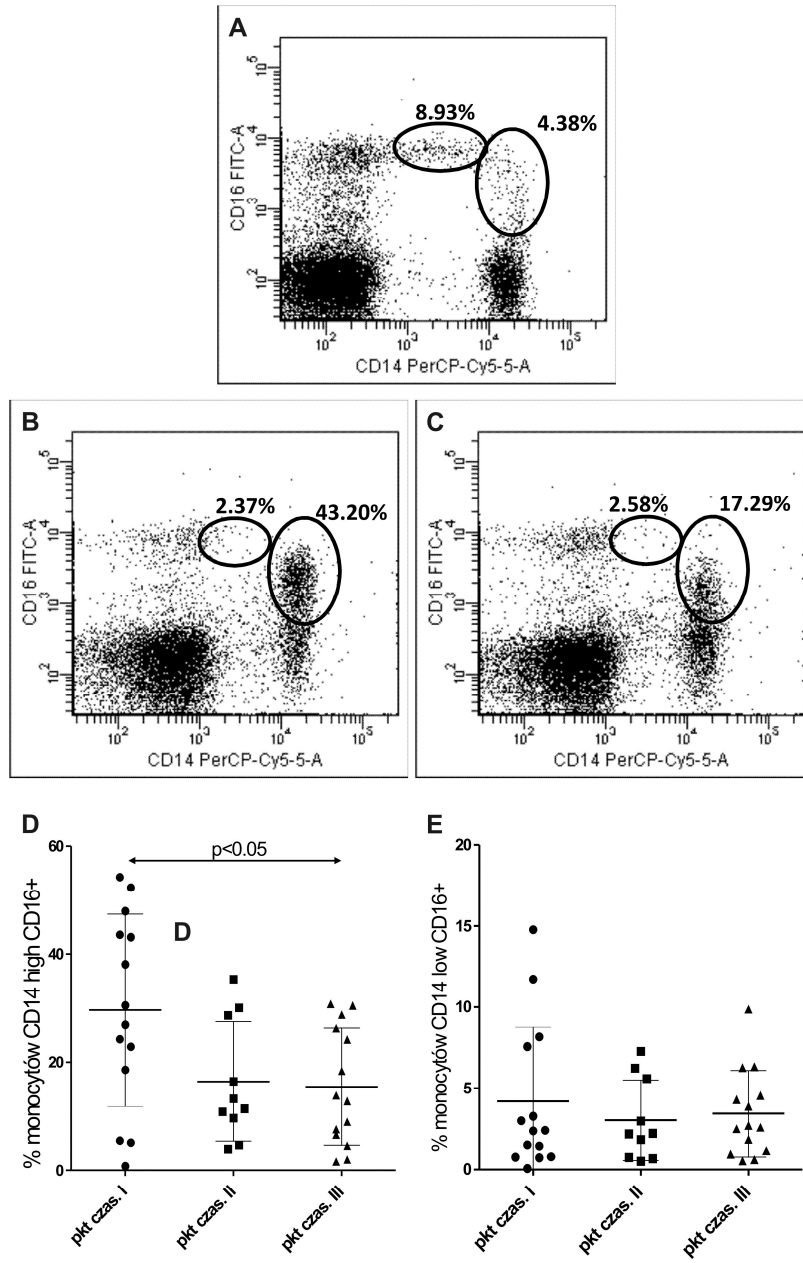
The percentage of cells expressing CD16 in CD14+ monocytes (A.) and in CD14- non-monocytes (B.) in PBMC fraction obtained from patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse before the first plasma exchange (pkt czas. I), after the 3rd plasma exchange (pkt czas. II) and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III). Horizontal lines represent mean values, vertical lines represent \pm SD.

IV-4. Zmiany subpopulacji CD14^{high}CD16+ w przebiegu terapii plazmaferezą

Na pulę wykazujących ekspresję CD16 monocytów krwi obwodowej składają się dwie odmienne fenotypowo i funkcjonalnie subpopulacje: monocyty CD14^{low}CD16+ oraz monocyty CD14^{high}CD16+ (ryc. 5. A). Efekt wywierany przez plazmaferezę na strukturę monocytów u pacjentów poddawanych terapii, związany był specyficznie z subpopulacją monocytów CD14^{high}CD16+. W przebiegu leczenia nie obserwowano natomiast wpływu plazmaferezy na subpopulację monocytów CD14^{low}CD16+ (ryc. 5. B-E).

IV-5. Wpływ terapii glukokortykosteroidami na obserwowane w przebiegu terapii plazmaferezą zmiany subpopulacji monocytów

W badaniu przeprowadzonym przez Fingerle-Rowsona i wsp. w grupie pacjentów leczonych z powodu rzutu SM, dożylna terapia wysokimi dawkami GCS powodowała szybką redukcję frakcji monocytów krwi obwodowej wykazujących ekspresję molekuly CD16 [295]. Celem odróżnienia obserwowanych w niniejszym badaniu efektów plazmaferezy od potencjalnych wpływów poprzedzającej terapii GCS, dystrybucja wykazujących ekspresję CD16 subpopulacji monocytów, w grupie pacjentów leczonych plazmaferezą, została porównana z grupą zdrowych ochotników (n = 10) oraz grupą pacjentów z rzutem SM leczonych z dobrym efektem klinicznym wysokimi dawkami GCS i nie poddawanych zabiegom plazmaferezy (n = 6).

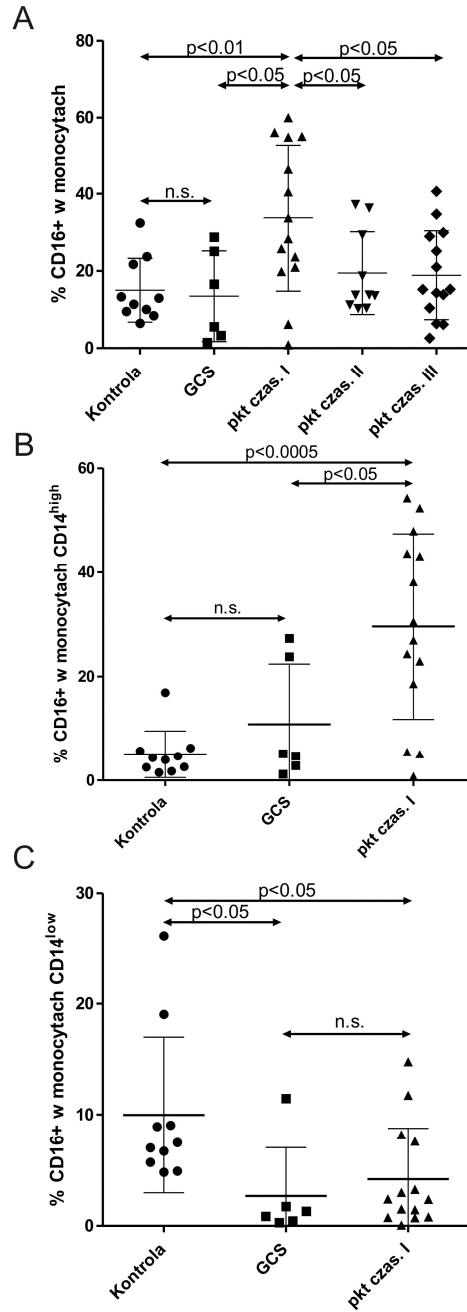


Ryc. 5. Dystrybucja subpopulacji monocytów CD16+ w przebiegu terapii plazmaferezą. Przykładowa analiza cytometryczna subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+ i CD14^{low}CD16+ u osoby zdrowej (A.) oraz u pacjenta z opornym na GCS rzutem SM przed pierwszym i po ostatnim zabiegu plazmaferezy (odpowiednio: B. i C.). Umieszczone na obrazach analizy cytometrycznej bramki wskazują lokalizację subpopulacji monocytów wykazujących ekspresję CD16 oraz wysoką lub niską intensywność barwienia CD14 (odpowiednio: CD14^{high}CD16+ i CD14^{low}CD16+), liczby oznaczają procent ujętych w poszczególnych bramkach komórek. Terapia plazmaferezą (pkt czas. I - pkt czas. III) prowadzi u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM do redukcji subpopulacji CD14^{high}CD16+ (D.), podczas gdy subpopulacja CD14^{low}CD16+ nie ulega istotnym zmianom (E.). Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 5. Distribution of CD16+ monocyte subpopulations over the course of plasma exchange treatment.

Representative flow cytometry analysis of CD14^{high}CD16+ and CD14^{low}CD16+ monocyte subpopulations in a healthy individual (A.) and in a patient with GCS resistant multiple sclerosis relapse before the first and after the last plasma exchange (B. and C., respectively). Gates in dot-plots indicate the localisation of monocyte subpopulations expressing CD16 and high or low levels of CD14 (CD14^{high}CD16+ and CD14^{low}CD16+, respectively), numbers indicate the percentage of gated cells. Plasma exchange treatment (time-points: pkt czas. I – pkt czas. III) leads in patients with GCS resistant multiple sclerosis relapses to reduction of CD14^{high}CD16+ monocytes (D.), whereas the CD14^{low}CD16+ subpopulation is not affected by the therapy (E.). Horizontal lines in the graphs represents mean values, vertical lines represent \pm SD.

Całkowita populacja monocytów nie wykazywała istotnych różnic ilościowych pomiędzy poszczególnymi grupami. Frakcja monocytów CD16+ nie różniła się pomiędzy grupą osób zdrowych a grupą pacjentów z rzutem SM leczonych jedynie za pomocą GCS. Jednakże, procent wykazujących ekspresję CD16 monocytów krwi obwodowej w grupie pacjentów leczonych plazmaferezą, był istotnie wyższy niż u zdrowych ochotników ($p < 0,01$) oraz u pacjentów leczonych jedynie GCS ($p < 0,05$). Co ważne, różnica ta ulegała wyrównaniu w przebiegu terapii plazmaferezą (ryc. 6. A).



Ryc. 6. Rozkład subpopulacji monocytów CD16+ w zależności od leczenia GCS.

Ekspresja powierzchniowa CD16 w całkowitej populacji monocytów (A.), w subpopulacji monocytów CD14^{high} (B.) i subpopulacji monocytów CD14^{low} (C.) u osób zdrowych (Kontrola, n = 10), u pacjentów z rzutem SM wrażliwym na GCS (GCS, n = 6) oraz u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM, poddanych terapii plazmaferezą - w poszczególnych punktach czasowych terapii (odpowiednio: pkt czas. I – pkt czas. III, n = 14). Obserwowany wzrost subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+ jest specyficzny dla pacjentów z opornym na GCS rzutem SM przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I) i nie występuje w grupie kontrolnej osób zdrowych ani w grupie pacjentów z rzutem SM wrażliwym na leczenie GCS (B.). Populacja CD14^{low}CD16+ ulega zmniejszeniu u wszystkich pacjentów, którzy otrzymywali GCS (C.).

Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 6. Distribution of CD16+ monocyte subpopulations depending on GCS treatment. Surface expression of CD16 in the whole monocyte population (A.) and CD14^{high} (B.) and CD14^{low} (C.) monocyte subpopulations in healthy controls (Kontrola, n = 10), multiple sclerosis patients with GCS sensitive relapse (GCS, n = 6) and multiple sclerosis patients treated with plasma exchange at different time points (pkt czas. I – pkt czas. III, n = 14). The significant increase in CD14^{high}CD16+ monocytes is specific for GCS unresponsive relapses before plasma exchange treatment (pkt czas. I) and does not occur in healthy individuals or MS relapses responsive to steroids (B.). The CD14^{low}CD16+ monocyte subpopulation is decreased in all patients treated with GCS (C.). Horizontal lines in the graphs represents mean values, vertical lines represent \pm SD.

Szczegółowa analiza subpopulacji monocytów wykazała, iż obserwowany wzrost liczebności frakcji wykazującej ekspresję CD16, był zależny specyficznie od subpopulacji CD14^{high}CD16+. Procent monocytów CD14^{high}CD16+ był istotnie wyższy w grupie pacjentów leczonych plazmaferezą przed wykonaniem pierwszego zabiegu w porównaniu z osobami zdrowymi oraz z pacjentami leczonymi jedynie GCS (ryc. 6. B). Natomiast, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, subpopulacja monocytów CD14^{low}CD16+ była, w porównaniu z grupą osób zdrowych, istotnie zmniejszona u wszystkich chorych, którzy otrzymywali GCS – niezależnie od przynależności do grupy pacjentów leczonych jedynie GCS, czy też zakwalifikowanych do dalszej terapii plazmaferezą (ryc. 6. C).

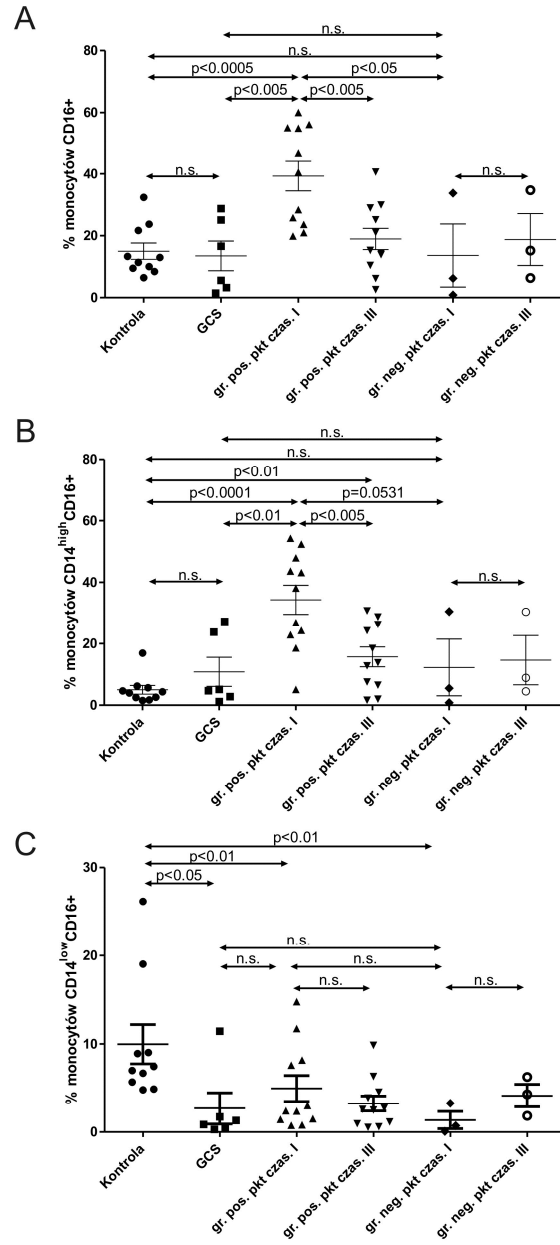
IV-6. Zależność odpowiedzi klinicznej na terapię plazmaferezą od struktury subpopulacji monocytów krwi obwodowej

Na podstawie szczegółowej oceny neurologicznej oraz kryteriów zamieszczonych w sekcji „Materiały i metody”, 11 z 14 biorących udział w badaniu pacjentów z opornym na GCS rzutem SM (78,6%), zostało ocenionych jako wykazujący odpowiedź kliniczną na terapię plazmaferezą (pozytywna odpowiedź kliniczna), natomiast u pozostałych 3 pacjentów (21,4%) nie stwierdzono efektu klinicznego w wyniku zastosowanej terapii (negatywna odpowiedź kliniczna). Odpowiedź kliniczna na terapię plazmaferezą w badanej grupie pacjentów nie miała istotnego związku z wiekiem, płcią ani stopniem nasilenia objawów neurologicznych w skali EDSS przed rozpoczęciem terapii.

Całkowita populacja monocytów (CD14+) nie wykazywała żadnych istotnych różnic pomiędzy podgrupami pacjentów z pozytywną i negatywną odpowiedzią kliniczną, w żadnym z punktów czasowych badania. Jednakże, przed rozpoczęciem cyklu plazmaferez (punkt czasowy I), procent monocytów wykazujących ekspresję CD16 był w podgrupie z pozytywną odpowiedzią

kliniczną na plazmaferezę istotnie wyższy niż w grupie osób zdrowych, w grupie pacjentów leczonych jedynie GCS oraz w podgrupie pacjentów z negatywną odpowiedzią kliniczną na terapię plazmaferezą (odpowiednio: $p < 0,0005$, $p < 0,005$ oraz $p < 0,05$). Równoległe do poprawy stanu neurologicznego w przebiegu cyklu plazmaferez, u pacjentów z pozytywną odpowiedzią kliniczną następowało zmniejszenie frakcji monocytów CD16+ (ryc. 7. A). Natomiast w podgrupie z negatywną odpowiedzią kliniczną, procent monocytów wykazujących ekspresję CD16 nie wykazywał zmian w przebiegu cyklu plazmaferez i nie różnił się od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej osób zdrowych oraz w grupie pacjentów z rzutem SM leczonych jedynie GCS (ryc. 7. A).

Na podstawie analizy subpopulacji monocytów CD16+ stwierdzono, że różnice obserwowane pomiędzy pacjentami z pozytywną i negatywną odpowiedzią na terapię plazmaferezą zależne są specyficznym od monocytów CD14^{high}CD16+ (ryc. 7. B). W przeciwieństwie do tych wyników, w przebiegu cyklu plazmaferez nie stwierdzono żadnych istotnych zmian subpopulacji monocytów CD14^{low}CD16+, bez względu na przynależność do podgrupy z pozytywną czy też negatywną odpowiedzią na zastosowaną terapię (ryc. 7. C).



Ryc. 7. Rozkład subpopulacji monocytów CD16+ w zależności od odpowiedzi klinicznej na terapię plazmaferezą.

Dystrybucję frakcji monocytów wykazujących ekspresję CD16 (A.), subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+ (B.) i subpopulacji monocytów CD14^{low}CD16+ (C.) oceniano u pacjentów poddawanych terapii plazmaferezą z powodu opornego na GCS rzutu SM - wykazujących pozytywną odpowiedź kliniczną lub brak odpowiedzi klinicznej na zastosowaną terapię (odpowiednio: gr. poz., n = 11 oraz gr. neg., n = 3; kryteria oceny klinicznej zawarte są w sekcji „Materiały i metody”). Rycina obrazuje wyniki analizy przeprowadzonej przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I) oraz po zakończeniu cyklu plazmaferez (pkt czas. III), w odniesieniu do danych uzyskanych w grupie kontrolnej osób zdrowych (Kontrola, n = 10) oraz w grupie pacjentów z rzutem SM wrażliwym na leczenie GCS (GCS, n = 6).

Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 7. Structure of CD16+ monocyte subpopulations in plasma exchange responders and non-responders.

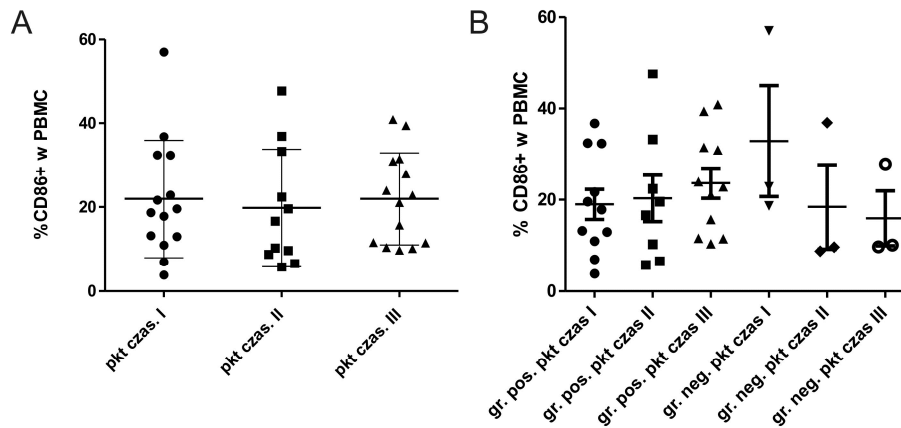
Distribution of CD16+ monocytes (A.), and the CD14^{high}CD16+ (B.) and CD14^{low}CD16+ (C.) monocyte subpopulations was analyzed in multiple sclerosis patients with GCS resistant relapses clinically responding or without clinical response to plasma exchange treatment (gr. poz., n = 11 and gr. neg., n = 3, respectively). Data were compared to healthy controls (Kontrola, n = 10), and multiple sclerosis patients effectively treated with GCS (GCS, n = 6). Analyses were performed at different time points over the course of plasma exchange treatment: before plasma exchange (pkt czas. I), and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III).

Horizontal lines in the graph represents mean values, vertical lines represent \pm SD.

IV-7. Wpływ plazmaferezy na profil ekspresji powierzchniowej molekuł kostymulacyjnych *ex vivo*

W celu dalszego sprecyzowania wpływu terapii plazmaferezą na elementy komórkowe układu odpornościowego, obok analizy ilościowej dokonano również analizy fenotypowej badanych populacji, ze szczególnym uwzględnieniem molekuł biorących udział w procesie kostymulacji. Ekspresja jednego z głównych przedstawicieli nadrodziny TNF - molekuly CD40 oraz jednej z dwóch najważniejszych cząsteczek kostymulacyjnych z rodziny B7 - CD80 kształtowała się we wszystkich badanych próbkach na bardzo niskim poziomie

i nie wykazywała różnic pomiędzy poszczególnymi grupami uczestników. Nie stwierdzono również wpływu zabiegów plazmaferezy na ekspresję tych molekuł (dane nie zostały zawarte w rycinach). W przeciwieństwie do CD40 i CD80, druga z kluczowych molekuł kostymulacyjnych z rodziny B7 – CD86, wykazywała istotną, sięgającą powyżej 20%, ekspresję we frakcji komórek jednojądrzastych *ex vivo*. Jednakże, również w przypadku tej molekuły nie stwierdzono modulacji ekspresji pod wpływem zabiegów plazmaferezy (ryc. 8. A), ani też korelacji z odpowiedzią kliniczną na zastosowaną terapię (ryc. 8. B).



Ryc. 8. Ekspresja CD86 *ex vivo* w populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w przebiegu terapii plazmaferezą.

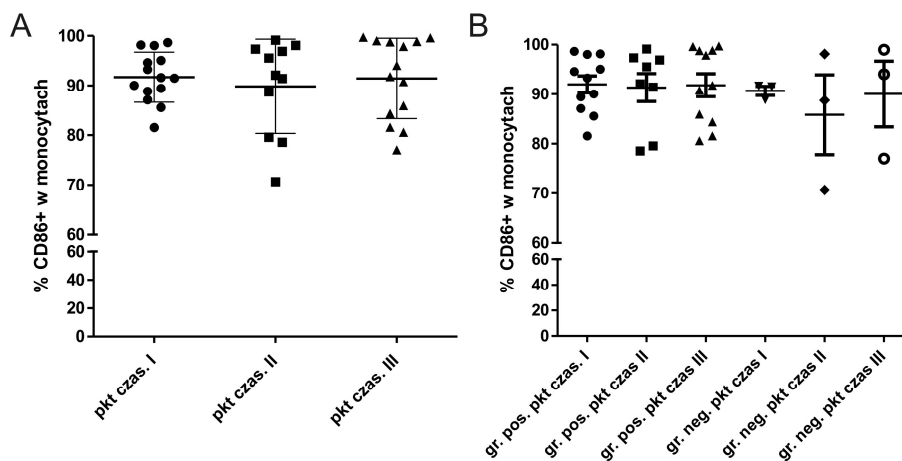
Ekspresja powierzchniowa molekuly kostymulacyjnej CD86 we frakcji PBMC oceniana była *ex vivo*: w całej grupie pacjentów z opornym na GCS rzutem SM (A.) oraz w podgrupach pacjentów wykazujących pozytywną odpowiedź kliniczną lub brak odpowiedzi klinicznej na plazmaferezą (B., odpowiednio: gr. poz., $n = 11$ oraz gr. neg., $n = 3$). Analizę prowadzono w poszczególnych punktach czasowych terapii plazmaferezą (pkt czas. I – pkt czas. III). Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 8. Expression of CD86 *ex vivo* in PBMC fraction over the course of plasma exchange treatment.

Surface expression of CD86 in PBMC fraction was analyzed *ex vivo* in the whole group of patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse (A.) and in subgroups of patients responding and non-responding to plasma exchange treatment (B., gr. poz., $n = 11$ and gr. neg., $n = 3$, respectively). Analyses were performed at different time points over the course of plasma exchange treatment (pkt czas. I – pkt czas. III).

Horizontal lines in the graph represents mean values, vertical lines represent \pm SD.

Zgodnie z oczekiwaniami, znacznie wyższy poziom ekspresji CD86 (średnio około 90%) wykazano w populacji monocytów krwi obwodowej. Nie obserwowano jednak zmian tego parametru w przebiegu cyklu plazmaferez, ani istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi podgrupami pacjentów (ryc. 9. A i B).



Ryc. 9. Ekspresja CD86 *ex vivo* w populacji monocytów krwi obwodowej w przebiegu terapii plazmaferezą.

Ekspresja powierzchniowa molekuly kostymulacyjnej CD86 w całkowitej populacji monocytów (CD14+) krwi obwodowej oceniana była *ex vivo*: w całej grupie pacjentów z opornym na GCS rzutem SM (A.) oraz w podgrupach pacjentów wykazujących pozytywną odpowiedź kliniczną lub brak odpowiedzi klinicznej na plazmaferezą (B., odpowiednio: gr. poz., n = 11 oraz gr. neg., n = 3). Analizę prowadzono w poszczególnych punktach czasowych terapii plazmaferezą (pkt czas. I – pkt czas. III).

Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 9. Expression of CD86 *ex vivo* in peripheral blood monocyte population over the course of plasma exchange treatment.

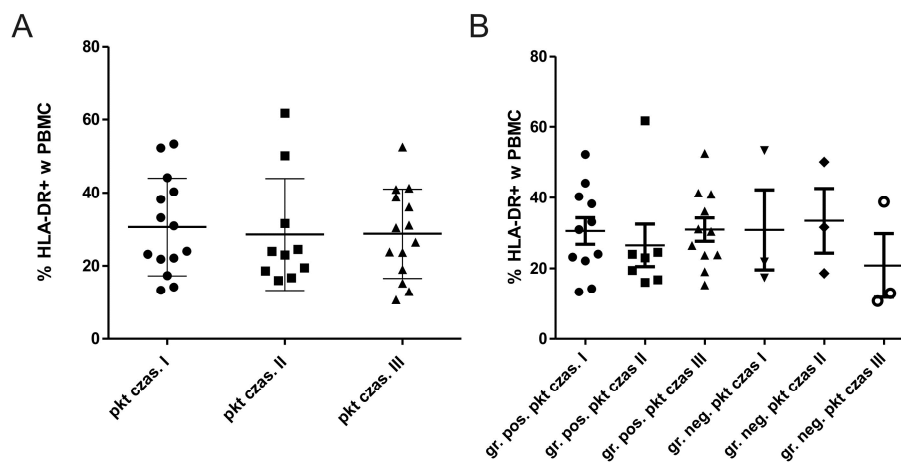
Surface expression of CD86 in CD14+ monocyte population was analyzed *ex vivo* in the whole group of patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse (A.) and in subgroups of patients responding and non-responding to plasma exchange treatment (B., gr. poz., n = 11 and gr. neg., n = 3, respectively). Analyses were performed at different time points over the course of plasma exchange treatment (pkt czas. I – pkt czas. III).

Horizontal lines in the graph represents mean values, vertical lines represent \pm SD.

IV-8. Wpływ plazmaferezy na ekspresję powierzchniową cząsteczek MHC klasy II *ex vivo*

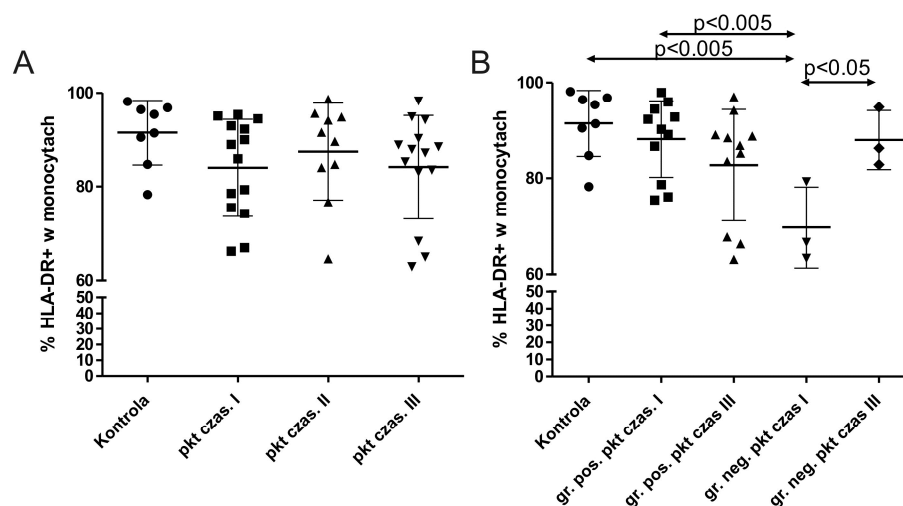
Ekspresja cząsteczek należących do kompleksu MHC klasy II jest uważana za wskaźnik zdolności komórki do udziału w procesie prezentacji antygenów. W badaniu nie obserwowano wpływu zabiegów plazmaferezy na ekspresję cząsteczek HLA-DR w całkowitej frakcji PBMC *ex vivo*, ani różnic pomiędzy pacjentami z pozytywną i negatywną odpowiedzią na zastosowaną terapię (ryc. 10. A i B.). Jednakże, ocena tego parametru w populacji monocytów wykazała, iż u pacjentów z negatywną odpowiedzią kliniczną na terapię plazmaferezą procent monocytów wykazujących ekspresję HLA-DR *ex vivo* był przed rozpoczęciem cyklu plazmaferez istotnie niższy niż u osób zdrowych oraz u pacjentów reagujących pozytywnie na tego typu terapię ($p < 0,005$) (ryc. 11.). Co więcej, w przebiegu cyklu plazmaferez parametr ten ulegał istotnej poprawie (ryc. 11. B).

W szczegółowej analizie poszczególnych subpopulacji monocytów wykazano, iż obserwowany deficyt ekspresji HLA-DR był specyficzny dla tzw. „klasycznych” monocytów o fenotypie CD14^{high}CD16⁻ (ryc. 12. A), podczas gdy obie populacje monocytów CD16⁺ nie wykazywały różnic ekspresji HLA-DR, zależnych od odpowiedzi klinicznej na plazmaferezę (ryc. 12. B i C)



Ryc. 10. Ekspresja HLA-DR *ex vivo* w populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w przebiegu terapii plazmaferezą. Ekspresja powierzchniowa HLA-DR we frakcji PBMC oceniana była *ex vivo*: w całej grupie pacjentów z opornym na GCS rzutem SM (A.) oraz w podgrupach pacjentów wykazujących pozytywną odpowiedź kliniczną lub brak odpowiedzi klinicznej na plazmaferezę (B., odpowiednio: gr. poz., n = 11 oraz gr. neg., n = 3). Analizę prowadzono w poszczególnych punktach czasowych terapii plazmaferezą (pkt czas. I – pkt czas. III). Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 10. Expression of HLA-DR *ex vivo* in PBMC fraction over the course of plasma exchange treatment. Surface expression of HLA-DR in PBMC fraction was analyzed *ex vivo* in the whole group of patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse (A.) and in subgroups of patients responding and non-responding to plasma exchange treatment (B., gr. poz., n = 11 and gr. neg., n = 3, respectively). Analyses were performed at different time points over the course of plasma exchange treatment (pkt czas. I – pkt czas. III). Horizontal lines in the graph represents mean values, vertical lines represent \pm SD.



Ryc. 11. Ekspresja HLA-DR *ex vivo* w populacji monocytów krwi obwodowej w przebiegu terapii plazmaferezą.

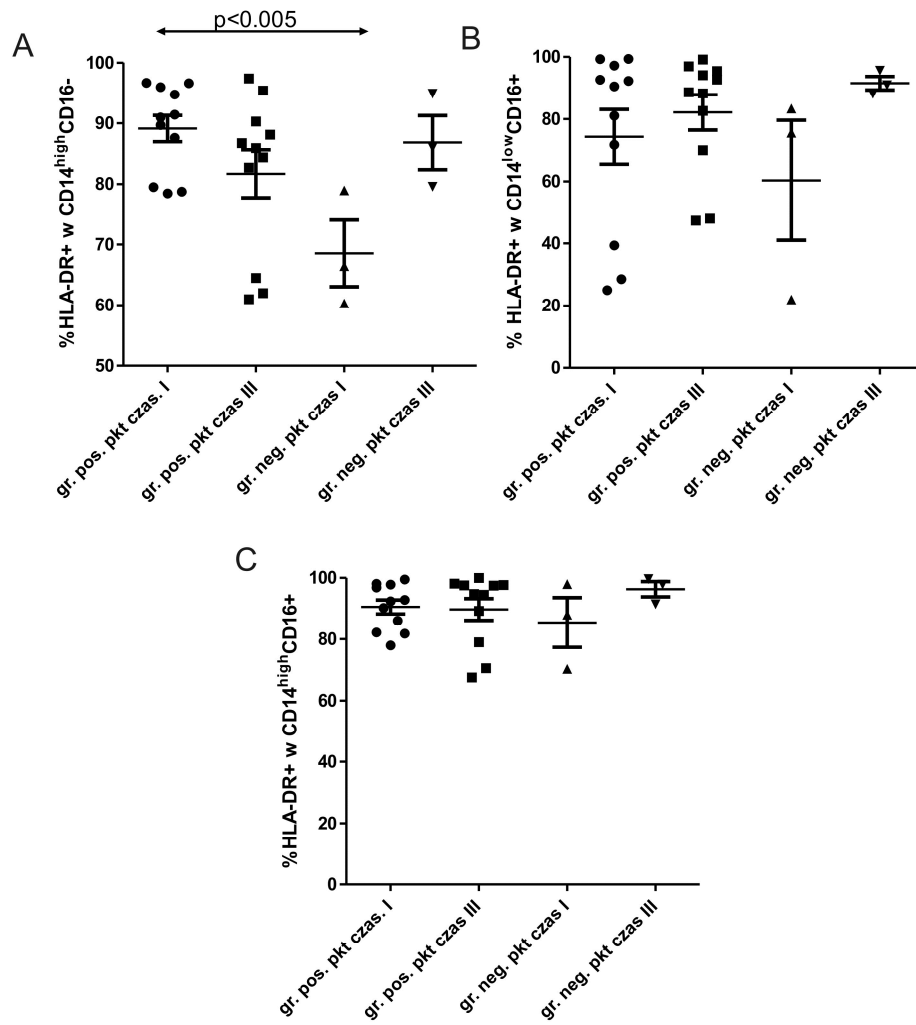
Ekspresja powierzchniowa HLA-DR w całkowitej populacji monocytów (CD14+) krwi obwodowej oceniana była *ex vivo*: w całej grupie pacjentów z opornym na GCS rzutem SM (A.) oraz w podgrupach pacjentów wykazujących pozytywną odpowiedź kliniczną lub brak odpowiedzi klinicznej na plazmaferezę (B., odpowiednio: gr. poz., n = 11 oraz gr. neg., n = 3). Analizę prowadzono w poszczególnych punktach czasowych terapii plazmaferezą (pkt czas. I – pkt czas. III), w odniesieniu do danych uzyskanych w grupie kontrolnej osób zdrowych (Kontrola, n = 10). W panelu B. pominięto punkt czasowy II.

Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 11. Expression of HLA-DR *ex vivo* in peripheral blood monocyte population over the course of plasma exchange treatment.

Surface expression of HLA-DR in CD14+ monocyte population was analyzed *ex vivo* in the whole group of patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse (A.) and in subgroups of patients responding and non-responding to plasma exchange treatment (B., gr. poz., n = 11 and gr. neg., n = 3, respectively). Analyses were performed at different time points over the course of plasma exchange treatment (pkt czas. I – pkt czas. III). Data were compared to healthy controls (Kontrola, n = 10). The time-point II (pkt czas. II) was not shown in the panel B.

Horizontal lines in the graph represents mean values, vertical lines represent \pm SD.

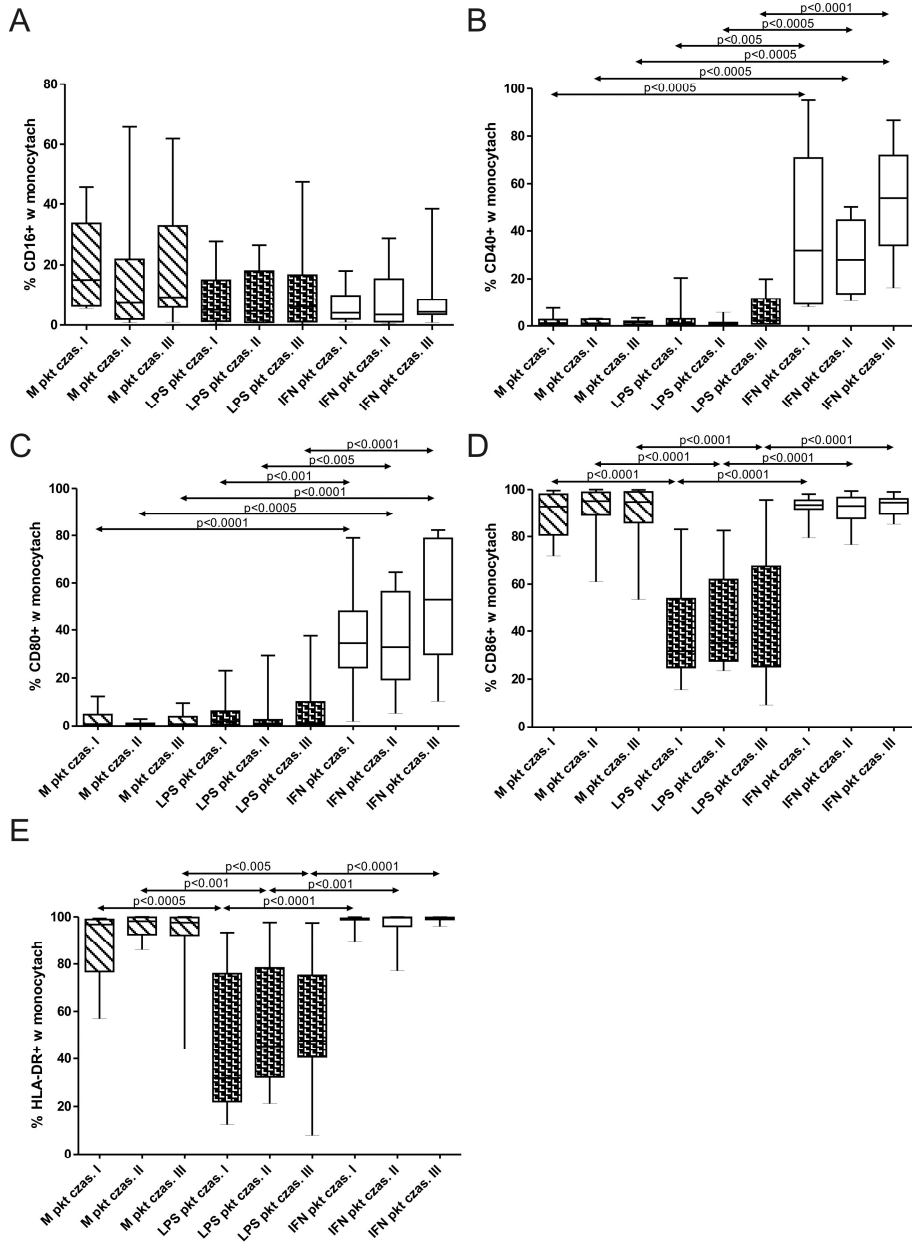


Ryc. 12. Ekspresja HLA-DR *ex vivo* w poszczególnych subpopulacjach monocytów w przebiegu terapii plazmaferezą.

Ekspresja powierzchniowa HLA-DR była oceniana w subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16- (A.), w subpopulacji monocytów CD14^{low}CD16+ (B.) oraz w subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+ (C.) u pacjentów poddawanych terapii plazmaferezą z powodu opornego na GCS rzutu SM, z podziałem na pacjentów wykazujących pozytywną odpowiedź kliniczną lub brak odpowiedzi klinicznej na zastosowaną terapię (odpowiednio: gr. poz., n = 11 oraz gr. neg., n = 3). Rycina obrazuje wyniki analizy przeprowadzonej przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I) oraz po zakończeniu cyklu plazmaferez (pkt czas. III). Obserwowane obniżenie ekspresji HLA-DR przed rozpoczęciem zabiegów plazmaferez jest specyficzne dla subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16-. Linie poziome reprezentują wartość średnią, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 12. Expression of HLA-DR *ex vivo* in monocyte subpopulations over the course of plasma exchange treatment.

Surface expression of HLA-DR was analysed in monocyte subpopulations: CD14^{high}CD16- (A.), CD14^{low}CD16+ (B.) and CD14^{high}CD16+ (C.) in multiple sclerosis patients with GCS resistant relapse - responding and non-responding to plasma exchange treatment (B., gr. poz., n=11 and gr. neg., n=3, respectively). The figure shows the results obtained before plasma exchange (pkt czas. I), and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III). The decreased HLA-DR expression before plasma exchange is specific for CD14^{high}CD16- monocyte subpopulation. Horizontal lines in the graph represents mean values, vertical lines represent \pm SD.



Ryc. 13. Profil ekspresji powierzchniowej monocytów *in vitro* w przebiegu terapii plazmaferezą.

Ekspresja powierzchniowa CD16 (A.), CD40 (B.), CD80 (C.), CD86 (D.) oraz HLA-DR (E.) oceniana była na monocytach poddawanych 48-godzinnej hodowli w czystym medium hodowlanym lub w warunkach stymulacji za pomocą LPS lub IFN- γ (warunki stymulacji oznaczono na rycinie odpowiednio: M, LPS i IFN). Monocyty izolowane były z krwi obwodowej pacjentów z opornym na GCS rzutem SM w poszczególnych punktach czasowych terapii plazmaferezą (pkt czas. I – pkt czas. III). Linie poziome reprezentują wartość mediany, linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 13. Surface expression profile of monocytes *in vitro* over the course of plasma exchange treatment.

Surface expression of CD16 (A.), CD40 (B.), CD80 (C.), CD86 (D.) and HLA-DR (E.) was assessed in monocytes after 48h culture in un-supplemented culture medium or under inflammatory stimulation with LPS or IFN- γ (M, LPS and IFN, respectively), Monocytes were isolated from peripheral blood of patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse at different time points over the course of plasma exchange treatment (pkt czas. I – pkt czas. III). Horizontal lines in the graph represents median values, vertical lines represent \pm SD.

IV-9. Wpływ plazmaferezy na generację monocytów CD16+ z monocytów CD14^{high}CD16- *in vitro*

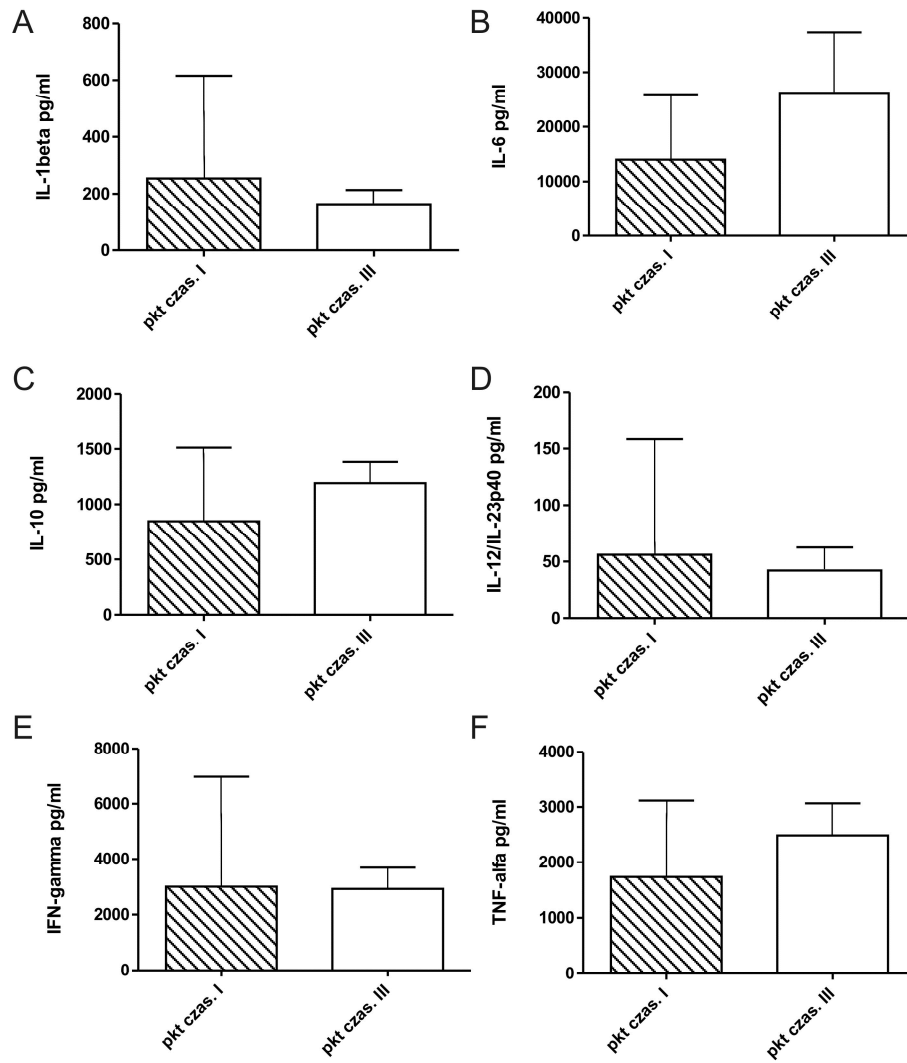
W celu charakteryzacji znaczenia funkcjonalnego obserwowanych *ex vivo* zmian struktury i fenotypu monocytów krwi obwodowej, we wszystkich punktach czasowych badania przeprowadzono analizę profilu ekspresji powierzchniowej monocytów poddawanych hodowli *in vitro*, w warunkach bez stymulacji, lub pod wpływem stymulacji LPS lub IFN- γ . Zastosowana w badaniu metoda izolacji magnetycznej nietkniętych („untouched”) monocytów, umożliwiła otrzymywanie, w powtarzalny sposób, czystej frakcji niezwiązanych z żadnymi odczynnikami „klasycznych” monocytów CD14^{high}CD16-. W przeprowadzonych eksperymentach, generacja monocytów CD16+ *de novo* w hodowli, utrzymywała się na niskim poziomie, bez istotnych różnic związanych z warunkami stymulacji. Nie obserwowano również wpływu zabiegów plazmaferezy na ekspresję CD16 na powierzchni monocytów w hodowli (ryc. 13. A), ani zależności tego parametru od odpowiedzi klinicznej na terapię (dane nie zostały zawarte w rycinie).

IV-10. Profil ekspresji powierzchniowej monocytów *in vitro* w przebiegu terapii plazmaferezą

W przeprowadzonych eksperymentach hodowlanych obserwowano odmienny wpływ zastosowanych warunków stymulacji (LPS vs. IFN- γ) na profil ekspresji powierzchniowej monocytów. Stymulacja IFN- γ powodowała, we wszystkich punktach czasowych badania, istotny wzrost procentu monocytów wykazujących ekspresję powierzchniową molekuł CD40 i CD80, w porównaniu z komórkami hodowanymi bez dodatkowej stymulacji lub stymulowanymi za pomocą LPS. Stymulacja LPS nie powodowała żadnych istotnych zmian w ekspresji CD40 i CD80 w porównaniu z komórkami nie stymulowanymi (ryc. 13. B i C).

W przeciwieństwie do molekuł CD40 i CD80, monocyty krwi obwodowej *ex vivo* wykazują wysoki procent ekspresji molekuly kostymulacyjnej CD86 jak również cząsteczek HLA-DR. W warunkach hodowli bez stymulacji lub pod wpływem stymulacji IFN- γ , ta charakterystyka fenotypowa nie ulegała zmianie. Stymulacja za pomocą LPS powodowała natomiast we wszystkich punktach czasowych badania istotny spadek ilości monocytów wykazujących ekspresję molekuł CD86 oraz HLA-DR, w porównaniu z komórkami nie stymulowanymi oraz z komórkami stymulowanymi za pomocą IFN- γ (ryc. 13. D i E). Nasilenie ekspresji powierzchniowej poszczególnych molekuł (oceniane w analizie cytometrycznej na podstawie średniej intensywności fluorescencji – ang. *mean fluorescence intensity* - MFI) na komórkach pozytywnych dla danego parametru wykazywało znaczne różnice osobnicze i nie było istotnie odmienne pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (dane nie zostały zawarte w rycinach).

Powyższe obserwacje miały stały charakter w przebiegu terapii plazmaferezą (ryc. 13. A-E) i nie wykazywały istotnego związku z odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie.



Ryc. 14. Profil sekrecji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej *in vitro* w przebiegu terapii plazmaferezą.

Sekrecja IL1- β (A.), IL-6 (B.), IL-10 (C.), podjednostki p40 IL-12/IL-23 (D.), IFN- γ (E.) oraz TNF- α (F.) oceniane były metodą Cytometric Bead Array System™ w nadsączach uzyskanych z 48-godzinnej hodowli PBMC w warunkach niespecyficznego stymulacji za pomocą PHA. PBMC pozyskiwane były z krwi obwodowej pacjentów z opornym na GCS rzutem SM w poszczególnych punktach czasowych terapii plazmaferezą. Rycina obrazuje wyniki analizy przeprowadzonej przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I) oraz po zakończeniu cyklu plazmaferezy (pkt czas. III). Linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

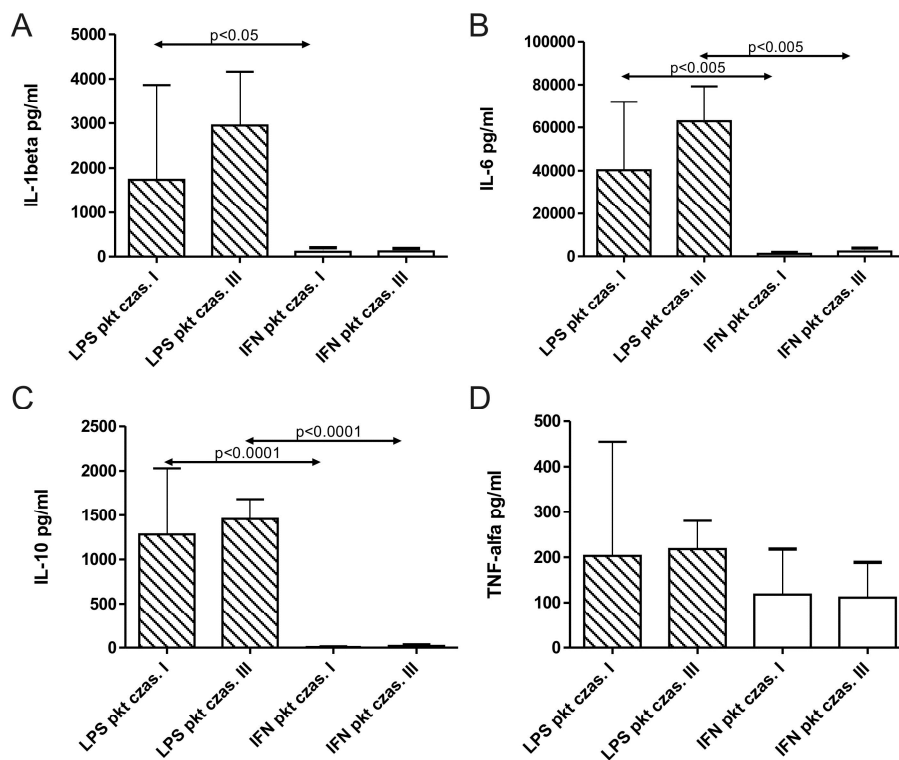
Fig. 14. Secretion profile of PBMC fraction *in vitro* over the course of plasma exchange treatment.

Secretion of IL1- β (A.), IL-6 (B.), IL-10 (C.), p40 subunit of IL-12/IL-23 (D.), IFN- γ (E.) and TNF- α (F.) was assessed with Cytometric Bead Array System™ in supernatants from 48h culture of PBMC under unspecific stimulation with PHA. PBMC were isolated from peripheral blood of patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse at different time points over the course of plasma exchange treatment. The figure shows the results obtained before first plasma exchange (pkt czas. I), and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III).

Vertical lines in the graph represent \pm SD.

IV-11. Profil sekrecji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej *in vitro* w przebiegu terapii plazmaferezą

Kolejnym etapem analizy funkcjonalnej wpływu plazmaferezy na układ immunologiczny pacjentów była ocena profilu sekrecji PBMC *in vitro* w warunkach niespecyficznego stymulacji za pomocą PHA. W przebiegu cyklu plazmaferezy, nie stwierdzono istotnych zmian w wydzielaniu przez całkowitą frakcję PBMC cytokin o charakterze prozapalnym: IL-1 β , IL-6, IL-12/IL-23 p40, IFN- γ , TNF- α oraz immunoregulacyjnym: IL-10, (ryc. 14. A-F).



Ryc. 15. Profil sekrecji monocytów krwi obwodowej *in vitro* w przebiegu terapii plazmaferezą.

Sekrecja IL1- β (A.), IL-6 (B.), IL-10 (C.) oraz TNF- α (D.) oceniana była metodą Cytometric Bead Array System™ w nadsączach uzyskanych z 48-godzinnej hodowli monocytów w warunkach stymulacji za pomocą LPS lub IFN- γ (warunki stymulacji oznaczone na rycinie odpowiednio: LPS i IFN). Monocyty izolowane były z krwi obwodowej pacjentów z opornym na GCS rzutem SM w poszczególnych punktach czasowych terapii plazmaferezą. Rycina obrazuje wyniki analizy przeprowadzonej przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I) oraz po zakończeniu cyklu plazmaferez (pkt czas. III). Linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 15. Secretion profile of peripheral blood monocytes *in vitro* over the course of plasma exchange treatment.

Secretion of IL-1 β (A.), IL-6 (B.), IL-10 (C.) and TNF- α (D.) was assessed with Cytometric Bead Array System™ in supernatants from 48h culture of monocytes under inflammatory stimulation with LPS or IFN- γ (LPS and IFN, respectively). Monocytes were isolated from peripheral blood of patients with GCS resistant multiple sclerosis relapse at different time points over the course of plasma exchange treatment. The figure shows the results obtained before first plasma exchange (pkt czas. I), and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III).

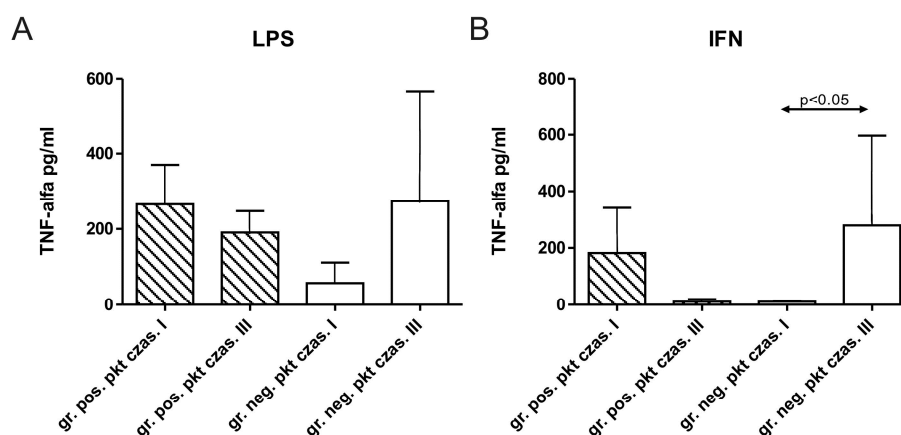
Vertical lines in the graph represent \pm SD.

IV-12. Zmiany profilu sekrecji monocytów *in vitro* w przebiegu terapii plazmaferezą

W badaniu dokonano również analizy profilu wydzielniczego monocytów izolowanych od pacjentów we wszystkich, objętych badaniem, punktach czasowych terapii plazmaferezą. Podobnie jak w przypadku analizy fenotypowej, monocyty hodowane były w medium hodowlanym bez dodatkowej stymulacji, lub w warunkach stymulacji LPS albo IFN- γ . Wydzielanie ocenianych cytokin: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12/IL-23 p40, TNF- α przez monocyty niestymulowane kształtowało się we wszystkich punktach czasowych poniżej granicy czułości pomiaru (<10 pg/mL). W przypadku podjednostki p40 IL-12/IL-23, bardzo niskie wartości stwierdzono również w hodowli monocytów stymulowanych za pomocą LPS i IFN- γ (dane nie zostały zawarte w rycinach).

We wszystkich punktach czasowych, stymulacja za pomocą LPS powodowała istotnie wyższą, w porównaniu ze stymulacją IFN- γ , sekrecję IL-1 β , IL-6 i IL-10 (ryc. 15. A-C). Natomiast wydzielanie TNF- α nie wykazywało różnic pomiędzy tymi dwoma warunkami stymulacji (ryc. 15. D). Analiza danych całej grupy pacjentów nie wykazała wpływu plazmaferez na powyższe parametry. Jednakże, po skorelowaniu profilu sekrecyjnego monocytów *in vitro* z danymi klinicznymi stwierdzono, iż w przebiegu plazmaferez u pacjentów z pozytywną odpowiedzią kliniczną wydzielanie TNF- α pod wpływem LPS i IFN- γ wykazywało tendencję spadkową (nie osiągając istotności statystycz-

nej), podczas gdy w podgrupie z negatywną reakcją terapeutyczną wydzielanie TNF- α rosło, osiągając – w warunkach stymulacji IFN- γ – wartości istotnie wyższe po zakończeniu terapii niż przed jej rozpoczęciem (ryc. 16. A i B, w rycinie pominięto punkt czasowy II)



Ryc. 16. Sekrecja TNF- α przez monocyty krwi obwodowej *in vitro* w zależności od odpowiedzi klinicznej na terapię plazmaferezą.

Sekrecja TNF- α oceniana była metodą Cytometric Bead Array System™ w nadsączach uzyskanych z 48-godzinnej hodowli monocytów w warunkach stymulacji za pomocą LPS (A.) lub IFN- γ (B.).

Rycina obrazuje wyniki analizy przeprowadzonej przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy (pkt czas. I) oraz po zakończeniu cyklu plazmaferez (pkt czas. III) u pacjentów wykazujących pozytywną odpowiedź kliniczną lub brak odpowiedzi klinicznej na zastosowaną terapię (odpowiednio: gr. poz., n = 11 oraz gr. neg., n = 3). Linie pionowe reprezentują wartość \pm SD.

Fig. 16. TNF- α secretion *in vitro* by peripheral blood monocytes obtained from plasma exchange responders and non-responders.

Secretion of TNF- α was assessed with Cytometric Bead Array System™ in supernatants from 48h-culture of monocytes under inflammatory stimulation with LPS (A.) or IFN- γ (B.). The figure shows the results obtained before first plasma exchange (pkt czas. I), and after completion of plasma exchange treatment (pkt czas. III) in patients responding or non-responding to plasma exchange treatment (B., gr. poz., n = 11 and gr. neg., n = 3, respectively).

Vertical lines in the graph represent \pm SD.

V. DYSKUSJA

Ostre pogorszenie objawów neurologicznych w przebiegu SM wpływa w sposób istotny na funkcjonowanie i komfort życia pacjentów, niejednokrotnie poszerzając zakres niesprawności lub pogłębiając już istniejące, utrwalone deficyty neurologiczne. Dlatego też, niezmiernie ważne jest jak najszybsze wprowadzenie skutecznej terapii pozwalającej na złagodzenie i skrócenie trwania rzutu choroby [1]. Pomimo braku potwierdzenia w wieloośrodkowych zrandomizowanych badaniach klinicznych, za „złoty standard” leczenia rzutu SM uważa się od wielu lat pulsacyjną, dożylną terapię wysokimi dawkami GCS [195]. U większości pacjentów leczenie tego typu przynosi pożądane korzyści terapeutyczne, umożliwiając w wielu przypadkach szybki powrót pacjentów do stanu neurologicznego sprzed zaostrzenia choroby. Niestety, w niewielkiej grupie pacjentów z rzutem SM terapia GCS nie powoduje poprawy klinicznej, nawet po zastosowaniu bardzo wysokich dawek preparatów dożylnych. Tego typu sytuacja kliniczna, nazywana opornym na GCS rzutem SM, wydaje się odpowiadać niewrażliwości na preparaty GCS, obserwowanej u 20-30% pacjentów z innymi chorobami o podłożu zapalnym [296]. Już przed ponad 10 laty wykazano, że skuteczną alternatywą terapeutyczną w przypadkach opornych na GCS rzutów SM mogą być zabiegi plazmaferez [261]. Wyniki te zostały potwierdzone przez kolejne badania, w których pozytywny efekt kliniczny terapii plazmaferezą obserwowano w około 70% przypadków rzutów SM opornych na GCS [262-265]. Jednakże, w dalszym ciągu nie rozwiązany pozostaje problem postępowania terapeutycznego w przypadkach opornych na GCS rzutów SM, w których nie uzyskano odpowiedzi klinicznej na terapię plazmaferezą. Z całą pewnością rozwiązanie tego problemu utrudnia brak wystarczających danych na temat mechanizmów immunologicznych i molekularnych pozytywnego działania plazmaferezy w SM, jak również brak pełnego zrozumienia przyczyn oporności na GCS w tej chorobie.

Powszechnie uważa się, iż pozytywne efekty kliniczne, uzyskiwane w przebiegu stosowania terapeutycznej wymiany osocza w chorobach o podłożu zapalnym, są w dużej mierze wynikiem usuwania z krwi obwodowej humoralnych elementów o aktywności immunologicznej [267]. Niewiele wiadomo jednak na temat wpływu zabiegów plazmaferezy na składniki komórkowe układu odpornościowego. Niniejsze badanie stanowi pierwszą w światowym piśmiennictwie kompleksową analizę podstawowych populacji komórek immunologicznych krwi obwodowej, z uwzględnieniem specyficznych podtypów komórek limfocytarnych oraz subpopulacji APC w przebiegu terapii plazmaferezą. Badanie zostało przeprowadzone w sposób prospektywny na unikalnej grupie pacjentów z opornymi na GCS rzutami SM. Spośród hospitalizowanych w Klinice Neurologii Uniwersytetu-Ruhr w Bochum, na przestrzeni lat 2008-2010, kilkudziesięciu pacjentów z rzutem SM nie wykazujących odpowiedzi klinicznej na wysokie dawki GCS, do badania zakwalifikowano 14 pacjentów, u których wdrożono terapię plazmaferezą w zalecanym oknie terapeutycznym (wynoszącym do 6 tygodni od początku zaostrzenia choroby) [297] oraz przeprowadzono analizę immunologiczną we wszystkich, ściśle określonych, punktach czasowych terapii gwarantujących ocenę parametrów immunologicznych przed rozpoczęciem, w trakcie i po zakończeniu cyklu plazmaferez.

W ramach przeprowadzonego badania stwierdzono istotne zwiększenie frakcji monocytów wykazujących ekspresję CD16 we krwi obwodowej pacjentów z rzutem SM opornym na GCS, w porównaniu z pacjentami dobrze reagującymi na terapię GCS oraz osobami zdrowymi. Co więcej, w przebiegu terapii plazmaferezą, równoległe do poprawy klinicznej następowała normalizacja tego parametru. W przeciwieństwie do monocytów CD16+, frakcja monocytów nie wykazujących ekspresji CD16 nie ulegała zmianom ilościowym w trakcie cyklu plazmaferez. Nie obserwowano również zmian ekspresji CD16 w obrębie populacji komórkowych innych niż monocyty.

W porównaniu z „klasycznymi” monocytami CD14^{high}CD16⁻, subpopulację monocytów wykazujących ekspresję CD16 i niższy stopień ekspresji CD14 (CD14^{low}CD16⁺) uważa się za komórki bardziej dojrzałe i charakteryzujące się silniej wyrażonymi właściwościami prozapalnymi [89]. W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, iż aktywowane monocyty CD16⁺ wykazują zdolność do wyjątkowo wysokiej produkcji TNF- α oraz innych cytokin prozapalnych m.in. IL-12, przy bardzo niewielkiej sekrecji IL-10 [298, 299]. Komórki te cechują się również większą niż monocyty CD14^{high}CD16⁻ efektywnością prezentacji antygenów specyficznym limfocytom T [300], co w połączeniu z obserwowaną redukcją aktywności fagocytarnej [301] wydaje się potwierdzać wyższe zaawansowanie procesu dojrzewania w tej subpopulacji monocytów. Sugeruje się także, iż obdarzone specyficznymi mechanizmami migracji oraz interakcji z komórkami śródbłonna [302-304] monocyty CD16⁺ wykazują szczególną tendencję do zasiedlania narządów obwodowych i różnicowania do komórek dendrytycznych o silnie wyrażonych właściwościach immunostymulacyjnych [305].

W zgodzie ze stwierdzonym w tym badaniu zwiększeniem frakcji monocytów wykazujących ekspresję CD16 u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM pozostają obserwacje wskazujące na ekspansję monocytów CD16⁺ w zróżnicowanych schorzeniach o podłożu zapalnym, takich jak: choroby infekcyjne [306], reumatoidalne zapalenie stawów [307], zapalna choroba jelit [308] czy choroba Graves-Basedowa [309]. Co ciekawe, w zapalnej chorobie jelit [310] oraz w przewlekłym zapaleniu wątroby [311] zaproponowano istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy ekspresją CD16 na monocytach a aktywnością procesu chorobowego. W kontekście wyników obecnego badania bardzo istotnym wydaje się być również fakt, iż efektywność kliniczną różnego rodzaju zabiegów aferezy stosowanych w terapii zapalnej choroby jelit, wiązano ze skutecznością deplecji monocytów CD16⁺ [310, 312]. Zwiększenie frakcji monocytów wykazujących ekspresję CD16 sugerowano również jako jeden z negatywnych czynników prognostycznych w raku dróg żółciowych [313].

W ostatnich latach, zarówno u ludzi [90] jak i innych naczelnych [91], we frakcji monocytów wykazujących ekspresję CD16 zostały wyróżnione obok

komórek CD14^{low}CD16+ także monocyty o fenotypie CD14^{high}CD16+. Nieliczne, przeprowadzone dotychczas, badania czynnościowe tej subpopulacji monocytów sugerują również ich odmienne właściwości funkcjonalne. W porównaniu z monocytami CD14^{low}CD16+, komórki CD14^{high}CD16+ charakteryzują się mniejszą produkcją TNF- α oraz zdolnością do wydzielania, pod wpływem bodźców pochodzenia patogenego, dużych ilości IL-10. Ponadto, wykazują one zmniejszoną zdolność do stymulacji wydzielania cytokin prozapalnych przez autologiczne limfocyty T [90]. Powyższe właściwości sugerują odmienną rolę monocytów CD14^{low}CD16+ i CD14^{high}CD16+ w reakcji immunologicznej. Potwierdzeniem tego założenia wydają się być prace prezentujące obie omawiane subpopulacje monocytów CD16+ jako odrębne parametry korelujące z przebiegiem klinicznym infekcji HIV [314], dengi [315], jak również niewydolności mięśnia sercowego [316] i ostrych incydentów wieńcowych [317] oraz udaru mózgu [318] czy też astmy oskrzelowej [319]. Zgodnie z powyższymi obserwacjami, również stwierdzone w tym badaniu zwiększenie frakcji monocytów CD16+ u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM zależne było specyficznie od ekspansji subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+. Aczkolwiek rola tej frakcji monocytów krwi obwodowej w immunopatologii SM pozostaje nieznana, potencjalne znaczenie funkcjonalne stwierdzonych u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM zaburzeń podkreśla fakt, iż subpopulacja CD14^{high}CD16+ charakteryzuje się najwyższym spośród monocytów krwi obwodowej człowieka poziomem ekspresji enzymu konwertującego angiotensynę (ang. *angiotensin converting enzyme* - ACE) [320]. Niedawno, występowanie we krwi obwodowej monocytów CD14^{high}CD16+ wykazujących wysoką ekspresję ACE zostało zaproponowane jako czynnik prognostyczny śmiertelności w grupie pacjentów ze skrajną niewydolnością nerek [321]. Obserwacje te nabierają szczególnego znaczenia w świetle danych na temat funkcji układu renina-angiotensyna w procesach immunoregulacyjnych, obejmujących m.in. bezpośredni wpływ na generację limfocytów T regulatorowych [175] oraz na proces różnicowania i funkcję komórek dendrytycznych [322, 323].

W 1998 roku grupa Ziegler-Heitbrock'a opisała szybką redukcję frakcji monocytów CD16+ krwi obwodowej w odpowiedzi na terapię GCS u pacjentów z SM [295]. Obserwacje te znalazły potwierdzenie w dalszych pracach przeprowadzonych na zróżnicowanych grupach pacjentów [324]. Na podstawie analiz molekularnych sugeruje się, że u podstaw tego zjawiska leży wzmożona ekspresja GR w tej subpopulacji monocytów oraz związany z aktywacją systemu kaspaz proces apoptozy [325]. Wyniki przeprowadzonych ostatnio badań sugerują jednak, że opisywany efekt terapii GCS nie dotyczy całej frakcji monocytów wykazujących ekspresję CD16, ale specyficzniej subpopulacji CD14^{low}CD16+. U pacjentów z astmą oskrzelową, ogólnoustrojowa terapia GCS powodowała zmniejszenie frakcji monocytów CD14^{low}CD16+ podczas gdy subpopulacja CD14^{high}CD16+ pozostawała niezmienną [319]. Wszyscy pacjenci, poddani terapii plazmaferezą w obecnym badaniu, otrzymywali uprzednio wysokie dawki GCS dożylnie. W celu potwierdzenia zależności obserwowanych zmian subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+ od specyficznego efektu terapii plazmaferezą, struktura frakcji monocytów wykazujących ekspresję CD16 została porównana pomiędzy pacjentami leczonymi plazmaferezą z powodu opornego na GCS rzutu SM a grupą pacjentów z rzutem SM wykazujących dobrą reakcję kliniczną na GCS oraz grupą kontrolną osób zdrowych. Zgodnie ze wcześniejszymi doniesieniami, u wszystkich pacjentów otrzymujących GCS – bez względu na obecność lub brak wskazań do dalszej terapii plazmaferezą – stwierdzono zmniejszenie subpopulacji monocytów CD14^{low}CD16+ w porównaniu z grupą osób zdrowych. W przeciwieństwie do tego, terapia GCS nie miała wpływu na subpopulację monocytów CD14^{high}CD16+, co pozwala z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć wpływ GCS na obserwowaną w przebiegu cyklu plazmaferez redukcję tej frakcji komórkowej.

Celem dalszej charakteryzacji stwierdzonych *ex vivo* zmian subpopulacji monocytów, w badaniu dokonano analizy wpływu terapii plazmaferezą na generację monocytów CD16+ *in vitro*. W przeprowadzonych eksperymentach

nie stwierdzono żadnych istotnych różnic w ekspresji CD16 na monocytach hodowanych w warunkach stymulacji LPS lub IFN- γ , w poszczególnych punktach czasowych terapii. Ten negatywny wynik sugeruje, iż mechanizmy immunologiczne związane z zabiegami plazmaferezy prowadzą raczej do nasilonej deplecji subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+, niż do zahamowania ich generacji pod wpływem bodźców prozapalnych.

Przeprowadzona w niniejszym badaniu analiza cytometryczna nie wykazała wpływu terapii plazmaferezą na strukturę głównych populacji limfocytarnych ani na liczebność całkowitej populacji monocytów krwi obwodowej pacjentów z opornym na GCS rzutem SM. W przebiegu cyklu plazmaferez nie stwierdzono również zmian w profilu sekrecji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. W odróżnieniu od tych wyników, w jedynej opublikowanej dotychczas pracy oceniającej w sposób bardziej szczegółowy populacje komórek immunologicznych krwi obwodowej pacjentów z SM poddawanych zabiegom plazmaferez, stwierdzono wzrost liczebności zarówno limfocytów T jak i komórek NK oraz monocytów [278]. Jednakże, wszyscy opisywani w tej pracy pacjenci otrzymywali terapię plazmaferezą w kombinacji z IFN- α , a konstrukcja badania nie pozwala różnicować efektów specyficznych dla poszczególnych – zastosowanych równolegle – metod terapeutycznych.

Związane z zabiegami plazmaferez zmiany ilościowe całkowitej populacji limfocytów T [280-283, 287] oraz proporcji pomiędzy limfocytami T CD4+ i limfocytami T CD8+ [280-283, 288], jak również zmiany liczebności komórek NK [279, 281, 283, 288], limfocytów B [280-284] i całkowitej populacji monocytów [288] opisywano również w innych niż SM stanach chorobowych. Należy jednak podkreślić znaczne zróżnicowanie prezentowanych we wspomnianych pracach wyników, w zależności od badanej jednostki chorobowej [279, 283], jak również pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów z tym samym schorzeniem [282, 284, 286]. Nie bez znaczenia jest ponadto fakt, iż wiele z towarzyszących plazmaferezie zmian populacji komórkowych było wynikiem powrotu do stanu normalnego nieprawidłowości immunologicznych

związanych z chorobą podstawową [279, 280, 283, 286]. Dotyczy to m.in. stwierdzonego w przebiegu cyklu plazmaferez wzrostu ilości Tregs we krwi obwodowej pacjentów z toczniem układowym, u których obserwowano wyjściowo istotne obniżenie tego parametru w porównaniu z grupą kontrolną [286]. Dodatkowo, większość z wymienionych prac została przeprowadzona bez zróżnicowania efektu wymiany osocza i stosowanej równolegle terapii immunosupresyjnej [281-285], co uniemożliwia bezpośrednie odniesienie ich wyników do obserwacji poczynionych w obecnym badaniu. Podobne zastrzeżenia dotyczą opisywanego dotychczas wpływu terapii plazmaferezą na profil sekrecyjny komórek krwi obwodowej, który różnił się znacznie w zależności od badanego schorzenia jak i stosowanej terapii dodatkowej [285, 289, 290].

W kontekście powyższych ograniczeń metodologicznych na szczególną uwagę zasługuje badanie nad efektem immunologicznym plazmaferezy przeprowadzone przez Yeh i wsp. na grupie 18 zdrowych ochotników, nieprzyjmujących żadnego leczenia immunosupresyjnego [291]. W pracy tej obserwowano wzrost proporcji limfocytów CD4+/CD8+ oraz liczebności limfocytów B, bez wpływu na całkowitą populację limfocytów T. Jednakże, analiza cytometryczna w tej grupie badawczej objęła swoim zakresem jedynie populacje limfocytarne. Co również istotne, pobranie krwi obwodowej następowało przed i bezpośrednio po zakończeniu zabiegu plazmaferezy [291]. W świetle dotychczasowych doświadczeń z procedurami medycznymi wykorzystującymi krążenie pozaustrojowe, tego typu schemat czasowy analizy może mieć znaczny wpływ na uzyskiwane wyniki [293, 294]. Badania przeprowadzone u pacjentów poddawanych hemodializie wykazały, iż w trakcie zabiegu dochodzi do istotnych zmian struktury populacji komórek immunologicznych. Po zakończeniu procedury, zmiany te ulegają spontanicznie stopniowemu wyrównaniu, osiągając wartości wyjściowe w czasie nie przekraczającym 10 godzin [293, 294]. Z tego względu, w odróżnieniu od pracy Yeh i wsp., w obecnym badaniu pobranie krwi obwodowej odbywało się we wszystkich przypadkach około 20 godzin po zakończeniu poprzedzającego

zabiegu plazmaferezy. Fakt ten, w połączeniu z heterogennością badanych populacji (osoby zdrowe vs. pacjenci z opornym na GCS rzutem SM), może być przyczyną uzyskania w niniejszym badaniu odmiennych wyników wpływu plazmaferezy na główne populacje limfocytarne.

Kolejnym etapem obecnego badania była analiza ocenianych parametrów immunologicznych w zależności od uzyskanego efektu klinicznego terapii plazmaferezą. Na podstawie niezależnej oceny klinicznej 11 pacjentów (79%) z opornym na GCS rzutem SM zakwalifikowano jako wykazujących pozytywną odpowiedź terapeutyczną, u pozostałych 3 pacjentów (21%) nie obserwowano żadnej poprawy stanu neurologicznego w wyniku przeprowadzonego cyklu plazmaferez. Co ciekawe, obserwowana w przebiegu terapii plazmaferezą redukcja subpopulacji monocytów CD14^{high}CD16+ okazała się specyficzna dla pacjentów prezentujących pozytywną odpowiedź kliniczną, podczas gdy u pacjentów bez poprawy stanu neurologicznego subpopulacja monocytów CD14^{high}CD16+ nie ulegała istotnym zmianom. Dodatkowo stwierdzono, iż przed rozpoczęciem cyklu plazmaferez subpopulacja monocytów CD14^{high}CD16+ była istotnie większa u pacjentów, którzy następnie wykazywali pozytywną odpowiedź na terapię. Obserwacja ta sugeruje możliwość wykorzystania frakcji monocytów CD14^{high}CD16+ jako czynnika prognostycznego odpowiedzi klinicznej na terapię plazmaferezą u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM. Jednakże, pomimo bardzo spójnych wyników uzyskanych w obu podgrupach pacjentów, zastosowanie kliniczne stwierdzonych odchyleń immunologicznych wymaga ich potwierdzenia i standaryzacji w badaniach wielośrodkowych, obejmujących swoim zakresem większe i zróżnicowane populacje pacjentów.

Bardzo istotnym wydaje się fakt, iż u pacjentów z negatywną odpowiedzią kliniczną na terapię plazmaferezą stwierdzono obniżenie ekspresji HLA-DR *ex vivo* w subpopulacji „klasycznych” monocytów CD14^{high}CD16-. Pomimo braku efektu klinicznego zastosowanej terapii, w przebiegu cyklu plazmaferez

parametr ten ulegał poprawie osiągając wartości obserwowane w grupie kontrolnej i podgrupie pacjentów z pozytywną odpowiedzią kliniczną.

Powyższe obserwacje wskazują na obecność u pacjentów z opornym na GCS rzutem SM zaburzeń immunologicznych, wykazujących odmienny charakter w zależności od odpowiedzi klinicznej na terapię plazmaferezą. Sugeruje to niejednorodność procesów immunopatologicznych prowadzących do objawów klinicznych rzutu SM w tych podgrupach pacjentów, a w dalszej konsekwencji również heterogenność mechanizmów oporności na GCS.

Już we wczesnym etapie badań nad patogenezą SM stwierdzono zaburzenia funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-nadnercza objawiające się u pacjentów m.in. podwyższonym poziomem kortyzolu i hormonu adrenokortykotropowego w surowicy oraz zmniejszoną odpowiedzią na test hamowania deksametazonem (ang. *dexamethasone suppression test*) [238, 239, 326]. Zaburzenia te znalazły odzwierciedlenie w badaniach autopsyjnych pacjentów z SM, których wyniki wskazywały na cechy przerostu nadnerczy oraz rozplem i aktywację podwzgórzowych neuronów wydzielających hormon uwalniający kortykotropinę [327, 328]. Powyższe obserwacje, w połączeniu z brakiem klinicznych cech hyperkortyzolemii, sugerują istnienie u pacjentów z SM zaburzeń wrażliwości na działanie GCS. Potwierdzeniem tego założenia stały się badania, w których wykazano różnego rodzaju nieprawidłowości działania GCS na komórki układu immunologicznego chorych na SM. U pacjentów z przewlekle postępującą postacią SM stwierdzono, iż specyficzne dla antygenów mielinowych limfocyty T wykazują oporność na indukowaną przez GCS apoptozę, a efekt ten jest zależny od ekspresji molekuł kostymulacyjnych z rodziny B7 (CD80 i CD86) [329]. Również w postaci remitująco-rzutowej choroby obserwowano zmniejszoną w porównaniu z osobami zdrowymi zdolność GCS do hamowania stymulowanego przez LPS wydzielania cytokin prozapalnych takich jak IL-6 i TNF- α [330, 331]. W opublikowanej ostatnio pracy, Ysrraelit i wsp. wykazali, że PBMC pacjentów z SM charakteryzują się zmniejszonym powinowactwem GR do znakowanego izotopem deksametazonu, przy niezmienionej liczbie miejsc wiążących. Zaburzonemu powinowactwu receptora do GCS towarzyszyło

obniżenie zdolności do hamowania proliferacji stymulowanych mitogenem PBMC oraz zwiększona produkcja cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α [332]. Co ciekawe, wiązane z obniżoną czułością receptora polimorfizmy genu GR, zostały pozytywnie skorelowane z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym SM [333, 334]. Jednakże, nie udało się wykazać związku tych polimorfizmów z wrażliwością na działanie GCS w tej chorobie [335]. Nieliczne przeprowadzone dotychczas prace sugerują również, iż zaburzenia wrażliwości na GCS mogą u pacjentów z SM ulegać zmianie w zależności od nasilenia procesu patologicznego oraz w wyniku zastosowanej terapii immunomodulacyjnej [330, 331].

W uogólnieniu, zgodnie z wynikami uzyskanymi w obecnym badaniu, opublikowane dotychczas prace implikują istnienie w całej populacji chorych na SM zaburzeń wrażliwości na GCS o niejednorodnym charakterze, zależnym m.in. od rodzaju przebiegu klinicznego choroby oraz od rodzaju i aktywności toczącej się reakcji immunologicznej. W zgodzie z tym stwierdzeniem pozostają wyniki badań Matysiak i wsp. wskazujące na obniżenie ekspresji wszystkich izoform GR oraz zaburzenie proporcji kompleksu GR/Hsp90 u chorych z opornym na GCS rzutem SM w porównaniu z pacjentami z zaostrzeniem choroby dobrze reagującymi na zastosowaną terapię [241]. Istnienie odmiennych mechanizmów aktywacji procesu zapalnego u chorych z zaostrzeniem SM wykazujących lub nie odpowiedź kliniczną na GCS, sugerują także różnice w zdolności GCS do hamowania sekrecji TNF- α przez komórki krwi obwodowej tych pacjentów [240]. Obserwowany w naszych eksperymentach odmienny wpływ leczenia plazmaferezą na sekrecję TNF- α przez monocyty uzyskane od pacjentów z pozytywną i negatywną odpowiedzią kliniczną na zastosowaną terapię, wydaje się dodatkowo potwierdzać istnienie dalszego zróżnicowania procesu zapalnego w grupie pacjentów z opornymi na GCS rzutami SM.

Podsumowując, uzyskane w obecnym badaniu wyniki wskazują na obecność w SM heterogennych mechanizmów immunopatologicznych, prowadzących do opornych na terapię GCS rzutów choroby. Zgodnie z poczynionymi

obserwacjami, skuteczność zastosowania w tej szczególnej sytuacji klinicznej terapii plazmaferezą może zależeć od charakteru i natężenia przebiegającego procesu zapalnego. Markerem rodzaju leżącej u podstaw pogorszenia klinicznego reakcji immunologicznej wydają się być poszczególne subpopulacje monocytów CD16+ i CD16-, aczkolwiek dokładna lokalizacja i rola tych komórek w procesie patologicznym pozostaje niejasna. Interpretację stwierdzonych w obecnym badaniu zaburzeń utrudnia niewielka ilość danych dostępnych na temat oporności na GCS w SM oraz mechanizmów efektywności plazmaferez w tej chorobie. Jednakże, podobne do postawionych tutaj wnioski przyniosły badania histopatologiczne wskazujące na wyraźną korelację pomiędzy pozytywną odpowiedzią kliniczną na plazmaferezę a obecnością w materiale biopsyjnym ognisk demielinizacyjnych o specyficznej charakterystyce immunopatologicznej [270, 336].

VI. WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE

1. Terapia plazmaferezą powoduje u pacjentów z opornym na glukokortykosteroidy rzutem stwardnienia rozsianego równoległe do poprawy klinicznej zmniejszenie frakcji monocytów krwi obwodowej wykazujących ekspresję molekuly CD16.
2. Obserwowana w przebiegu cyklu plazmaferez redukcja monocytów wykazujących ekspresję CD16 jest specyficzna dla subpopulacji CD14^{high}CD16+, podczas gdy subpopulacja CD14^{low}CD16+ nie ulega zmianie w wyniku terapii.
3. W odróżnieniu od subpopulacji monocytów CD14^{low}CD16+, subpopulacja monocytów CD14^{high}CD16+ nie wykazuje zmian zależnych od terapii GCS, w związku z czym jej redukcja wydaje się być wynikiem mechanizmów immunologicznych właściwych dla terapii plazmaferezą.
4. Korelacja obserwowanych parametrów immunologicznych z danymi klinicznymi wskazuje, że zachodzące w wyniku cyklu plazmaferez zmiany frakcji monocytów wykazujących ekspresję molekuly CD16 są specyficzne dla pacjentów z pozytywną reakcją na zastosowaną terapię.
5. Zwiększenie subpopulacji CD14^{high}CD16+ przed rozpoczęciem cyklu plazmaferez w badanej grupie pacjentów z opornym na glukokortykosteroidy rzutem SM było czynnikiem prognostycznym dobrej odpowiedzi klinicznej.

6. Pacjenci z opornym na glukokortykosteroidy rzutem stwardnienia rozsianego nie reagujący poprawą kliniczną na terapię plazmaferezą charakteryzują się odmiennym wzorcem zaburzeń immunologicznych, pod postacią obniżonej ekspresji molekuly HLA-DR w subpopulacji „klasycznych” monocytów CD14^{high}CD16- przed rozpoczęciem terapii oraz wzrostem sekrecji TNF- α po leczeniu plazmaferezą.
7. Terapia plazmaferezą nie powoduje u pacjentów z opornym na glukokortykosteroidy rzutem stwardnienia rozsianego zmian struktury podstawowych populacji limfocytarnych (w tym regulatorowych limfocytów T, komórek NK i komórek NKT) oraz subpopulacji komórek dendrytycznych krwi obwodowej.
8. W wyniku terapeutycznej wymiany osocza u pacjentów z opornym na glukokortykosteroidy rzutem stwardnienia rozsianego nie dochodzi do zmian profilu sekrecji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej *in vitro*.

VII. WNIOSKI OGÓLNE

1. Terapia plazmaferezą wpływa w istotny sposób na strukturę, fenotyp i funkcję komórek immunologicznych krwi obwodowej pacjentów z rzutem stwardnienia rozsianego opornym na glukokortykosteroidy.
2. Efekt wywierany przez plazmaferezę na parametry immunologiczne jest zróżnicowany w zależności od odpowiedzi klinicznej na zastosowaną terapię i ma najprawdopodobniej związek z odmiennymi mechanizmami molekularnymi i immunologicznymi oporności na glukokortykosteroidy w poszczególnych grupach pacjentów.
3. Analiza subpopulacji komórek immunologicznych krwi obwodowej może znaleźć potencjalne zastosowania kliniczne w kwalifikacji pacjentów z opornym na glukokortykosteroidy rzutem stwardnienia rozsianego do terapii plazmaferezą, jak również w projektowaniu skutecznych metod leczenia w przypadku pacjentów nie odnoszących korzyści z terapeutycznej wymiany osocza.

IX. SPIS PUBLIKACJI WŁASNYCH

Dorobek autora związany tematycznie z pracą habilitacyjną:

1. Dedecjus M, **Stasiolek M***, Brzezinski J, Selmaj K, Lewinski A. Thyroid Hormones Influence Human Dendritic Cells' Phenotype, Function and Subsets Distribution. *Thyroid* 2010; doi:10.1089/thy.2010.0183.
2. Bayas A, **Stasiolek M***, Kruse N, Toyka KV, Selmaj K, Gold R. Altered innate immune response of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157:332-342.
3. Matysiak M, **Stasiolek M***, Orłowski W, Jurewicz A, Janczar S, Raine CS, Selmaj K. Stem cells ameliorate EAE via an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mechanism. *J Neuroimmunol.* 2008; 193:12-23.
4. **Stasiolek M**, Bayas A, Kruse N, Wieczarkowicz A, Toyka KV, Gold R, Selmaj K. Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2006; 129:1293-1305
5. **Stasiolek M**, Gavriilyuk V, Sharp A, Horvath P, Selmaj K, Feinstein DL. Inhibitory and stimulatory effects of lactacystin on expression of nitric oxide synthase type 2 in brain glial cells. The role of Ikappa B-beta. *J Biol Chem.* 2000; 275:24847-24856.

* równorzędny z pierwszym autorem

X. PIŚMIENICTWO

1. Selmaj K. Stwardnienie rozsiane. Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2006.
2. Probert L, Selmaj K. TNF and related molecules: trends in neuroscience and clinical applications. *J Neuroimmunol.* 1997; 72:113-117.
3. Hohlfeld R, Londei M, Massacesi L, Salvetti M. T-cell autoimmunity in multiple sclerosis. *Immunol Today.* 1995; 16:259-261.
4. Hafler DA, Weiner HL. Immunologic mechanisms and therapy in multiple sclerosis. *Immunol Rev.* 1995; 144:75-107.
5. Raine CS. The Norton Lecture: A review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol.* 1997; 77:135-152.
6. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000; 47:707-717.
7. Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, Koch-Henriksen N, Lucchinetti CF, Sørensen PS i wsp. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2010; 133:2983-2998.
8. Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2000; 48:893-901.
9. Schirmer L, Antel JP, Brück W, Stadelmann C. Axonal Loss and Neurofilament Phosphorylation Changes Accompany Lesion Development and Clinical Progression in Multiple Sclerosis. *Brain Pathol.* 2010; doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00466.x.
10. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain.* 2006; 129:1507-1516.
11. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M I wsp. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009; 132:1175-1189.
12. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M i wsp. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol.* 2011; 69:83-89.
13. Raine CS, McFarland HF, Tourtellotte WW. Multiple Sclerosis. Clinical and pathological basis. London: Chapman & Hall, 1997.
14. Brinkman CJ, Nillesen WM, Hommes OR, Lamers KJ, de Pauw BE, Delmotte P. Cell-mediated immunity in multiple sclerosis as determined by sensitivity of different lymphocyte populations to various brain tissue antigens. *Ann Neurol.* 1982; 11:450-455.
15. Hafler DA, Benjamin DS, Burks J, Weiner HL. Myelin basic protein and proteolipid protein reactivity of brain- and cerebrospinal fluid-derived T cell clones in multiple sclerosis and postinfectious encephalomyelitis. *J Immunol.* 1987; 139:68-72.

16. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J i wsp. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med.* 1997; 75:77-88.
17. Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein in development and disease. *Dev Neurosci.* 1983-1984; 6:285-303.
18. van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, el Ouagmiri M, Polman CH, Lassmann H i wsp. The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature.* 1995; 375:798-801.
19. Wekerle H. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Curr Opin Neurobiol.* 1993; 3:779-784.
20. Peruga I, Hartwig S, Thöne J, Hovemann B, Gold R, Juckel G i wsp. Inflammation modulates anxiety in an animal model of multiple sclerosis. *Behav Brain Res.* 2011; 220:20-29.
21. Mokhtarian F, McFarlin DE, Raine CS. Adoptive transfer of myelin basic protein-sensitized T cells produces chronic relapsing demyelinating disease in mice. *Nature.* 1984; 309:356-358.
22. Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK i wsp. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61:23-32.
23. Owens T, Wekerle H, Antel S. Genetic models for CNS inflammation. *Nature Med.* 2001; 7:161-166.
24. Das MP, Nicholson LB, Greer JM, Kuchroo VK. Autopathogenic T helper cell type 1 (Th1) and protective Th2 clones differ in their recognition of the autoantigenic peptide of myelin proteolipid protein. *J Exp Med.* 1997; 186:867-876.
25. Falcone M, Bloom BR. A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1997; 185:901-907.
26. Wildbaum G, Youssef S, Grabie N, Karin N. Neutralizing antibodies to IFN-gamma-inducing factor prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1998; 161:6368-6374.
27. Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, Nicholson LB. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:101-123.
28. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996; 17:138-146.
29. Nicholson LB, Kuchroo VK. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8:837-842.
30. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003; 278:1910-1914.

31. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka K i wsp. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005; 237:123-130.
32. Komiya Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S i wsp. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006; 177:566-573.
33. Gocke AR, Cravens PD, Ben LH, Hussain RZ, Northrop SC, Racke MK i wsp. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol.* 2007; 178:1341-1348.
34. O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC i wsp. Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008; 181:3750-3754.
35. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Caggiola M i wsp. IL17 and IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine.* 2008; 44:22-25.
36. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N i wsp. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009; 66:390-402.
37. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P i wsp. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med.* 2010; 16:406-412.
38. Berer K, Wekerle H, Krishnamoorthy G. B cells in spontaneous autoimmune diseases of the central nervous system. *Mol Immunol.* 2010; doi:10.1016/j.molimm.2010.10.025
39. Walsh MJ, Tourtellotte WW, Roman J, Dreyer W. Immunoglobulin G, A, and M--clonal restriction in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum--analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985; 35:313-327.
40. Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, Murray RS, Bernard CC, Oksenberg JR. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol.* 1999; 163:5133-5144.
41. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I i wsp. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med.* 2003; 349:139-145.
42. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10:153-187.
43. Stasiolek M, Bayas A, Kruse N, Wiczarkowicz A, Toyka KV, Gold R i wsp. Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2006; 129:1293-1305.
44. Bayas A, Stasiolek M, Kruse N, Toyka KV, Selmaj K, Gold R. Altered innate immune response of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157:332-342.

45. Stasiolek M. The role of selected immunoregulatory cell populations in the autoimmune demyelination. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011; 32:101-109
46. Lünemann A, Tackenberg B, Deangelis T, Barreira da Silva R, Messmer B, Vanoaica LD i wsp. Impaired IFN- γ production and proliferation of NK cells in Multiple Sclerosis. *Int Immunol.* 2011; 23:139-148.
47. O'Keefe J, Gately CM, Counihan T, Hennessy M, Leahy T, Moran AP i wsp. T-cells expressing natural killer (NK) receptors are altered in multiple sclerosis and responses to alpha-galactosylceramide are impaired. *J Neurol Sci.* 2008; 275:22-28.
48. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010; 221:7-14.
49. Burger DR, Ford D, Vetto RM, Hamblin A, Goldstein A, Hubbard M i wsp. Endothelial cell presentation of antigen to human T cells. *Hum Immunol.* 1981; 3:209-230.
50. Geppert TD, Lipsky PE. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J Immunol.* 1985; 135:3750-3762.
51. Fierz W, Endler B, Reske K, Wekerle H, Fontana A. Astrocytes as antigen-presenting cells. I. Induction of Ia antigen expression on astrocytes by T cells via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J Immunol.* 1985; 134:3785-3793.
52. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245-252.
53. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:151-161.
54. Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S i wsp. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature.* 1997; 387:713-717.
55. Croft M, Duncan DD, Swain SL. Response of naive antigen-specific CD4⁺ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med.* 1992; 176:1431-1437.
56. Brossart P, Bevan MJ. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood.* 1997; 90:1594-1599.
57. Volkman A, Zal T, Stockinger B. Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J Immunol.* 1997; 158:693-706.
58. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B i wsp. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13:715-725.
59. Agrawal S, Gupta S, Agrawal A. Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses. *PLoS One.* 2010; 5:e13418.

60. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R i wsp. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999; 283:1183-1186.
61. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ i wsp. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG Oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004; 173:4433-4442.
62. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA i wsp. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med*. 2007; 204:105-115.
63. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S i wsp. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000; 165:6037-6046.
64. Dittel BN, Visintin I, Merchant RM, Janeway CA Jr. Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1999; 163:32-39.
65. Weir CR, Nicolson K, Bäckström BT. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in naive mice by dendritic cells presenting a self-peptide. *Immunol Cell Biol*. 2002; 80:14-20.
66. Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 2000; 157:1991-2002.
67. Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H, Xiao BG. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. *Clin Exp Immunol*. 2000; 122:437-444.
68. Menges M, Rössner S, Voigtländer C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C i wsp. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*. 2002; 195:15-21.
69. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol*. 2007; 8:172-180.
70. Bailey-Bucktrout SL, Caulkins SC, Goings G, Fischer JA, Dzionek A, Miller SD. Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008; 180:6457-6461.
71. Schwab N, Zozulya AL, Kieseier BC, Toyka KV, Wiendl H. An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2010; 184:5368-5374.
72. López C, Comabella M, Al-zayat H, Tintoré M, Montalban X. Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients. *J Neuroimmunol*. 2006; 175:183-191.

73. Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Söderström M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain*. 2001; 124:480-492.
74. Longhini AL, von Glehn F, Brandão CO, de Paula RF, Pradella F, Moraes AS i wsp. Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. *J Neuroinflammation*. 2011; 8:2.
75. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL i wsp. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65:124-141.
76. Lande R, Gafa V, Serafini B, Giacomini E, Visconti A, Remoli M i wsp. Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67:388-401.
77. Navarro J, Aristimuño C, Sánchez-Ramón S, Vigil D, Martínez-Ginés ML, Fernández-Cruz E i wsp. Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy. *J Neuroimmunol*. 2006; 176:153-161.
78. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20:52-60.
79. Danis VA, Franic GM, Rathjen DA, Brooks PM. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma), tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-6 on the production of immunoreactive IL-1 and TNF-alpha by human monocytes. *Clin Exp Immunol*. 1991; 85:143-150.
80. Hart PH, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity. *J Immunol*. 1988; 141:1516-1521.
81. Hart PH, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Control by IFN-gamma and PGE2 of TNF alpha and IL-1 production by human monocytes. *Immunology*. 1989; 66:376-383.
82. Bailly S, Ferrua B, Fay M, Gougerot-Pocidal MA. Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine*. 1990; 2:205-210.
83. Ribbens C, Dayer JM, Chizzolini C. CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but may not be sufficient for human T helper 1 cell induction of interleukin-2- or interleukin-15-driven, contact-dependent, interleukin-1beta production by monocytes. *Immunology*. 2000; 99:279-286.
84. Burger D, Dayer JM. The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction. *Arthritis Res*. 2002; 4:169-176.
85. Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med*. 2006; 203:583-597.
86. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007; 81:584-592.

87. Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma*. 1988; 7:521-527.
88. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989; 74:2527-2534.
89. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C i wsp. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993; 23:2053-2058.
90. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008; 67:152-159.
91. Kim WK, Sun Y, Do H, Autissier P, Halpern EF, Piatak M Jr i wsp. Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *J Leukoc Biol*. 2010; 87:557-567.
92. Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol*. 2007; 178:2000-2007.
93. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*. 1998; 282:480-483.
94. León B, López-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 2007; 26:519-531.
95. Ifergan I, Kébir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, Cayrol R i wsp. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain*. 2008; 131:785-799.
96. Mildner A, Mack M, Schmidt H, Brück W, Djukic M, Zabel MD i wsp. CCR2+Ly-6C^{hi} monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain*. 2009; 132:2487-2500.
97. King IL, Dickendeshler TL, Segal BM. Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*. 2009; 113:3190-3197.
98. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK i wsp. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007; 179:5228-5237.
99. Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G i wsp. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler*. 2011; 17:2-15.
100. Bahbouhi B, Pettré S, Berthelot L, Garcia A, Elong Ngono A, Degauque N i wsp. T cell recognition of self-antigen presenting cells by protein transfer assay reveals a high frequency of anti-myelin T cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2010; 133:1622-1636.

101. Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung HP i wsp. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005; 159:155-164.
102. Jensen MA, Yanowitch RN, Reder AT, White DM, Arnason BG. Immunoglobulin-like transcript 3, an inhibitor of T cell activation, is reduced on blood monocytes during multiple sclerosis relapses and is induced by interferon beta-1b. *Mult Scler.* 2010; 16:30-38.
103. van Boxel-Dezaire AH, Zula JA, Xu Y, Ransohoff RM, Jacobberger JW, Stark GR. Major differences in the responses of primary human leukocyte subsets to IFN-beta. *J Immunol.* 2010; 185:5888-5899.
104. Wipfler P, Oppermann K, Pilz G, Afazel S, Haschke-Becher E, Harrer A i wsp. Adhesion molecules are promising candidates to establish surrogate markers for natalizumab treatment. *Mult Scler.* 2011; 17:16-23.
105. Wiesemann E, Deb M, Trebst C, Hemmer B, Stangel M, Windhagen A. Effects of interferon-beta on co-signaling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes in relation to clinical response to interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008; 14:166-176.
106. Burger D, Molnarfi N, Weber MS, Brandt KJ, Benkhoucha M, Gruaz L i wsp. Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist but decreases T cell-induced IL-1beta in human monocytes and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:4355-4359.
107. Carpintero R, Brandt KJ, Gruaz L, Molnarfi N, Lalive PH, Burger D. Glatiramer acetate triggers PI3K δ /Akt and MEK/ERK pathways to induce IL-1 receptor antagonist in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:17692-17697.
108. Comabella M, Lünemann JD, Río J, Sánchez A, López C, Julià E i wsp. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain.* 2009; 132:3353-3365.
109. Huang YM, Hussien Y, Yarilin D, Xiao BG, Liu YJ, Link H. Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells. *Cytokine.* 2001; 13:264-271.
110. Huang YM, Stoyanova N, Jin YP, Teleshova N, Hussien Y, Xiao BG i wsp. Altered phenotype and function of blood dendritic cells in multiple sclerosis are modulated by IFN-beta and IL-10. *Clin Exp Immunol.* 2001; 124:306-314.
111. Hussien Y, Sanna A, Söderström M, Link H, Huang YM. Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001; 121:102-110.
112. Berghella AM, Totaro R, Pellegrini P, Contasta I, Russo T, Carolei A i wsp. Immunological study of IFNbeta-1a-treated and untreated multiple sclerosis patients: clarifying IFNbeta mechanisms and establishing specific dendritic cell immunotherapy. *Neuroimmunomodulation.* 2005; 12:29-44.

113. Bartosik-Psujek H, Tabarkiewicz J, Pocinska K, Stelmasiak Z, Rolinski J. Immunomodulatory effects of vitamin D on monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010; 16:1513-1516.
114. Lechmann M, Kremmer E, Sticht H, Steinkasserer A. Overexpression, purification, and biochemical characterization of the extracellular human CD83 domain and generation of monoclonal antibodies. *Protein Expr Purif.* 2002; 24:445-452.
115. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995; 154:3821-3835.
116. Kozlow EJ, Wilson GL, Fox CH, Kehrl JH. Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. *Blood.* 1993; 81:454-461.
117. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaeerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A i wsp. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol.* 2007; 37:686-695.
118. Iking-Konert C, Csekö C, Wagner C, Stegmaier S, Andrassy K, Hänsch GM. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med.* 2001; 79:464-474.
119. Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol.* 2001; 13:959-967.
120. Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Hellström KE, Hellström I, Ledbetter JA. CD83 is an I-type lectin adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *J Immunol.* 2001; 166:3865-3872.
121. Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol.* 2002; 168:2599-2602.
122. Hirano N, Butler MO, Xia Z, Ansén S, von Bergwelt-Baildon MS, Neuberg D i wsp. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood.* 2006; 107:1528-1536.
123. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG i wsp. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med.* 2001; 194:1813-1821.
124. Fujimoto Y, Tu L, Miller AS, Bock C, Fujimoto M, Doyle C i wsp. CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell.* 2002; 108:755-767.
125. García-Martínez LF, Appleby MW, Staehling-Hampton K, Andrews DM, Chen Y, McEuen M i wsp. A novel mutation in CD83 results in the development of a unique population of CD4+ T cells. *J Immunol.* 2004; 173:2995-3001.
126. Allavena P, Badolato R, Facchetti F, Vermi W, Paganin C, Luini W i wsp. Monocytes from Wiskott-Aldrich patients differentiate in functional mature dendritic cells with a defect in CD83 expression. *Eur J Immunol.* 2001; 31:3413-3421.

127. Henry J, Miller MM, Pontarotti P. Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol Today*. 1999; 20:285-288.
128. Zeng C, Wu T, Zhen Y, Xia XP, Zhao Y. BTLA, a new inhibitory B7 family receptor with a TNFR family ligand. *Cell Mol Immunol*. 2005; 2:427-432.
129. Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol*. 2001; 22:217-223.
130. Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11:203-210.
131. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol*. 1999; 162:5813-5820.
132. Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschach RB, Sharpe AH. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11:294-300.
133. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*. 1997; 6:411-417.
134. Gravestien LA, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol*. 1998; 10:423-434.
135. Lane PJ, Brocker T. Developmental regulation of dendritic cell function. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11:308-313.
136. van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol*. 1997; 9:330-337.
137. Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol*. 2009; 21:265-272.
138. Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol*. 2001; 167:3174-3181.
139. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996; 184:747-752.
140. Frasca L, Scottà C, Lombardi G, Piccolella E. Human anergic CD4⁺ T cells can act as suppressor cells by affecting autologous dendritic cell conditioning and survival. *J Immunol*. 2002; 168:1060-1068.
141. Notarangelo LD, Peitsch MC, Abrahamsen TG, Bachelot C, Bordigoni P, Cant AJ i wsp. CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today*. 1996; 17:511-516.
142. Mehling A, Loser K, Varga G, Metz D, Luger TA, Schwarz T i wsp. Overexpression of CD40 ligand in murine epidermis results in chronic skin inflammation and systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2001; 194:615-628.

143. Levings MK, Roncarolo MG. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106:109-112.
144. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994; 265:1237-1240.
145. Sun D, Ben-Nun A, Wekerle H. Regulatory circuits in autoimmunity: recruitment of counter-regulatory CD8+ T cells by encephalitogenic CD4+ T line cells. *Eur J Immunol.* 1988; 18:1993-1999.
146. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009 May;30[5]:626-35.
147. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA i wsp. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2001; 2:301-306.
148. Bayer AL, Yu A, Malek TR. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007; 178:4062-4071.
149. Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol.* 2008; 28:635-639.
150. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol.* 2009; 70:326-336.
151. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z i wsp. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006; 212:8-27.
152. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K i wsp. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med.* 2003; 198:235-247.
153. Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood.* 2007; 110:4293-4302.
154. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998; 188:287-296.
155. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M i wsp. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998; 10:1969-1980.
156. Huter EN, Stummvoll GH, DiPaolo RJ, Glass DD, Shevach EM. Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease. *J Immunol.* 2008; 181:8209-8213.
157. Yu P, Gregg RK, Bell JJ, Ellis JS, Divekar R, Lee HH i wsp. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol.* 2005; 174:6772-6780.

158. Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, Landolfi R, Cammarota G. Cellular mediators of inflammation: tregs and TH17 cells in gastrointestinal diseases. *Mediators Inflamm.* 2009; 2009:132028.
159. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol.* 2006; 7:401-410.
160. Pacholczyk R, Kern J, Singh N, Iwashima M, Kraj P, Ignatowicz L. Nonsel-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity.* 2007; 27:493-504.
161. Stephens GL, Shevach EM. Foxp3+ regulatory T cells: selfishness under scrutiny. *Immunity.* 2007; 27:417-419.
162. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW i wsp. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med.* 2002; 196:505-515.
163. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004; 5:266-271.
164. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH i wsp. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002; 8:1024-1032.
165. 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; 155:1151-1164.
166. Pandolfi F, Pierdominici M, Marziali M, Livia Bernardi M, Antonelli G, Galati V i wsp. Low-dose IL-2 reduces lymphocyte apoptosis and increases naive CD4 cells in HIV-1 patients treated with HAART. *Clin Immunol.* 2000; 94:153-159.
167. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z i wsp. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008; 322:271-275.
168. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L i wsp. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008; 180:5916-5926.
169. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007; 13:108-116.
170. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004; 21:589-601.
171. Stephens LA, Malpass KH, Anderton SM. Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol.* 2009; 39:1108-1117.
172. Polanczyk MJ, Hopke C, Huan J, Vandenbark AA, Offner H. Enhanced FoxP3 expression and Treg cell function in pregnant and estrogen-treated mice. *J Neuroimmunol.* 2005; 170:85-92.

173. Chen X, Winkler-Pickett RT, Carbonetti NH, Ortaldo JR, Oppenheim JJ, Howard OM. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36:671-680.
174. Ephrem A, Chamat S, Miquel C, Fisson S, Mouthon L, Caligiuri G i wsp. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood.* 2008; 111:715-722.
175. Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV i wsp. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:14948-14953.
176. Benkhoucha M, Santiago-Raber ML, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T i wsp. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:6424-6429.
177. Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:6449-6454.
178. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL i wsp. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology.* 2008; 123:79-89.
179. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Caggiula M, Marti A i wsp. Regulatory T cells fail to suppress CD4T+-bet+ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology.* 2009; 127:418-428.
180. Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, D'hooghe MB i wsp. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res.* 2006; 83:1432-1446.
181. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A i wsp. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2005; 35:3343-3352.
182. Fransson ME, Liljenfeldt LS, Fagius J, Tötterman TH, Loskog AS. The T-cell pool is anergized in patients with multiple sclerosis in remission. *Immunology.* 2009; 126:92-101.
183. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C i wsp. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009; 183:7602-7610.
184. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004; 199:971-979.

185. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D i wsp. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2006; 180:178-184.
186. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol.* 2008; 180:6411-6420.
187. Korporal M, Haas J, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Moeller S i wsp. Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol.* 2008; 65:1434-1439.
188. Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69:1017-1033.
189. Trebst C, König F, Ransohoff R, Brück W, Stangel M. CCR5 expression on macrophages/microglia is associated with early remyelination in multiple sclerosis lesions. *Mult Scler.* 2008; 14:728-733.
190. Kim S, Steelman AJ, Koito H, Li J. Astrocytes promote TNF-mediated toxicity to oligodendrocyte precursors. *J Neurochem.* 2011; 116:53-66.
191. Ransohoff RM, Estes ML. Astrocyte expression of major histocompatibility complex gene products in multiple sclerosis brain tissue obtained by stereotactic biopsy. *Arch Neurol.* 1991; 48:1244-1246.
192. Tzartos JS, Craner MJ, Friese MA, Jakobsen KB, Newcombe J, Esiri MM i wsp. IL-21 and IL-21 Receptor Expression in Lymphocytes and Neurons in Multiple Sclerosis Brain. *Am J Pathol.* 2011; 178:794-802.
193. Aharoni R. Immunomodulatory drug treatment in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2010; 10:1423-1436.
194. Gold R. Oral therapies for multiple sclerosis: a review of agents in phase III development or recently approved. *CNS Drugs.* 2011; 25:37-52.
195. Tumani H. Corticosteroids and plasma exchange in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008; 255:36-42.
196. Torkildsen O, Vedeler CA, Ulvestad E, Aarseth JH, Nyland HI, Myhr KM. High dose methylprednisolone induces FcγRI on granulocytes in MS-patients. *J Neuroimmunol.* 2005; 167:138-142.
197. Jalousinski M, Karolczak K, Mazurek A, Glabinski A. The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2008; 118:120-125.
198. Blecharz KG, Haghikia A, Stasiolek M, Kruse N, Drenckhahn D, Gold R i wsp. Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010; 16:293-302.

199. Gelati M, Corsini E, De Rossi M, Masini L, Bernardi G, Massa G i wsp. Methylprednisolone acts on peripheral blood mononuclear cells and endothelium in inhibiting migration phenomena in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2002; 59:774-780.
200. Sun YY, Wang CY, Hsu MF, Juan SH, Chang CY, Chou CM i wsp. Glucocorticoid protection of oligodendrocytes against excitotoxin involving hypoxia-inducible factor-1alpha in a cell-type-specific manner. *J Neurosci.* 2010; 30:9621-9630.
201. Chesik D, De Keyser J. Progesterone and dexamethasone differentially regulate the IGF-system in glial cells. *Neurosci Lett.* 2010; 468:178-182.
202. Orchinik M, Murray TF, Moore FL. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science.* 1991; 252:1848-1851.
203. Gold R, Buttgereit F, Toyka KV. Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol.* 2001; 117:1-8.
204. Stahn C, Buttgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008; 4:525-533.
205. Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1069:1-9.
206. Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 120:76-85.
207. Tephly LA, Carter AB. Differential expression and oxidation of MKP-1 modulates TNF-alpha gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 37:366-374.
208. Quante T, Ng YC, Ramsay EE, Henness S, Allen JC, Parmentier J i wsp. Corticosteroids reduce IL-6 in ASM cells via up-regulation of MKP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 39:208-217.
209. Turpeinen T, Nieminen R, Moilanen E, Korhonen R. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in A549 human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 333:310-318.
210. Shepherd EG, Zhao Q, Welty SE, Hansen TN, Smith CV, Liu Y. The function of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages. *J Biol Chem.* 2004; 279:54023-54031.
211. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ i wsp. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med.* 2006; 203:7-13.
212. Gougat C, Jaffuel D, Gagliardo R, Henriquet C, Bousquet J, Demoly P i wsp. Overexpression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms inhibits AP-1 and NF-kappaB activities hormone independently. *J Mol Med.* 2002; 80:309-318.
213. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:6891-6903.

214. Maneechotesuwan K, Yao X, Ito K, Jazrawi E, Usmani OS, Adcock IM i wsp. Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. *PLoS Med.* 2009; 6:e1000076.
215. Schmidt J, Gold R, Schönrock L, Zettl UK, Hartung HP, Toyka KV. T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain.* 2000; 123:1431-1441.
216. Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP. Increased apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997; 56:58-69.
217. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet.* 2009; 373:1905-1917.
218. Lamberts SW. Hereditary glucocorticoid resistance. *Ann Endocrinol (Paris).* 2001; 62:164-167.
219. Carmichael J, Paterson IC, Diaz P, Crompton GK, Kay AB, Grant IW. Corticosteroid resistance in chronic asthma. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981; 282:1419-1422.
220. Chikanza IC. Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 966:39-48.
221. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut.* 1994; 35:360-362.
222. Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Bradfield J, Zink F, Mouy M i wsp. Profiling of genes expressed in peripheral blood mononuclear cells predicts glucocorticoid sensitivity in asthma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:14789-14794.
223. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem.* 1999; 274:27857-27866.
224. Rivers C, Levy A, Hancock J, Lightman S, Norman M. Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:4283-4286.
225. Goleva E, Li LB, Eves PT, Strand MJ, Martin RJ, Leung DY. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173:607-616.
226. Kozaci DL, Chernajovsky Y, Chikanza IC. The differential expression of corticosteroid receptor isoforms in corticosteroid-resistant and -sensitive patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46:579-585.
227. Orii F, Ashida T, Nomura M, Maemoto A, Fujiki T, Ayabe T i wsp. Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 296:1286-1294.
228. Beger C, Gerdes K, Lauten M, Tissing WJ, Fernandez-Munoz I, Schrappe M i wsp. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human

- leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol.* 2003; 122:245-252.
229. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109:649-657.
230. Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1024:86-101.
231. Weigel NL, Moore NL. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol.* 2007; 21:2311-2319.
232. Li LB, Goleva E, Hall CF, Ou LS, Leung DY. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114:1059-1069.
233. Adcock IM, Lane SJ, Brown CR, Lee TH, Barnes PJ. Abnormal glucocorticoid receptor-activator protein 1 interaction in steroid-resistant asthma. *J Exp Med.* 1995; 182:1951-1958.
234. Matthews JG, Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113:1100-1108.
235. Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Chirikuri A, O'Toole D i wsp. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology.* 2000; 118:279-288.
236. Hawrylowicz C, Richards D, Loke TK, Corrigan C, Lee T. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109:369-370.
237. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF i wsp. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006; 116:146-155.
238. Then Bergh F, Kämpfel T, Trenkwalder C, Rupprecht R, Holsboer F. Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is related to the clinical course of MS. *Neurology.* 1999; 53:772-777.
239. Michelson D, Stone L, Galliven E, Magiakou MA, Chrousos GP, Sternberg EM i wsp. Multiple sclerosis is associated with alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79:848-853.
240. van Winsen LM, Polman CH, Dijkstra CD, Tilders FJ, Uitdehaag BM. Suppressive effect of glucocorticoids on TNF-alpha production is associated with their clinical effect in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010; 16:500-502.
241. Matysiak M, Makosa B, Walczak A, Selmaj K. Patients with multiple sclerosis resisted to glucocorticoid therapy: abnormal expression of heat-shock protein 90 in glucocorticoid receptor complex. *Mult Scler.* 2008; 14:919-926.

242. Lehmann HC, Hartung HP, Hetzel GR, Stüve O, Kieseier BC. Plasma exchange in neuroimmunological disorders: Part 1: Rationale and treatment of inflammatory central nervous system disorders. *Arch Neurol*. 2006; 63:930-935.
243. Sugai S. IgA pyroglobulin, hyperviscosity syndrome and coagulation abnormality in a patient with multiple myeloma. *Blood*. 1972; 39:224-237.
244. Accorsi P, Passeri C, Onofrillo D, Iacone A. Hyperviscosity syndrome in hematological diseases and therapeutic apheresis. *Int J Artif Organs*. 2005; 28:1032-1038.
245. Schröder A, Linker RA, Gold R. Plasmapheresis for neurological disorders. *Expert Rev Neurother*. 2009; 9:1331-1339.
246. Rund D, Schaap T, Gillis S. Intensive plasmapheresis for severe thrombotic thrombocytopenic purpura: long-term clinical outcome. *J Clin Apher*. 1997; 12:194-195.
247. Frascà G, Vangelista A, DiFelice A, D'Arcangelo GL, Sermasi G, Zucchelli P i wsp. The rationale for plasmapheresis in renal graft rejection. *Life Support Syst*. 1984; 2:131-136.
248. Yu X, Ma J, Tian J, Jiang S, Xu P, Han H i wsp. A controlled study of double filtration plasmapheresis in the treatment of active rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2007; 13:193-198.
249. Gesinde MO, Tan LB, Gooi HC. Plasma exchange treatment to reduce anti-beta1-adrenergic receptor antibody in a patient with dilated cardiomyopathy. *J Clin Apher*. 2007; 22:241-242.
250. Mao WL, Chen Y, Chen YM, Li LJ. Changes of Serum Cytokine Levels in Patients With Acute on Chronic Liver Failure Treated by Plasma Exchange. *J Clin Gastroenterol*. 2010; doi: 10.1097/MCG.0b013e3181faefa3
251. Selset Aandahl G, Jacobsen CD, Rode L, Rathe Oedegaard E. Preliminary experience with plasma exchange in patients with ulcerative colitis. *Transfus Sci*. 2000; 22:155-160.
252. Gerlag PG, van Rooy MJ, Booij A, van Dam FE, op de Coul AA. Successful treatment by plasmapheresis of respiratory insufficiency in myasthenia gravis. *Clin Neurol Neurosurg*. 1980; 82:237-243.
253. Valbonesi M, Mosconi L, Garelli S, Zerbi D, Celano I. Successful treatment by plasma exchange in Guillain-Barré syndrome with immune complexes. *Vox Sang*. 1980; 38:181-184.
254. Färkkilä M, Kinnunen E, Haapanen E, Iivanainen M. Guillain-Barré syndrome: quantitative measurement of plasma exchange therapy. *Neurology*. 1987; 37:837-840.
255. Höcker P, Stellamor V, Summer K, Mann M. Plasma exchange (PE) and lymphocytapheresis (LCA) in multiple sclerosis (MS). *Int J Artif Organs*. 1984; 7:39-42.
256. Hauser SL, Dawson DM, Leirich JR, Beal MF, Kevy SV, Propper RD i wsp. Intensive immunosuppression in progressive multiple sclerosis. A randomized, three-arm study of high-dose intravenous cyclophosphamide, plasma exchange, and ACTH. *N Engl J Med*. 1983; 308:173-180.
257. Khatri BO, McQuillen MP, Harrington GJ, Schmoll D, Hoffmann RG. Chronic progressive multiple sclerosis: double-blind controlled study of plasmapheresis in patients taking immunosuppressive drugs. *Neurology*. 1985; 35:312-319.

258. Gordon PA, Carroll DJ, Etches WS, Jeffrey V, Marsh L, Morrice BL i wsp. A double-blind controlled pilot study of plasma exchange versus sham apheresis in chronic progressive multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 1985; 12:39-44.
259. Sørensen PS, Wanscher B, Szpirt W, Jensen CV, Ravnborg M, Christiansen P i wsp. Plasma exchange combined with azathioprine in multiple sclerosis using serial gadolinium-enhanced MRI to monitor disease activity: a randomized single-masked cross-over pilot study. *Neurology.* 1996; 46:1620-1625.
260. Weiner HL, Dau PC, Khatri BO, Petajan JH, Birnbaum G, McQuillen MP i wsp. Double-blind study of true vs. sham plasma exchange in patients treated with immunosuppression for acute attacks of multiple sclerosis. *Neurology.* 1989; 39:1143-1149.
261. Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW i wsp. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol.* 1999; 46:878-886.
262. Ruprecht K, Klinker E, Dintelmann T, Rieckmann P, Gold R. Plasma exchange for severe optic neuritis: treatment of 10 patients. *Neurology.* 2004; 63:1081-1083.
263. Schilling S, Linker RA, König FB, Koziulek M, Bähr M, Müller GA i wsp. Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses: clinical experience with 16 patients. *Nervenarzt.* 2006; 77:430-438.
264. Trebst C, Reising A, Kielstein JT, Hafer C, Stangel M. Plasma exchange therapy in steroid-unresponsive relapses in patients with multiple sclerosis. *Blood Purif.* 2009; 28:108-115.
265. Linker RA, Chan A, Sommer M, Koziulek M, Müller GA, Paulus W i wsp. Plasma exchange therapy for steroid-refractory superimposed relapses in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol.* 2007; 254:1288-1289.
266. Cortese I, Chaudhry V, So YT, Cantor F, Cornblath DR, Rae-Grant A. Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2011; 76:294-300.
267. Klingel R, Heibges A, Fassbender C. Plasma exchange and immunoadsorption for autoimmune neurologic diseases - current guidelines and future perspectives. *Atheroscler Suppl.* 2009;10:129-132.
268. Charlton B, Schindhelm K, Smeby LC, Farrell PC. Analysis of immunoglobulin G kinetics in the non-steady state. *J Lab Clin Med.* 1985; 105:312-320.
269. Goldammer A, Derfler K, Herkner K, Bradwell AR, Hörl WH, Haas M. Influence of plasma immunoglobulin level on antibody synthesis. *Blood.* 2002; 100:353-355.
270. Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A i wsp. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet.* 2005; 366:579-582.
271. Wang KC, Wang SJ, Lee CL, Chen SY, Tsai CP. The rescue effect of plasma exchange for neuromyelitis optica. *J Clin Neurosci.* 2011; 18:43-46.

272. Yoshida H, Ando A, Sho K, Akioka M, Kawai E, Arai E i wsp. Anti-aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis treated with double-filtration plasmapheresis. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010; 26:381-385.
273. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med.* 2005; 202:473-477.
274. Misu T, Fujihara K, Kakita A, Konno H, Nakamura M, Watanabe S i wsp. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain.* 2007; 130:1224-1234.
275. Khatri BO, Koethe SM, McQuillen MP. Plasmapheresis with immunosuppressive drug therapy in progressive multiple sclerosis. A pilot study. *Arch Neurol.* 1984; 41:734-738.
276. Dau PC. Increased proliferation of blood mononuclear cells after plasmapheresis treatment of patients with demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 1990; 30:15-21.
277. Dau PC. Increased antibody production in peripheral blood mononuclear cells after plasma exchange therapy in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1995; 62:197-200.
278. Medenica RD, Mukerjee S, Alonso K, Lazovic G, Huschart T. Plasmapheresis combined with interferon: an effective therapy for multiple sclerosis. *J Clin Apher.* 1994; 9:222-227.
279. Yoshii F, Shinohara Y. Natural killer cells in patients with Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci.* 1998; 157:175-178.
280. Yoshii F, Shinohara Y. Lymphocyte subset proportions in Guillain-Barré syndrome patients treated with plasmapheresis. *Eur Neurol.* 2000; 44:162-167.
281. Dau PC. Immunomodulation during treatment of polymyositis with plasmapheresis and immunosuppressive drugs. *J Clin Apher.* 1994; 9:21-25.
282. Dau PC, Callahan J, Parker R, Golbus J. Immunologic effects of plasmapheresis synchronized with pulse cyclophosphamide in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1991; 18:270-276.
283. Dau PC, Callahan JP. Immune modulation during treatment of systemic sclerosis with plasmapheresis and immunosuppressive drugs. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994; 70:159-165.
284. Hanly JG, Hong C, Zayed E, Jones JV, Jones E. Immunomodulating effects of synchronised plasmapheresis and intravenous bolus cyclophosphamide in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1995; 4:457-463.
285. Soltész P, Aleksza M, Antal-Szalmás P, Lakos G, Szegedi G, Kiss E. Plasmapheresis modulates Th1/Th2 imbalance in patients with systemic lupus erythematosus according to measurement of intracytoplasmic cytokines. *Autoimmunity.* 2002; 35:51-56.
286. Baráth S, Soltész P, Kiss E, Aleksza M, Zeher M, Szegedi G i wsp. The severity of systemic lupus erythematosus negatively correlates with the increasing number of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells during repeated plasmapheresis treatments of patients. *Autoimmunity.* 2007; 40:521-528.

287. Usnarska-Zubkiewicz L. CD3+ T lymphocytes and interleukin 2 in myelomatous blood hyperviscosity syndrome treated with plasmapheresis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1998; 46:317-322.
288. Paglieroni T, Caggiano V, MacKenzie MR. Effects of plasmapheresis on peripheral blood mononuclear cell populations from patients with macroglobulinemia. *J Clin Apher*. 1987; 3:202-208.
289. Shariatmadar S, Nassiri M, Vincek V. Effect of plasma exchange on cytokines measured by multianalyte bead array in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 2005; 79:83-88.
290. Goto H, Matsuo H, Nakane S, Izumoto H, Fukudome T, Kambara C i wsp. Plasmapheresis affects T helper type-1/T helper type-2 balance of circulating peripheral lymphocytes. *Ther Apher*. 2001; 5:494-496.
291. Yeh JH, Chien PJ, Hsueh YM, Shih CM, Chiu HC. Changes in the lymphocyte subset after double-filtration plasmapheresis. *Am J Clin Pathol*. 2007; 128:940-944.
292. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983; 33:1444-1452.
293. Nockher WA, Wiemer J, Scherberich JE. Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subsets. *Clin Exp Immunol*. 2001; 123:49-55.
294. Sester U, Sester M, Heine G, Kaul H, Girndt M, Köhler H. Strong depletion of CD14(+)/CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:1402-1408.
295. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol*. 1998; 112:501-506.
296. Rzazewska-Makosa B. The mechanism of glucocorticoid resistance in multiple sclerosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2005; 59:457-463.
297. Linker RA, Gold R. Use of intravenous immunoglobulin and plasma exchange in neurological disease. *Curr Opin Neurol*. 2008; 21:358-365.
298. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B i wsp. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002; 168:3536-3542.
299. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B i wsp. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp Hematol*. 2004; 32:748-755.
300. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol*. 2001; 31:48-56.
301. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stöhr J, Kindermann W i wsp. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16:1437-1447.

302. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M i wsp. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.* 2000; 67:699-704.
303. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW i wsp. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med.* 2003; 197:1701-1707.
304. Ancuta P, Moses A, Gabuzda D. Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology.* 2004; 209:11-20.
305. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med.* 2002; 196:517-527.
306. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993; 82:3170-3176.
307. Baeten D, Boots AM, Steenbakkers PG, Elewaut D, Bos E, Verheijden GF i wsp. Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1233-1243.
308. Koch S, Kucharzik T, Heidemann J, Nusrat A, Luegering A. Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2010; 161:332-341.
309. González A, Calleja A, Santiago E, De Miguel C, López-Zabalza MJ, López-Moratalla N. Correlation of activated monocytes or B cells with T lymphocyte subsets in patients with Graves' disease. *Int J Mol Med.* 1998; 1:95-103.
310. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Yamada M, Kikuyama M i wsp. Adsorptive depletion of elevated proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103:1210-1216.
311. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A i wsp. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One.* 2010; 5:e11049.
312. Kanai T, Makita S, Kawamura T, Nemoto Y, Kubota D, Nagayama K i wsp. Extracorporeal elimination of TNF-alpha-producing CD14(dull)CD16(+) monocytes in leukocytapheresis therapy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13:284-290.
313. Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, Khuntikeo N, Okada S, McGrath MS i wsp. Circulating CD14(+) CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol.* 2010; 161:471-479.
314. Han J, Wang B, Han N, Zhao Y, Song C, Feng X i wsp. CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; 52:553-559.

315. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM i wsp. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*. 2010; 130:202-216.
316. Barisione C, Garibaldi S, Ghigliotti G, Fabbi P, Altieri P, Casale MC i wsp. CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients. *Dis Markers*. 2010; 28:115-124.
317. Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B i wsp. CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int*. 2008; 73:622-629.
318. Urria X, Villamor N, Amaro S, Gómez-Choco M, Obach V, Oleaga L i wsp. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009; 29:994-1002.
319. Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M. Enhanced frequencies of CD14++CD16+, but not CD14+CD16+, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin Immunol*. 2009; 130:338-346.
320. Ulrich C, Heine GH, Garcia P, Reichart B, Georg T, Krause M i wsp. Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21:1596-1602.
321. Ulrich C, Heine GH, Seibert E, Fliser D, Girndt M. Circulating monocyte subpopulations with high expression of angiotensin-converting enzyme predict mortality in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25:2265-2272.
322. Lapteva N, Ide K, Nieda M, Ando Y, Hata-Ohashi Y, Minami M i wsp. Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296:194-200.
323. Nahmod K, Gentilini C, Vermeulen M, Uharek L, Wang Y, Zhang J i wsp. Impaired function of dendritic cells deficient in angiotensin II type 1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334:854-862.
324. Fertl A, Menzel M, Hofer TP, Morresi-Hauf A, Ziegler-Heitbrock L, Frankenberger M. Monitoring of glucocorticoid therapy by assessment of CD14(+)CD16(+) monocytes: a case report. *Immunobiology*. 2008; 213:909-916.
325. Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J Leukoc Biol*. 2003; 74:33-39.
326. Reder AT, Lowy MT, Meltzer HY, Antel JP. Dexamethasone suppression test abnormalities in multiple sclerosis: relation to ACTH therapy. *Neurology*. 1987; 37:849-853.
327. Reder AT, Makowiec RL, Lowy MT. Adrenal size is increased in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 1994; 51:151-154.
328. Erkut ZA, Hofman MA, Ravid R, Swaab DF. Increased activity of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1995; 62:27-33.

329. Correale J, Gilmore W, Li S, Walsh J, Bassani MM, Lund B i wsp. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in PLP peptide-specific T cell clones from patients with progressive MS. *J Neuroimmunol.* 2000; 109:197-210.
330. DeRijk RH, Eskandari F, Sternberg EM. Corticosteroid resistance in a subpopulation of multiple sclerosis patients as measured by ex vivo dexamethasone inhibition of LPS induced IL-6 production. *J Neuroimmunol.* 2004; 151:180-188.
331. van Winsen LM, Muris DF, Polman CH, Dijkstra CD, van den Berg TK, Uitdehaag BM. Sensitivity to glucocorticoids is decreased in relapsing remitting multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:734-740.
332. Ysraelit MC, Gaitán MI, Lopez AS, Correale J. Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2008; 71:1948-1954.
333. van Winsen LM, Hooper-van Veen T, van Rossum EF, Koper JW, Barkhof F, Polman CH i wsp. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with more aggressive disease phenotype in MS. *J Neuroimmunol.* 2007; 186:150-155.
334. van Winsen LM, Manenschijn L, van Rossum EF, Crusius JB, Koper JW, Polman CH i wsp. A glucocorticoid receptor gene haplotype (TthIII1/ER22/23EK/9beta) is associated with a more aggressive disease course in multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:2110-2114.
335. van Winsen LL, Hooper-van Veen T, van Rossum EF, Polman CH, van den Berg TK, Koper JW i wsp. The impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on glucocorticoid sensitivity is outweighed in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005; 167:150-156.
336. Zettl UK, Hartung HP, Pahnke A, Brueck W, Benecke R, Pahnke J. Lesion pathology predicts response to plasma exchange in secondary progressive MS. *Neurology.* 2006; 67:1515-1516.

XI. STRESZCZENIE

Znaczenie wybranych populacji komórek immunologicznych w leczeniu zaostrzeń stwardnienia rozsianego z zastosowaniem plazmaferezy

Wstęp: Stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex* - SM) jest przewlekłym demielinizacyjnym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego. U większości pacjentów, przynajmniej w początkowym okresie, choroba przebiega pod postacią zaostrzeń (tzw. rzutów) i remisji objawów neurologicznych. Standardem leczenia w rzucie SM jest dożylne podawanie wysokich dawek glukokortykosteroidów. Jednakże, w niewielkiej grupie pacjentów terapia ta nie przynosi pożądaných efektów klinicznych. Liczne badania wykazały, iż plazmafereza stanowi efektywną opcję terapeutyczną dla pacjentów z opornymi na glukokortykosteroidy rzutami SM. Powszechnie uważa się, że skuteczność kliniczna plazmaferezy jest wynikiem usuwania z krwi obwodowej szeregu zróżnicowanych cząsteczek czynnych immunologicznie. Niewiele wiadomo jednak, na temat wpływu plazmaferezy na komórkowe składniki układu immunologicznego.

Cel pracy: Celem pracy była ocena zaangażowania komórkowych elementów układu immunologicznego w mechanizmy warunkujące skuteczność kliniczną plazmaferezy w zaostrzeniach stwardnienia rozsianego opornych na terapię glukokortykosteroidami. Badaniem zostały objęte podstawowe populacje limfocytów T (w tym limfocyty T regulatorowe), komórki NK, komórki NKT, limfocyty B oraz najważniejsze z punktu widzenia immunoregulacji subpopulacje monocytów i komórek dendrytycznych krwi obwodowej.

Materiały i metody: Krew obwodowa została pobrana od pacjentów z opornym na leczenie glukokortykosteroidami rzutem SM w trzech punktach czasowych terapii plazmaferezą: przed pierwszym zabiegiem plazmaferezy, po trzecim zabiegu plazmaferezy oraz po zakończeniu cyklu plazmaferez. Pacjenci z rzutem SM wrażliwym na terapię glukokortykosteroidami oraz zdrowi ochotnicy stanowili grupy kontrolne. Populacje komórek immunologicznych analizowane były we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej za pomocą cytometrii przepływowej *ex vivo*. W kolejnej części badania, czysta frakcja monocytów izolowana była z krwi obwodowej z zastosowaniem metody sortowania magnetycznego. Uzyskane w ten sposób monocyty były poddawane 48-godzinnej hodowli w warunkach stymulacji prozapalnej. Po zakończeniu hodowli, profil ekspresji powierzchniowej monocytów *in vitro*, obejmujący szereg molekuł kostymulacyjnych oraz cząsteczki MHC klasy II, oceniany był metodą cytometrii przepływowej. W dalszych eksperymentach produkcja cytokin prozapalnych i regulacyjnych przez komórki jednojądrzaste oraz monocyty krwi obwodowej *in vitro* analizowana była w nadsączach hodowlanych.

Wyniki: W przebiegu terapii plazmaferezą obserwowano, równoległe do poprawy klinicznej, istotne zmniejszenie frakcji monocytów krwi obwodowej wykazujących ekspresję CD16 *ex vivo*. Analiza poszczególnych subpopulacji monocytów wykazała, że efekt ten był specyficzny dla subpopulacji CD14^{high}CD16⁺, podczas gdy subpopulacja monocytów CD14^{low}CD16⁺ oraz frakcja „klasycznych” monocytów CD14^{high}CD16⁻ nie wykazywały zmian w trakcie terapii. Terapia plazmaferezą nie miała wpływu na główne populacje limfocytów (m.in. limfocyty T regulatorowe, komórki NK, komórki NKT, limfocyty B) oraz na mieloidalne i plazmacytoidalne komórki dendrytyczne krwi obwodowej. Obserwowane przed rozpoczęciem terapii zwiększenie frakcji monocytów CD14^{high}CD16⁺ było czynnikiem prognostycznym dobrej odpowiedzi terapeutycznej na plazmaferezę. Natomiast, u pacjentów z negatywną odpowiedzią terapeutyczną

obserwowano początkowo zmniejszoną ekspresję HLA-DR w subpopulacji „klasycznych” monocytów CD14^{high}CD16-. Parametr ten ulegał normalizacji po zakończeniu cyklu plazmaferez, czemu towarzyszyła zwiększona sekrecja TNF- α przez monocyty *in vitro*. W badaniu nie wykazano wpływu terapii plazmaferezą na profil sekrecji całkowitej frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej.

Wnioski: Uzyskane wyniki dowodzą istotnego wpływu plazmaferezy na strukturę i funkcję komórek krwi obwodowej pacjentów z opornym na glukokortykosteroidy zaostrzeniem SM. Zróżnicowanie efektów immunologicznych plazmaferezy w zależności od odpowiedzi klinicznej na terapię sugeruje istnienie w SM złożonych i niejednorodnych mechanizmów zaburzeń wrażliwości na glukokortykosteroidy. Poczynione w badaniu obserwacje mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia efektów klinicznych plazmaferezy w terapii rzutów SM, jak również znaleźć zastosowanie w badaniach nad zagadnieniem oporności na glukokortykosteroidy w chorobach zapalnych.

XII. ABSTRACT

The role of selected immune cell populations in plasma exchange treatment of multiple sclerosis relapses

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disorder of the central nervous system. In the majority of patients the disease is characterized, at least in the early phase, by relapsing-remitting clinical course. The standard therapy of MS relapse consist of high dose intravenous glucocorticoid treatment. However, in a small group of MS patients this therapy brings no clinical improvement. Numerous studies showed that plasma exchange is an effective therapeutic option for patients with glucocorticoid-resistant MS relapse. Elimination of multiple humoral factors has been postulated as a possible therapeutic mechanism of plasma exchange. However, the influence of plasma exchange on cellular immunity remains poorly understood.

Aim of the study: The aim of this study was to assess the involvement of cellular immunity in clinical efficacy of plasma exchange as therapy for multiple sclerosis patients suffering from relapses resistant to glucocorticoid pulse therapy. The analysis encompassed main T cell populations (including regulatory T cells), NK cells, NKT cells, B cells and the most important for immunoregulatory processes monocyte and dendritic cell subpopulations.

Materials and methods: Peripheral blood was obtained from MS patients suffering from glucocorticoid-resistant relapses at three consecutive time-points of plasma exchange treatment: before the first plasma exchange, after the third plasma exchange and after completion of plasma exchange therapy. Patients with MS relapse with good response to glucocorticoid pulse therapy and healthy individuals served as controls. Peripheral blood mononuclear cells were obtained and immune cell subsets were investigated by flow cytometry *ex vivo*.

In further experiments, the pure monocyte population was isolated from peripheral blood by magnetic sorting. Isolated monocytes were cultured 48 hours under inflammatory conditions. After completion of culture period, surface expression profile of monocytes *in vitro*, including various co-stimulatory and MHC class II molecules, was assessed by flow cytometry. The secretion of pro-inflammatory and regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells and monocytes *in vitro* was analyzed in culture supernatants.

Results: The percentage of monocytes expressing CD16 decreased significantly over the course of PE treatment. The effect was specific for the CD14^{high}CD16⁺ monocyte subpopulation, whereas the CD14^{low}CD16⁺ and the “classical” CD14^{high}CD16⁻ subpopulations showed no differences during the treatment. Plasma exchange did not influence the main lymphocyte populations (including regulatory T cells, NK or NKT cells, B cells) and dendritic cell subtypes. A baseline increase in the percentage of CD14^{high}CD16⁺ monocytes was predictive for a good therapeutic response to plasma exchange treatment. In contrast, PE non-responders were characterized at baseline by lower expression of HLA-DR in CD14^{high}CD16⁻ monocytes. This parameter normalized after completion of plasma exchange, paralleled by increased TNF- α secretion by monocytes in culture. The secretion profile of peripheral blood mononuclear cells was not influenced by plasma exchange therapy.

Conclusions: Results obtained in the study demonstrate a significant influence of plasma exchange on the structure and function of immune cells in peripheral blood of patients with glucocorticoid-resistant MS relapse. The diversity of immune effects of plasma exchange depending on the clinical response to therapy suggests complex and inhomogeneous mechanisms of glucocorticoid resistance in MS. These observations may be of particular importance for understanding of clinical effectiveness of plasma exchange in MS relapse as well as for the problem of glucocorticoid sensitivity in inflammatory disorders.