

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dr Svetlana B. Stanojlović**

**ISPITIVANJE EFEKATA  
IMUNOSUPRESIVNE I ĆELIJSKE TERAPIJE  
U EKSPERIMENTALNOJ KERATOPLASTICI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Mentor:  
Prof. Dr Slobodan Golubović  
Univerzitet u Beogradu**

**Komentor:  
Prof. Dr Uwe Pleyer  
Charité – Universitatmedizin  
Berlin**

**Beograd, 2012.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE**

**Dr Svetlana B. Stanojlović**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS  
OF IMMUNOSUPPRESSIVE AND CELL  
THERAPY IN EXPERIMENTAL  
KARATOPLASTY**

**DOCTORAL DISSERTATION**

**Belgrade, 2012.**

**Mentor:** Prof. dr Slobodan Golubović, *Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet*

**Komentor:** Prof. dr Uwe Pleyer, *Charité-Universitätsmedizin, Berlin*

**Članovi komisije:**

Prof. dr Milenko Stojković, *predsednik, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Klinika za očne bolesti Kliničkog centra Srbije*

Prof. dr Dušan Popadić, *Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju*

Prof. dr. Zoran Latković, *profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet*

Datum odbrane:

## ZAHVALNOST

Eksperimentalni deo doktorske disertacije "Ispitivanje efekata imunosupresivne i ćelijske terapije u eksperimentalnoj keratoplastici" obavljen je u periodu od 2007. do 2008. godine u toku mog boravka u Berlinu, kao naučnog saradnika, na Očnoj klinici Charite Medicinskog Univerziteta (Deutsche Forschungsgemeinschaft (Pl 150/14-2)).

Prof. Dr Slobodanu Goluboviću, mom uvaženom mentoru i izuzetnom učitelju, dugujem posebnu zahvalnost jer mi je omogućio da se bavim hirurgijom rožnjače na Očnoj klinici i inicirao ideju da se uključim u naučno-istraživači projekat iz oblasti eksperimentalne transplantacije rožnjače koji je vodio Prof. Dr Uwe Pleyer, kao i na korisnim primedbama u završnoj izradi rada.

Izuzetnu zahvalnost dugujem mom komentoru, Prof Dr Uwe Pleyer-u na prilici da radim u Charite bolnici kao i na podršci i savetima koji su bili od velike koristi tokom samog istraživanja.

Veliku zahvalnost za eksperimentalna istraživanja u laboratoriji Instituta za imunologiju u Charite-u dugujem Prof. Dr Birgit Sawitzki, Dipl. Ing Stephan-u Schlickeiser-u i biologu Christine Appelt.

Članovima komisije Prof. Dr Zoranu Latkoviću, Prof. Dr Dušanu Popadiću i Doc. Dr Milenku Stojkoviću zahvaljujem na uloženom trudu i korisnim primedbama u konačnom oblikovanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem svojim roditeljima Mileni i Borislavu i sinu Luki koji su mi razumevanjem, podrškom i velikim odricanjem obezbedili uslove za nesmetan rad na izradi doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem sestri Aleksandri i zetu Draganu koji su mi bili izuzetna podraška u toku boravka u Nemačkoj.

## **ISPITIVANJE EFEKATA IMUNOSUPRESIVNE I ČELIJSKE TERAPIJE U EKSPERIMENTALNOJ KERATOPLASTICI**

### **REZIME**

**Cilj:** Ispitati na modelu visoko-rizične transplantacije rožnjače na miševima imunomodulatornu efikasnost malih doza sistemske primene rapamicina (Rapa) u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa ciklosporinom A (CsA);

Ispitati uticaj malih doza Rapa i CsA na terapijsku efikasnost prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T regulatornih ćelija nakon adoptivnog transfera na visoko-rizičnom modelu keratoplastike;

Ispitati i uporediti efikasnost adoptivne ćelijske terapije u prevenciji odbacivanja kornealnog kalema nakon aplikacije *ex vivo* ekspandiranih antigen-specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija u odnosu na injekciju sveže izolovanih prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija kod naivnih primaoca.

**Materijal i metode:** Za ortotopsku transplantaciju rožnjače korišćeni su inbred BALB/c (H-2<sup>d</sup>) i C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) miševi koji imaju nepodudaran glavni histokompatibilni kompleks kao i brojne minorne H antigene. C57BL/6 miševi služili su kao primaoci BALB/c kornealnog kalema. Intraperitonealne injekcije Rapa (0.5mg/kgTT) i/ili CsA (3mg/kgTT) aplikovane su primaocima jednom dnevno na dan operacije i narednih 14 dana postoperativno. Za izolaciju prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija iz suspenzije limfnih čvorova i slezine C57BL/6 miševa primenjena je magnetna separacija. Aloantigen specifične regulatorne T ćelije generisane su *in vitro* u mešanoj limfocitnoj kulturi, stimulacijom nefrakcionisanih CD4<sup>+</sup> naivnih ćelija koje potiču od C57BL/6 miševa alogenim B limfocitima u prisustvu anti-CD4 monoklonskih antitela (klon YTS 177.9) koja ne vrše depleciju (*non-depleting*). Procenat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u prirodnim i antigen specifičnim Treg ćelijama određen je protočnom citometrijom. Jedan dan pre planirane keratoplastike naivni C57BL/6 miševi dobijali su jednu intravensku injekciju od 5x10<sup>5</sup> prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija ili 5x10<sup>5</sup> aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija (MLC<sup>pres</sup>). Prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u sekundarnim limfoidnim organima mereno je protočnom citometrijom. Razvoj IFN-γ produkujućih aloreaktivnih T ćelija utvrđen je pomoću Elisgota. Takođe,

kornealni uzorci podvrgnuti su analizi transkripcije citokina pomoću RT-PCR metode. Na isti način utvrđen je nivo transkripcije markera maturacije dendritičnih ćelija u splenocitima.

**Rezultati.** Monoterapija rapamicinom značajno je odložila reakciju odbacivanja kornealnog alografta ( $13.4 \pm 1.34$  dana,  $p=0.03$ ). Međutim, kombinovana primena malih doza Rapa i CsA produžila je opstanak kalema na značajno višem nivou ( $17.1 \pm 1.37$  dana,  $p=0.0001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom ( $11.2 \pm 1.91$  dana) i dovela do redukcije CD3 markera ( $p=0.028$ ), IL-2 ( $p=0.027$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0.028$ ) i IL-10 ( $p=0.027$ ) u kalemu.

Jedna aplikacija  $5 \times 10^5$  prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih T ćelija značajno je produžila opstanak kornealnog kalema ( $15.8 \pm 1.64$  dana,  $p=0.0001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom. Mada dodatak rapamicina ili CsA nije značajno odložio odbacivanje kalema u odnosu na injekciju prirodnih Treg ćelija ( $p=0.621$  i  $p=0.09$ ), kombinovana terapija sa rapamicinom bila je efikasnija i dovela do najdužeg opstanka kornealnog kalema ( $18.0 \pm 3.47$  dana). Naknadna primena rapamicina značajno je redukovala DC-LAMP iRNK ekspresiju u splenocitima ( $p=0.039$ ) kao i nivo infiltracionih i inflamatornih markera u graftu: CD3 ( $p=0.02$ ), IL-2 ( $p=0.05$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0.025$ ) i IL-17A ( $p=0.04$ ). Međutim, sve terapijske strategije sprečile su razvoj alloantigen specifičnih IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija u slezini ( $p<0.01$ ).

Inokulacija  $5 \times 10^5$  aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija (MLC<sup>pres</sup>) 1 dan pre transplantacije rožnjače značajno je produžila opstanak kalema. Srednje vreme opstanka iznosilo je  $61.3 \pm 40.24$  dana ( $p=0.0001$ ), a 37.5 % kalemova trajno je prihvaćeno. Transfer  $1 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> Treg ćelija u kombinaciji sa kratkotrajnom aplikacijom rapamicina značajno je odložio odbacivanje kalema ( $36.6 \pm 28.8$  dana) u poređenju sa adoptivnim transferom istog broja MLC<sup>pres</sup> Treg ćelija bez imunosupresivne terapije ( $10 \pm 0$  dana,  $p=0.0082$ ). Dodatna primena rapamicina značajno je redukovala transkripciju markera sazrevanja dendritičnih ćelija DC-LAMP-a u splenocitima ( $p=0.01$ ). Nakon isključenja rapamicina frekvencija IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih ćelija u slezini je rasla tako da nakon 100 dana nije bile statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0.482$ ). Sto dana nakon keratoplastike IFN- $\gamma$  produkujuće memorijske ćelije nisu mogle da se detektuju u slezini životinja koje su dobile samo  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> ćelija.

**Zaključak.** Monoterapija rapamicinom umereno odlaže reakciju odbacivanja alokalema, dok kombinacija malih doza CsA i rapamicina produžava opstanak kornealnog kalema na statistički značajno višem nivou. Kombinovana imunomodulatorna terapija efikasno modulira iRNK ekspresiju inflamatornih i infiltracionih markera što je moglo da utiče na odlaganje reakcije odbacivanja kornealnog alokalema. Dodatak malih doza CsA ili rapamicina nije ispoljio značajan efekat na terapijsku efikasnost prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija nakon adoptivnog transfera u visoko-rizičnom modelu keratoplastike. Aloantigen specifične CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelije, dobijene *in vitro* u mešanoj limfocitnoj kulturi u prisustvu anti-CD4 monoklonskih antitela koja ne vrše depleciju, usmerene ka kontroli direktnog puta prezentacije antigena, efikasnije su u prevenciji akutne reakcije odbacivanja kornealnog kalema u poređenju sa injekcijom poliklonalnih prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija. Transfer 5x10<sup>5</sup> aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelije indukovao je trajno prihvatanje kornealnog kalema kod 37.5% primaoca bez primene dodatne sistemske imunosupresivne terapije.

**Ključne reči:** rožnjača, transplantacija, T regulatorne ćelije, rapamicin, ciklosporin A

**Naučna oblast:** medicina

**Uža naučna oblast:** imunologija

## INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF IMMUNOSUPPRESSIVE AND CELL THERAPY IN EXPERIMENTAL KERATOPLASTY

### Abstract

**Purpose.** To analyze the immune modulatory effect of low dose systemic treatment with rapamycin (Rapa) alone or in combination with cyclosporin A (CsA) in a high responder corneal allograft model in mice;

To analyze the effect of low dose systemic treatment with Rapa and CsA on the therapeutic efficacy of adoptively transferred natural T regulatory cells (nTregs) in a high responder keratoplasty model;

To determine and compare capability of adoptively transferred *ex vivo* expanded alloantigen specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs over injection of freshly purified nTregs in preventing corneal allograft rejection in otherwise non-manipulated recipients.

**Methods.** Orthotopic corneal transplantation was performed using inbred BALB/c(H-2<sup>d</sup>) and C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) mice. These are fully mismatched for MHC and multiple minor H antigens. C57BL/6 mice served as recipients of BALB/c corneal allografts. Recipient mice were treated by intraperitoneal injections of either CsA 3mg/kg/day or Rapa 0.5mg/kg/day monotherapy or received combined treatment. Immunomodulatory treatment was started on the day of surgery and continued for 14 days. Natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs were freshly purified from the cell suspension of naïve C57BL/6 mice via automated magnetic cell sorter. Alloantigen specific Tregs were generated *in vitro* in a mixed lymphocyte culture by stimulation of total CD4<sup>+</sup> naïve cells from C57BL/6 mice with allogenic B cells in the presence of a non-depleting anti-CD4 antibody (YTS177). The resulting percentage of Foxp3<sup>+</sup> cells in each fraction was evaluated by flow cytometry. One day prior to corneal transplantation naïve C57BL/6 recipient mice were treated with a single intravenous injection of either 5×10<sup>5</sup> natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs or 5×10<sup>5</sup> alloantigen specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs (MLC<sup>pres</sup>). The frequencies of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in secondary lymphoid organs were measured by flow cytometry. Development of IFN-γ producing alloreactive T cells was estimated by Elispot. In addition, corneal samples were subjected to real time RT-PCR analysis



for cytokine transcription. Splenic mRNA expression of DC maturation markers was analyzed by quantitative RT-PCR, as well.

**Results.** Monotherapy with Rapa significantly delayed allograft rejection ( $13.4 \pm 1.34$  days,  $p=0.03$ ). However, the combination of both, low dose Rapa and CsA prolonged corneal allograft survival at a significantly higher level (MST= $17.1 \pm 1.37$  days,  $p=0.0001$ ), as compared to the control group (MST=  $11.2 \pm 1.91$  days). Combined treatment resulted in down-regulation of intragraft CD3, IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 transcription ( $p=0.028$ ,  $p= 0.027$ ,  $p=0.028$  and  $p= 0.027$  respectively).

Single application of  $5 \times 10^5$  natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs significantly delayed corneal allograft rejection (MST= $15.8 \pm 1.64$  days,  $p=0.0001$ ) as compared to the control group. Further addition of CsA or Rapa did not significantly delay graft rejection in comparison to the treatment with a single injection of nTregs ( $p=0.621$  and  $p=0.09$ , respectively), nevertheless combined treatment with Rapa resulted in the longest graft survival ( $18.0 \pm 3.47$  dana). Rapamycin significantly down-regulated DC-LAMP mRNA in splenocytes ( $p=0.039$ ), as well as intragraft CD3, IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-17A transcription ( $p=0.02$ ,  $p=0.05$ ,  $p=0.025$  and  $p=0.04$  respectively). However, all treatment strategies prevented development of alloantigen specific IFN- $\gamma$  producing memory T cells in spleen ( $p<0.01$ ).

Inoculation of  $5 \times 10^5$  alloantigen specific Tregs (MLC<sup>pres</sup>) 1 day prior to corneal surgery significantly prolonged graft survival (MST:  $61.3 \pm 40.24$  days,  $p=0.0001$ ) with 37.5 % of the mice showing long-term (>100 days) graft acceptance. Transfer of  $1 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> in combination with transient application of Rapa significantly prolonged corneal allograft survival (MST:  $36.6 \pm 28.8$  days) as compared with adoptive cell therapy of  $1 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> alone (MST:  $10 \pm 0$  days,  $p= 0.0082$ ). Additional application of Rapa significantly reduced transcription of DC maturation marker DC-LAMP in splenocytes ( $p=0.01$ ). After Rapa withdrawal frequencies of alloreactive IFN- $\gamma$  producing T cells steadily increased in spleen and on day 100 post surgery there were no statistical significances in comparison with controls ( $p=0.482$ ). Surprisingly, on day 100 after corneal surgery, IFN- $\gamma$  producing memory T cells were not detectable in spleens of animals that received  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup>.

**Conclusions.** Monotherapy with Rapa modestly delayed allograft rejection, whereas combined treatment with low dose CsA and Rapa resulted in significantly superior graft survival. Combined immunomodulatory treatment effectively modulated mRNA expression of inflammation and infiltration markers which may account for the prolonged allograft survival. Addition a low dose of CsA or Rapa had no significant effect on therapeutic efficacy of adoptively transferred natural Tregs in a high responder keratoplasty model. Alloantigen specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, generated *in vitro* in MLC in the presence of a non-depleting anti-CD4 antibody and aimed at controlling direct pathway of antigen presentation, were more potent over polyclonal natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in preventing acute rejection of corneal allografts. Transfer of 5x10<sup>5</sup> alloantigen specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs induced long-term graft acceptance in 37.5% recipients without additional immunosuppressive therapy.

**Key words:** cornea, transplantation, T regulatory cells, rapamycin, cyclosporine A

**Scientific field:** Medicine

**Major in:** Immunology

## **SADRŽAJ**

<b>UVOD</b> .....	1
<b>CILJ RADA</b> .....	25
<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	27
<b>REZULTATI</b> .....	39
<b>DISKUSIJA</b> .....	60
<b>ZAKLJUČCI</b> .....	81
<b>LITERATURA</b> .....	83
<b>Spisak skraćenica</b>	
<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b> .....	110
<b>PRILOZI</b> .....	111

# 1. UVOD

## 1.1 ZNAČAJ I UČESTALOST ODBACIVANJA KORNEALNOG KALEMA NAKON PERFORATIVNE KERATOPLASTIKE

Transplantacija rožnjače urađena je prvi put pre više od sto godina i predstavlja najstariju i najčešću transplantaciju tkiva i organa [1,2]. Smatra se i najuspešnijom transplantacijom, mada su brojne studije pokazale suprotne rezultate. Ovo pogrešno uverenje bazirano je na istorijskim podacima da je stopa odbacivanja kornealnih transplantata niska u poređenju sa transplantacijom solidnih organa. Dok je dvogodišnja prognoza prvog kornealnog kalema bez vaskularizacije ležišta primaoca veća od 90%, petogodišnja stopa opstanaka kalema, u prisustvu faktora rizika za odbacivanje, pada na 35-70% [3,4]. Među poznatim faktorima rizika navodi se duboka vaskularizacija rožnjače u 2 ili više kvadranta, prethodno odbačen kalem, inflamacija, veliki dijametar kalema kao i njegova blizina limbusu. [5,6,7,8]. Reakcija odbacivanja kalema predstavlja najčešći razlog za propadanje kornealnog transplantata. Prema rezultatima velikih studija reakcija odbacivanja kornealnog kalema javlja se kod 18-21% recipijenata [9, 10,11]. Uvođenjem i napredovanjem imunosupresivne terapije, stopa imunološkog propadanja solidnih organa značajno je redukovana i približila se procentu gubitka kornealnog kalema koji iznosi oko 25% u petogodišnjem periodu [8]. S druge strane stopa odbacivanja kornealnog kalema nije se promenila tokom poslednjih 50 godina [12,13,14]. Zbog toga su potrebne efikasnije mere i terapijski protokoli u cilju poboljšanja prognoze nakon keratoplastike.

Uspeh kliničke transplantacije počiva na HLA tipizaciji, imunosupresivnim lekovima i hirurškoj veštini. U kliničkoj transplantaciji rožnjače HLA tipizacija se ne primenjuje rutinski, mada su mnoge studije pokazale značajan benefit za opstanak kalema kod HLA-A, HLA-B i HLA-DR tipizacije [15,16,17]. Kasni gubitak kalema usled hronične reakcije odbacivanja zajedno sa neželjenim efektima dugotrajne imunosupresivne terapije glavne su prepreke ka uspešnoj transplantaciji. Operativna tolerancija, koja se definiše kao odsustvo akutne i hronične reakcije odbacivanja i trajni opstanak grafta sa normalnom funkcijom u odsustvu hronične imunosupresivne terapije, predstavlja najatraktivniju alternativu [18].

Redukcija odbacivanja alografta može se postići i izborom odgovarajuće hirurške tehnike. Pretpostavljamo da će unapređenje tehnike lamelarne keratoplastike kao i šira primena ove hirurške procedure, pre svega za stromalnu kornealnu patologiju, značajno redukovati reakciju odbacivanja endotela. Međutim, činjenica da postoje pacijenti kod kojih perforativna keratoplastika nema alternativu kao i visok rizik za odbacivanje kalema bez adekvatnih mera profilakse opravdava kliničke i eksperimentalne studije u kojima se ispituju nove terapijske strategije.

## **1.2 IMUNOLOŠKA PRIVILEGIJA**

U poređenju sa transplantacijom drugih organa, keratoplastika urađena kod pacijenata sa keratokonusom ima relativno povoljnu prognozu i bez tkivne tipizacije ili sistemske imunosupresivne terapije. Najšire prihvaćeno objašnjenje je da se keratoplastika izvodi na imunološki privilegovanom mestu i da rožnjača predstavlja imunološki privilegovano tkivo. Medawar <sup>[19]</sup> je prvi shvatio da prednja očna komora ima jedinstvene imunološke karakteristike i uveo pojam „imunološke privilegije“. Jedno od najprihvatljivijih objašnjenja za postojanje imunološke privilegije bila je avaskularnost rožnjače i odsustvo konvencionalne limfne drenaže, što je navelo Medawara da zaključi da je prolongiran opstanak kornealnog alografta rezultat „sekvestracije“ grafta od sistemskog imunog aparata. Druga privlačna hipoteza bila je da kornealni alograft ne ispoljava donorske histokompatibilne antigene, čineći transplantat „nevidljivim“ za imuni sistem recipijenta kao i da brzo dolazi do zamene donorskog tkiva ćelijskim komponentama primaoca.

Tokom narednih trideset godina postalo je jasno da od navedenih hipoteza jedino avaskularnost ostaje kao značajan faktor i da imunološka privilegija predstavlja aktivan imunoregulatorni proces koji obuhvata aferentnu, eferentnu i centralnu blokadu imunog odgovora u okviru „imunog refleksnog luka“.

Aferentna blokada imunog odgovora podrazumeva prekid transmisije imunogenih stimulusa ka perifernom limfoidnom tkivu. Kao što je već pomenuto, normalna rožnjača i ležište primaoca ne poseduju krvne i limfne sudove <sup>[20]</sup>. Takođe, ekspresija transplantacionih antigena kod imunološki privilegovanog kornealnog alografta značajno se razlikuje od ekspresije antigena kod

neprivilegovanih transplantiranih organa [21,22]. Kornealne ćelije ne ispoljavaju II klasu MHC antigena, a prisustvo I klase MHC antigena značajno je redukovano, naročito kod endotelnih ćelija [22,23,24,25]. Centralna rožnjača poseduje samo Langerhansove ćelije koje su antigen negativne za II klasu MHC antigena.

Eferentna blokada odnosi se na ekspresiju ćelijskih membranskih i solubilnih molekula koji neutrališu imune efektorske elemente na spoju kalema i rožnjače domaćina. Griffith i saradnici [26], pokazali su da imunološka privilegija počiva na prisustvu citokina Fas liganda (FasL, poznat i kao CD96L) na epitelnim i endotelnim ćelijama rožnjače. FasL indukuje programiranu ćelijsku smrt (apoptozu) na ćelijama koje nose njegov receptor (neutrofili, aktivirane T ćelije, citotoksični limfociti) i na taj način proizvodi funkcionalnu blokadu eferentnog imunog odgovora. Takođe komplement regulatorni proteini prisutni u očnoj vodici inhibiraju kaskadu komplementa i predstavljaju efikasnu barijeru u eferentnom kraku imunog refleksnog luka.

Devijacija imunog odgovora u prednjoj očnoj komori (ACAID, *Anterior chamber associated immune deviation*) na centralnom nivou imunog refleksnog luka poznat je fenomen koji podrazumeva razvoj antigen specifične periferne tolerancije nakon uvođenja antigena u prednju očnu komoru odnosno nakon transplantacije rožnjače [27]. Prisustvo imunosupresivnih citokina, kao što su TGF- $\beta$ , IL-10, neuropeptidi i hormoni u prednjem segmentu oka, važno je za održavanje nezrelosti Langerhansovih ćelija (LĆ). Tolerogeni milje i nezrele dendritične ćelije obezbeđuju anergičan status Th1/2 ćelija i imunološku modulaciju/supresiju putem regulatornih T ćelija.

### **1.3 IMUNOLOŠKA DEVIJACIJA U PREDNJOJ OČNOJ KOMORI**

Uvođenja aloantigena u prednju očnu komoru (ortotopski kornealni alograft) indukuje sistemsku devijaciju imunog odgovora kod koje je sačuvana produkcija antitela, a suprimirana reakcija kasne preosetljivosti i odgovor citotoksičnih T limfocita [28,29]. Za ovaj oblik imunološke tolerancije Streilein i Niederkorn [30] uveli su termin „Devijacija imunog odgovora u prednjoj očnoj komori“. Ovaj fenomen pokazan je kod različitih antigena uključujući glavne i minorne antigene tkivne podudarnosti [31]. Prema široko prihvaćenom modelu, koji su postavili Streilein i Wilbanks, smatra se

da tolerogene F4/80<sup>+</sup> antigen-prezentujuće ćelije internalizuju antigena u prednjoj očnoj komori, a zatim migriraju u slezinu [32]. U marginalnoj zoni slezine složene ćelijske interakcije koje obuhvataju CD1d-eksprimirajuće B ćelije, CD4<sup>+</sup>NKT ćelije, F4/80<sup>+</sup> antigen-prezentujuće ćelije i CD8<sup>+</sup> T ćelije kulminiraju do generisanja CD8<sup>+</sup> regulatornih T ćelija (eferentnih) koje aktivno suzbijaju Th1 i Th2 posredovanu inflamaciju [33, 34, 35, 36]. Drugu grupu regulatornih T ćelija čine CD4<sup>+</sup> ćelije (afherentne) koje imaju kapacitet da spreče indukciju kasne preosetljivost nakon transfera u naivnog recipijenta. Takođe, u indukciju ACAID-a uključene su i  $\gamma\delta$ T ćelije i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelije, ali njihova funkcija nije do kraja razjašnjena [36, 37, 38, 39]. Obzirom na stratešku lokalizaciju kornealnog alografta smatralo se da ortotopski kornealni alograft ima isti efekat na indukciju ACAID-a kao i injekcija aloantigena u prednju očnu komoru. Postoji niz dokaza koji podržava ovu hipotezu. Supresija reakcije kasne preosetljivosti na donorske antigene postoji u oba slučaja, kod primaoca nakon injekcije aloantigena u prednju očnu komoru ali i kod miševa sa prihvaćemin kornealnim alograftom [40]. Takođe, manevri koji sprečavaju indukciju ACAID-a, kao što je splenektomija ili delecija NK T ćelija i  $\gamma\delta$  T ćelija, značajno povećavaju reakciju odbacivanja kornealnog alografta [39, 41, 42, 43]. Međutim, nedavno su Cunnusamy i saradnici [44] pokazali da se T regulatorne ćelije (Treg) indukovane ortotopskim kornealnim alokalemom razlikuju od Treg ćelija indukovanih injekcijom aloantigena u prednju očnu komoru. Mada obe Treg populacije promovišu opstanak kornealnog alografta, među njima postoje jasne fenotipske razlike. Jedna populacija indukovana je kornealnim alokalemom, to su CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> koje deluju u eferentnom delu imunog odgovora suzbijajući reakciju kasne preosetljivosti prethodno senzibilisanih alospecifičnih T ćelija. Druga populacija indukovana je veštačkom injekcijom aloantigena u prednju očnu komoru, CD8<sup>+</sup> T ćelije, koje takođe suzbijaju eferantnu fazu imunog odgovora [36, 44].

Suprotno prvobitnoj paradigmi da antigen u prednjoj očnoj komori internalizuju intraokularne antigen prezentujuće ćelije koje zatim migriraju u slezinu, novija istraživanja ukazuju da je indukcionni signal za ACAID najverovatnije povezan sa mrežom rezidentnih makrofaga i dendritičnih ćelija u sekundarnim limfoidnim organima<sup>[45]</sup>.

#### **1.4 ANIMALNI MODELI U EKSPERIMENTALNOJ KERATOPLASTICI**

Postojanje imunološke privilegije otežava studije reakcije odbacivanja kalema i ograničava mogućnosti za testiranje novih terapijskih pristupa. Unapređen eksperimentalni pristup, pre svega veći HLA disparitet, jedan je od ciljeva u eksperimentalnim studijama.

Bazični zaključci o imunobiologiji reakcije odbacivanja dobijeni su na zečjim očima, koje su po veličini uporedive sa ljudskim očima i pružaju lak operativni pristup standardnim hirurškim instrumentima. Na ovom modelu Khodadoust i Silverstein <sup>[46]</sup> pokazali su da aloimuni odgovor i reakcija odbacivanja može da zahvati sve slojeve donorske rožnjače, uključujući epitel, stromu i endotel. Takođe, ovaj eksperimentalni model korišćen je i za ispitivanje efekata imunosupresivnih lekova na opstanak kornealnog alokalema <sup>[47,48]</sup>. Glavni nedostatak ovog eksperimentalnog modela je nedovoljno poznavanje imunog sistema zečeva, naročito HLA antigena koji su važni za transplantaciju, a nisu bili adekvatno tipizirani kod ovih vrsta. Ovi nedostaci ograničavali su dalja istraživanja imunobiologije reakcije odbacivanja.

Razvojem transplantacionih kornealnih modela na pacovima <sup>[49]</sup> i naročito miševima<sup>[50]</sup> izbegnuti su nedostaci prethodnih modela i omogućeno je istraživanje reakcije odbacivanja na inbred životinjama korišćenjem širokog spektra imunoloških reagenasa koji su na raspolaganju.

Prednosti ovog modela perforativne keratoplastike su:

1. Detaljno poznavanje imunogenetike različitih inbred sojeva miševa
2. Raspolaganje širokim spektrom monoklonskih antitela
3. Uporedive imunološke karakteristike sa humanom korneom (slična distribucija HLA antigena kod miševa i ljudi)
4. Mogućnost postizanja reproducibilnih hirurških rezultata na mišjim očima primenom odgovarajuće mikrohrurške tehnike.



Kao i kod ljudi, važne imunološke reakcije kod ovih životinja pod kontrolom su gena glavnog histokompatibilnog kompleksa. Zanimljivo je da je raspored ovih gena sličan kod ljudi i miševa.

Imajući u vidu navedene prednosti ovog modela, eksperimentalna keratoplastika u ovoj studiji rađena je u visoko-rizičnoj kombinaciji miševa sa potpuno nepodudarnim glavnim i minornim histokompatibilnim antigenima.

## **1.5 MEHANIZAM ODBACIVANJA KORNEALNOG ALOKALEMA**

Eksperimentalni modeli keratoplastike najviše su doprineli razumevanju lokalnih i sistemskih imunih mehanizama koji učestvuju u odbacivanju alotransplantata. Reakcija odbacivanja kornealnog kalema složen je proces čiji ćelijski i molekularni mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni, međutim, mnogi kritični momenti definisani su zahvaljujući modelima na životinjama i obuhvataju sledeće ključne faze:

1. Aferentna faza podrazumeva oslobađanje antigena, njegovo prepoznavanje i transport do drenirajućih limfnih čvorova putem antigen prezentujućih ćelija.
2. U centralnoj fazi prezentovani aloantigen indukuje specifičan ćelijski imuni odgovor.
3. Eferentna faza odnosi se na efekat eferentnih ćelija na kalem i njegovu eventualnu destrukciju.

### **1.5.1 Antigen-prezentujuće ćelije**

Kornealne antigen-prezentujuće ćelije (AP ćelije) potiču iz kostne srži i obuhvataju dendritične ćelije (DĆ), Langerhansove ćelije i makrofage <sup>[51]</sup>. Ranije se smatralo da rožnjača sadrži mali broj LĆ, uglavnom na periferiji kornealnog epitela. Međutim, Hamrah i saradnici dokazali su prisustvo velikog broja ovih ćelija u epitelu normalne, neinflamirane rožnjače. Na periferiji i limbusu, polovina LĆ su MHC II<sup>+</sup>, suprotno Langerhansovim ćelijama u centralnoj i paracentralnoj zoni koje ne ispoljavaju II klasu MHC antigena (MHCII<sup>-</sup>). Takođe, navedene ćelije su CD45<sup>+</sup>, Cd11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>. Odsustvo CD80 i CD86 ekspresije ukazuje na

nezreo ćelijski fenotip. Nezrele ćelije zadržavaju sposobnost obrade antigena ali nemaju sposobnost stimulacije T ćelija [51]. Citokini kao što su interleukin-1 (IL-1) i tumor nekrotični faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) koji se oslobađaju u toku inflamacije (posle hirurške traume) mogu da povećaju ekspresiju MHC antigena kao i CD80 i CD86 kostimulatornih molekula na površini LČ promovišući njihovu migraciju [52]. Takođe, Hamrah i saradnici [53] otkrili su prisustvo značajnog broja funkcionalno nezrelih, rezidentnih dendritičnih ćelija u centru prednje strome koje su MHC II<sup>-</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>. S druge strane, na periferiji prednje strome rožnjače lokalizovane su zrelije dendritične ćelije koje su MHCII<sup>+</sup> i CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>. Pod određenim uslovima, pod dejstvom proinflamatornih molekula, dolazi do sazrevanja i aktivacije rezidentnih kornealnih dendritičnih ćelija koje bi mogle da omoguće direktnu prezentaciju antigena recipijentnim T ćelijama.

### **1.5.2 Direktna i indirektna prezentacija antigena**

Prezentacija aloantigena T ćelijama primaoca inicijalni je korak u reakciji odbacivanja alografta. Kod direktne alosenzitizacije donorske AP ćelije koje potiču od grafta - „putujući leukociti“ - migriraju od grafta do drenirajućih limfnih čvorova primaoca i prezentuju intaktne MHC antigene naivnim T ćelijama domaćina. Kod indirektnog puta regrutovane AP ćelije primaoca iz limbalnih krvnih sudova i periferije rožnjače sazrevaju i putem krvnih i limfnih sudova migriraju do drenirajućih limfnih čvorova gde prezentuju aloantigen naivnim T ćelijama u prisustvu sopstvenih MHC molekula.

Relativni značaj direktnog ili indirektnog puta u reakciji odbacivanja kornealnog kalema uslovljen je stanjem ležišta primaoca<sup>[54]</sup>. Direktni put relevantan je kod visoko-rizične keratoplastike. Prisustvo donorskih Langerhansovih ćelija dramatično povećava stopu odbacivanja kornealnog alokalema [55]. S druge strane, tokom čuvanja kornealnog tkiva u medijumu pre transplantacije, donorske dendritične ćelije migriraju u medijum tokom prve nedelje, pa je broj MHC II pozitivnih dendritičnih ćelija značajno redukovano [56]. Takođe, He i Niderekorn [57], pokazali su da prethodna redukcija donorskih AP ćelija pomoću UV zračenja ili hiperbaričnog kiseonika značajno smanjuje stopu odbacivanja kornealnog kalema.

### 1.5.3 T ćelijska aktivacija

Antigen-specifična aktivacija T limfocita zavisi od serije signala koji se prenose između T ćelija i AP ćelija. Za potpunu aktivaciju i proliferaciju neophodna su najmanje dva signala:

Prvi, triger signal prenosi se sa kompleksa koga čini peptid-MHC molekul na AP ćelijama prema TCR-CD3 kompleksu koji je odgovoran za antigenu specifičnost imunog odgovora.

Drugi, kostimulatorni signal prenosi se preko površinskih ćelijskih receptora sa odgovarajućim ligandima između AP i T ćelija, pojačavajući triger signal. Ako nisu efikasno stimulisane putem ova dva signalna puta T ćelije postaju anergične.

Kostimulatorni molekuli pripadaju grupi molekula koji su od krucijalnog značaja u interkciji između AP i T ćelija. Među najznačajnijim su CD28-B7 (CD80, CD86), CD40-CD40L (CD154), LFA-1-ICAM-1 i drugi. Kostimulatorna signalna interakcija sa T ćelijama je dvosmerna, pozitivna ili negativna [58]. Na suprot stimulatornoj interakciji između CD28 molekula eksprimiranog na T ćeliji sa CD80/CD86 receptorom na AP ćeliji koja dovodi do T ćelijske aktivacije, smatra se da interakcija između CTLA-4 molekula i CD80/CD86 ima inhibitorni efekat na T ćelije. Zanimljivo je da blokada ovog signalnog puta pomoću anti-CD28 monoklonskih antitela (mAt) efikasnije prolongira opstanak kornealnog alokalema u odnosu na CTLA-4 Ig [59]. Takođe, blokada CD40-CD154 kostimulatornog puta, sistemskom administracijom anti-CD154 mAt, značajno smanjuje reakciju odbacivanja kornealnog alokalema kako kod keratoplastike normalnog rizika tako i kod visoko-rizičnog grafta [60].

Reakcija odbacivanja kornealnog alografta odvija se posredstvom T limfocita. Eksperimentalna istraživanja na kornealnim alokalemovima (kod glodara) pokazala su da redukcija CD4<sup>+</sup> T ćelija dramatično snižava incidencu imunološkog odbacivanja kalema [61, 62, 63, 64]. Takođe, studije sa adoptivnim transferom dodatno su potvrdile ulogu CD4<sup>+</sup>T ćelija u reakciji odbacivanja kornealnog alografta. [44, 63]. Hattori i saradnici [65] pokazali su da je supresija CD4<sup>+</sup>T ćelijskog imunog odgovora u korelaciji sa boljim opstankom kalema.

U okviru CD4<sup>+</sup> T ćelijske populacije najopsežnije analizirani i okarakterisani podtipovi ćelija su Th1, Th2, Th17 kao i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatorna ćelijska linija.

Th1 tip ćelija predominantno proizvodi IL-2 i IF- $\gamma$  koji posreduju u ćelijskom imunom odgovoru uključujući reakciju kasne preosetljivosti. Smatra se da CD4<sup>+</sup> Th1 imune ćelije imaju primarnu ulogu u reakciji odbacivanja kornealnog alokalema. Ovo zapažanje proisteklo je iz studija na humanim kornealnim kalemovima i eksperimentalnoj transplanatciji rožnjače kod glodara, gde je u odbačenim kornealnim kalemovima pokazano prisustvo CD4<sup>+</sup> T ćelija i IF- $\gamma$  [66, 67]. Takođe, Th1 ćelije posreduju u reakciji kasne preosetljivosti čija supresija dovodi do dugotrajnog opstanka kornealnog alografta [43,64]. Više studija pokazalo je dramatičnu redukciju stope odbacivanja kornealnog alografta kod CD4<sup>-/-</sup> miševa i nakon primene anti-CD4<sup>+</sup> antitela koja vrše depleciju (*depleting At*) [61]. Tačni efektorski mehanizmi kojima Th1 ćelije posreduju u reakciji odbacivanja kalema nisu do kraja razjašnjeni. Pretpostavlja se da značajnu ulogu imaju solubilni medijatori koje oslobađaju Th1 ćelije tokom reakcije kasne preosetljivosti. Konstatovan je porast proteina i nivoa iRNK za TNF-alfa i IF- $\gamma$  u odbačenim kornealnim kalemovima [67,68]. Takođe, pokazano je da TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  povećavaju ekspresiju adhezionih molekula kao što su VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina koji su bitni za regrutovanje mononuklearnih ćelija do kalema [69].

Prema klasičnoj Th1/Th2 paradigmi CD4<sup>+</sup>Th2 ćelije proizvode IL-4, IL-5 i IL-13 koji regulišu Th1 ćelije sprečavajući Th1 imuni odgovor [70,71]. U skladu sa navedenim, smatralo se da preusmeravanje imunog odgovora na Th2 put, dovodi do supresije Th1 imunog odgovora i produženog opstanka kornealnog alokalema. Međutim, reakcija odbacivanja kornealnog alokalema odvija se i kod IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> miševa kao i miševa koji su prethodno tretirani IFN- $\gamma$  monoklonskim antitelima, sa karakterističnom eozinofilnom infiltracijom i ekspersijom Th2 citokina, što ukazuje na potencijalnu ulogu i drugih mehanizama odbacivanja alografta [72,73]. Kod atopijskih bolesti koje su karakteristično bazirane na Th2 imunom putu, incidenca i tempo odbacivanja alokalema značajno se povećava [74, 75] jer se reakcija odbacivanja alokalema ostvaruje kombinovanim efektom Th1 i Th2 ćelija koje sinergično ubrzavaju odbacivanje alografta [75]. Tačan mehanizam kojim deluju Th2 ćelije nije sasvim razjašnjen. Pretpostavlja se da alospecifične Th2 ćelije

dolaze do kalema i proizvode IL-5 koji regrutuje eozinofile koji zatim posreduju u oštećenju tkiva multiplim efektorskim mehanizmima [76]. Međutim, novije studije ukazuju da eozinofili nisu neophodni za reakciju odbacivanja kornealnog alokalema kod Th2 baziranog aloimunog odgovora [77].

Nedavno su identifikovane CD4<sup>+</sup> Th17 ćelije, nova podgrupa za koju je karakteristična sekrecija interelukina -17A [78]. U nekim radovima Th17 ćelije dovode se u vezu sa reakcijom odbacivanja transplantata za koju se ranije smatralo da je Th1 posredovana [79]. S druge strane, nedavno su Cunnusamy i saradnici [72] pokazali da sistemska blokada IL-17A pomoću monoklonskih antitela narušava imunološku privilegiju i ubrzava odbacivanje kornealnog alokalema. Takođe, suprotno poznatoj postulaciji o ukrštenoj regulaciji između Th1 i Th17 ćelijske populacije, Cunnusamy i saradnici navode da kod keratoplastike, alospecifične Th17 ćelije imaju jedinstvenu ulogu da regulišu Th2 ćelije, što međutim treba i dodatno da se potvrdi.

## **1.6 REGULATORNE CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ĆELIJE**

### **1.6.1 Fenotipske karakteristike i molekularna osnova supresije posredovane Treg ćelijama**

Regulatorne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija prvi je identifikovao Sakaguchi. On je pokazao da transfer CD4<sup>+</sup> T ćelija bez CD25<sup>+</sup> T ćelija koje potiču od normalnog miša, odgovarajućem atimičnom singenom primaocu sa T ćelijskim deficitom (nu/nu) dovodi do spontanog razvoja niza autoimunih bolesti kod primaoca kao što su tiroiditis, gastritis, insulitis, glomerulonefritis, artritis. Međutim, zanimljivo je da rekonstitucija odgovarajućim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelijama, 10 dana nakon transfera CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelijama može da spreči navedene bolesti [80]. Nakon toga, opisano je i postojanje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija u perifernoj krvi i limfoidnim organima kod ljudi [81, 22]. Navedena autoimuna i inflamatorna oboljenja kod miševa imunopatološki su slična odgovarajućim bolestima kod ljudi kao što su autoimuni gastritis, Hashimoto tiroiditis, dijabetes tip I, inflamatorna bolest GIT-a. Međutim, prvi dokazi o regulatornoj sposobnosti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija potiču od Hall-a i saradnika na modelu adoptivnog transfera transplantacione tolerancije kod eksperimentalne transplantacije srca na pacovima [83].

Prirodne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne T ćelije (nTreg, natural Treg) nastaju u timusu pozitivnom selekcijom kroz interakciju sa timusnim kortikalnim epitelom koji ispoljava MHC molekule II klase [84], a potom migriraju ka periferiji [85]. Razvoj prirodnih T regulatornih ćelija u timusu uslovljen je ekspresijom transkripcionog faktora Foxp3 [86, 87]. Kod miševa, Foxp3 ekspresija ograničena je na Treg ćelije i predstavlja najbolji marker za njihovu identifikaciju [88]. Slično je i kod ljudi gde je Foxp3 takođe predominantno eksprimiran u populaciji CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija. Genetski Foxp3 deficit dovodi do razvoja fatalnih limfoproliferativnih bolesti koje zahvataju brojne organe [89]. Foxp3 mutacija kod ljudi kulminira do razvoja analognog fatalnog oboljenja, IPEX sindroma (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked). Studije su pokazale da bez ekspresije Foxp3 proteina regulatorne T ćelije gube svoju supresorsku funkciju kako *in vivo* tako i *in vitro* [90, 91].

Retrovirusna transdukcija Foxp3 faktora može da konvertuje naivne T ćelije u regulatorni T ćelijski fenotip koji je sličan prirodnim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija. Nakon Foxp3 transdukcije CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T ćelije mogu da suzbiju proliferaciju T ćelija *in vitro* i da spreče razvoj autoimunih oboljenja *in vivo* [87, 88]. Navedni podaci upućuju da Foxp3 (FOXP3 kod ljudi) predstavlja glavni regulatorni gen za razvoj i funkciju prirodnih Treg ćelija u timusu i na periferiji.

Značajno je pomenuti da suprotno stabilnoj Foxp3 ekspresiji kod prirodnih Treg ćelija, aktivirane naivne T ćelije kao i diferencirane Th1 i Th2 ćelije ne ispoljavaju Foxp3, što ukazuje na njegovu visoku specifičnost za prirodne Treg ćelije [86, 87]. Međutim, Foxp3 je intracelularni protein pa se ne može koristiti za izolaciju ćelija za funkcionalna ispitivanja. Površinski ćelijski markeri kod CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija kao što su CD25, CD45RB, CTLA-4 i GITR onemogućavaju kompletnu diskriminaciju između regulatornih i aktiviranih efektorskih ili memorijskih T ćelija.

Većina endogenih CD4<sup>+</sup> Treg ćelija konstitucionalno eksprimira CD25 (IL-2R $\alpha$  tj.  $\alpha$  podjedinica IL-2 receptora) [92]. Obzirom da svaka aktivirana T ćelija takođe ispoljava CD25, ovaj površinski marker nije specifičan samo za prirodne Treg ćelije. Međutim, kod CD4<sup>+</sup> T ćelija sa regulatornim potencijalom nivo ekspresije CD25 molekula je visok i stabilan, za razliku od prolazne i niske ekspresije kod tek aktiviranih T ćelija [93].

Nedostatak IL-2, IL-2R $\alpha$  (CD25) ili IL-2R $\beta$  (CD122) dovodi do fatalnih limfoproliferativnih inflamatornih oboljenja sa autoimunim komponentama koje se opisuju kao sindrom deficita interleukina-2 [92, 94]. Mada je prošlo više od 25 godina od otkrića interleukina-2, njegova precizna funkcija u fiziologiji imunog sistema još uvek nije sasvim jasna. In vitro, IL-2 potentno stimuliše rast T ćelija i ekspanziju njihove populacije [95], dok je *in vivo* dominantna funkcija interleukina-2 održavanje imunološke homeostaze i autotolerancije. Naizgled paradoksalan zaključak je da IL-2 ima dve suprotne funkcije tj. potencira T ćelijsku proliferaciju i prekida T ćelijski odgovor. Objašnjenje za ovaj paradoks bazira se na kritičnoj funkciji interleukina-2 u preživljavanju i proliferaciji Treg ćelija, a time i održavanju stanja tolerancije na sopstvene antigene. Za ispoljavanje pune supresorske aktivnosti nTreg ćelija pored stimulacije T ćelijskog receptora potreban je i IL-2 koji potiče od drugih ćelijskih tipova, obzirom da ga same nTreg ne proizvode. U fiziološkim uslovima, IL-2 potiče najviše od aktiviranih CD4<sup>+</sup> T ćelija, a u manjem stepenu od CD8<sup>+</sup> T ćelija [96]. Neke studije navode i dendritične ćelije kao potencijalni izvor IL-2 [97]. Kod normalnih miševa u uslovima odsustva inflamacije, nizak nivo IL-2 omogućava preživljavanje i perifernu homeostazu nTreg ćelija bez ispoljavanja njihove efektorske funkcije. Međutim, kod inflamatornih stanja kao što su autoimunost, infekcije, geneza tumora, visok nivo IL-2 pokreće supresorsku funkciju nTreg ćelija sa sledstvenom inhibicijom klonalne ekspanzije i funkcije efektorskih T ćelija. Ovaj supresivni efekat je vremenski ograničen obzirom da prekidom imunog odgovora nivo IL-2 opada a time i aktivnost nTreg ćelija. Na taj način sprečava se sistemska imunosupresija [98].

Jedna od karakteristika prirodnih CD4<sup>+</sup> T regulatornih ćelija, bilo da su CD25<sup>+</sup> ili CD25<sup>-</sup>, je da konstitutivno ekspimiraju CTLA-4 za razliku od naivnih T ćelija koje ispoljavaju ovaj molekul samo nakon T ćelijske aktivacije [99, 100]. Rezultati nekih studija ukazuju na mogućnost da CTLA-4 prenosi jedan kostimulatorni signal na regulatorne T ćelije, odnosno da zajednički signali preko CTLA-4 i T ćelijskog receptora aktiviraju Treg ćelije koje potom ispoljavaju supresivni efekat, dok CTLA-4 blokada sprečava aktivaciju Treg ćelija i time redukuje supresiju što je praćeno razvojem autoimunih bolesti [80, 100].

GITR je član TNF receptorske familije i prevažodno prisutan na regulatornim T ćelijama [101, 102]. Aktivirane T ćelije takođe mogu da povećaju GITR nivo ekspresije, ali ne stiču supresivne sposobnosti. Tačna uloga ovog receptora kod ljudi i miševa nije do kraja jasna, ali se pretpostavlja da ima značajniju ulogu u razvoju supresivne funkcije regulatornih T ćelija nego u samom ispoljavanju supresorskih efekata.

IL-10 i TGF- $\beta$  dva su važna solubilna medijatora uključena u autokrine mehanizme kojim Treg ćelije ispoljavaju regulatornu funkciju. Aktivirane Treg ćelije proizvode više TGF- $\beta$  i IL-10 u poređenju sa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T ćelijama [103]. Supresija prirodnim Treg ćelijama je IL-10 i TGF- $\beta$  nezavisna, međutim supresija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelijama koje su indukovane od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T ćelija u prisustvu Treg ćelija *in vivo* i *in vitro* je IL-10 ili TGF- $\beta$  zavisna [102]. Na mestu inflamacije kao što je alograft, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorne ćelije mogu da suprimiraju efektorske CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije na način koji je uslovljen ćelijskim kontaktom (TGF- $\beta$  na površini ćelijske membrane može biti uključen u ovoj fazi). Pošto su suprimirane, efektorske ćelije mogu da postanu IL-10/TGF- $\beta$  proizvodeće regulatorne ćelije i na taj način inhibiraju druge CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije. Na ovaj način može da se objasni činjenica da je adoptivni transfer malog broja CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija dovoljan za postizanje transplantacione tolerancije ili prevenciju autoimune bolesti. Jiang i Lechler pretpostavljaju da je supresija prirodnim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelijama *per se* IL-10 nezavisna, dok je supresija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelijama indukovanim od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelijama u prisustvu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> prirodnih supresorskih ćelija, *in vivo* ili *in vitro*, uglavnom IL-10 zavisna [104].

Pokazano je da je supresorska funkcija Treg ćelija *in vitro* uslovljena ćelijskim kontaktom. Prisustvo semipermeabilne membrane između regulatornih i efektorskih ćelija onemogućava supresorski efekat Treg ćelija. Molekularna osnova kontaktne interakcije nije do kraja razjašnjena. Nakamura i saradnici pokazali su da stimulisane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelije proizvode TGF- $\beta$ 1 i ispoljavaju TGF- $\beta$ 1 na svojoj površini, što ukazuje na mogućnost da Treg ćelije mogu da ispolje imunosupresiju kroz interakciju ćelija-ćelija putem površinskog TGF- $\beta$ 1 [105], mada drugi autori nisu potvrdili ove rezultate [106].



## 1.7 EFEKAT IMUNOSUPRESIVNIH LEKOVA NA CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ĆELIJE

Nekoliko studija pokazalo je da stimulacija T ćelijskog receptora i IL-2 imaju ključni značaj za funkciju i održavanje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija na periferiji [94, 107] kao i da je IL-2 neophodan za razvoj Treg ćelija u timusu [94]. Ciklosporin A (CsA) inhibira aktivaciju posredovanu T ćelijskim receptorom i produkciju IL-2, dok rapamicin (Rapa) blokira ćelijski rast i proliferaciju kao odgovor na IL-2 i na taj način omogućava inicijalnu signalnu transdukciju nakon stimulacije T ćelijskog receptora [108].

Oba jedinjenja, CsA i Rapa, ispoljavaju svoj imunosupresivni efekat vezivanjem za članove porodice intraćelijskih proteina poznatih kao imunofilini, formirajući komplekse koji utiču na signalni put bitan za klonalnu ekspanziju limfocita. Kompleks CsA-imunofilin inhibira kalcijum zavisnu serin/treonin fosfatazu -kalcineurin i na taj način sprečava nuklearnu translokaciju NFAT transkripcionih faktora iz citoplazme i sledstvenu gensku transkripciju citokina, uključujući IL-2. Kalcineurin je prisutan i u drugim ćelijama, ali u značajno manjoj koncentraciji, zbog čega su T ćelije veoma osetljive na inhibitorni efekat kalcineurinskih inhibitora.

Rapamicin-imunofilin kompleks blokira serin/treonin kinazu poznatu kao mTOR, što dovodi do inhibicije fosfatidil-inozitol-3-kinaza (PI3K) signalnog puta i IL-2-indukovane proliferacije T ćelija. [109]. Blokada ovog puta zaustavlja ćelije u G1 fazi ćelijskog ciklusa. Za razliku od CsA, Rapa takođe deluje na fenotip i funkciju dendritičnih ćelija, favorizujući njihovu diferencijaciju u tolerogene ćelije [18].

Mnogi geni koje reguliše transkripcioni faktor FOXP3 takođe su i ciljni geni za NFAT. Mehanizam kojim FOXP3 utiče na ekspresiju NFAT-zavisnih gena nije poznat. Interleukin-2 i IL-4 gene aktivira NFAT a inhibira FOXP3, dok CD25 i CTLA-4 gene ushodno regulišu i NFAT i FOXP3 [87, 110].

Wu i saradnicu [111] nedavno su pokazali da su oba efekta, uključujući represivni FOXP3 uticaj na gensku ekspresiju navedenih citokina ali i njegov aktivirajući efekat na gene za CTLA-4 i CD25 markere na Treg ćelijama odraz formiranja kooperativnog kompleksa između NFAT i FOXP3. Zanimljivo je da jedan transkripcioni faktor, NFAT, usmerava dva potpuno suprotna biološka programa, T ćelijsku aktivaciju i T ćelijsku

toleranciju, regrutovanjem nevezanih transkripcionih partnera, AP-1 odnosno FOXP3, do regulatornih regiona odgovarajućih ciljnih gena. Zajednički regulator, NFAT, formira transkripcioni kompleks sa AP-1 kod efektorskih T ćelija, a kod regulatornih T ćelija u formiranju transkripcionog kompleksa učestvuje FOXP3. Obzirom da je kalcineurin poznat regulator NFAT transkripcionog faktora, razumljivo je da terapija kalcineurinskim inhibitorima može da ima značajan efekat na regulatorne T ćelije direktnim uticajem na NFAT:FOXP3 interakciju [111, 112].

Drugo veoma značajno zapažanje kod Treg ćelija je da IL-2 primarno aktivira JAK/STAT put u Treg ćelijama u odnosu na PIK3 signalni put [113, 114]. Aktivacija signalnog puta koji vodi od PIK3 do mTOR skoro je potpuno odsutna kako kod primarnih Treg tako i kod Foxp3-transgenih CD4<sup>+</sup> T ćelija nakon stimulacije IL-2R [115]. Kod Treg ćelija efekat IL-2 ostvaruje se aktivacijom JAK/STAT puta, dok rapamicin senzitivni PIK3 signalni put nije aktiviran [114]. Navedena zapažanja objašnjavaju različit efekat rapamicina na Treg i efektorske T ćelije u korist preživljavanja i funkcije regulatornih T ćelija. Zbog toga je sugerisano da rapamicin ne utiče na periferno preživljavanje Treg ćelija [116].

## **1.8 ULOGA CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ĆELIJA U INDUKCIJI TRANSPLANTACIONE TOLERANCIJE**

U eksperimentalnoj transplantaciji, više studija ukazalo je na ulogu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija u održavanju transplantacione tolerancije na donorske antigene [83, 117, 118, 119]. Međutim, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelije nisu jedine regulatorne ćelije koje poseduju imunosupresivna svojstva. Regulatorna svojstva ispoljavaju i neke druge populacije ćelija kao što su prirodne NKT regulatorne ćelije [120], *in vitro* generisane Tr1 ćelije (tip 1 regulatornih T ćelija) koje proizvode IL-10 [121], TGF- $\beta$  proizvodeće T<sub>H</sub>3 ćelije [122], CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ćelije [123], CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije [124] i anergične CD4<sup>+</sup> T ćelije kao regulatorne ćelije [125]. Imajući u vidu da regulatorne ćelije predstavljaju heterogenu populaciju, najverovatnije je da različite podgrupe regulatornih ćelija deluju orkestrirano u odražavanju transplantacione tolerancije i prevenciji autoimunosti.

Prirodne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelije su potentne supresorske ćelije koje mogu da spreče efektorsku ćelijsku funkciju različitih limfocita uključujući efektorske CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T ćelije, citotoksične CD8<sup>+</sup>T ćelije, NK ćelije i B ćelije [119].

Treg ćelije mogu da utiču na funkciju drugih T ćelija, bilo direktno ili indirektno preko efekata na AP ćelije [126]. Rezultat ove interakcije može da bude inhibicija produkcije citokina, smanjena ekspresija kostimulatornih i/ili adhezionih molekula, inhibicija proliferacije, indukcija anergije ili u nekim situacijama eliminisanje određene populacije promocijom ćelijske smrti ili čak konverzijom u regulatorni fenotip u procesu takozvane infektivne tolerancije [127, 128]. Pomoću modela infektivne tolerancije može se objasniti doživotna tolerancija [129]. Kada se nova T ćelija nađe u jednom rezistentnom tolerantnom okruženju (iz timusa ili eksperimentalno inicirana), a imunoregulacija je dominantan mehanizam tolerancije, ove ćelije ne samo što postaju tolerantne na donorske antigene već mogu da suprimiraju i druge naivne T ćelije u odbacivanju kalema [129]. Na taj način dalje se podstiče tolerantno stanje nakon transplantacije [127]. Molekularni mehanizmi odgovorni za ovu konverziju zahtevaju dodatna istraživanja. In vivo, Th2 citokini mogu biti uključeni [130], dok *in vitro* studije ukazuju na potencijalnu ulogu TGF- $\beta$  i IL-10 [128, 131].

### **1.8.1 Značaj prirodnih i indukovanih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija in vivo**

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregulatorne ćelije čine približno 5-10% od ukupnog broja CD4<sup>+</sup> T ćelija na periferiji, uglavnom u limfoidnim organima kao što su limfni čvorovi i slezina. Kod ljudi i glodara CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelije su anergične *in vitro* i ne reaguju na uobičajene stimulse koji izazivaju snažnu proliferaciju CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T efektorskih ćelija [132]. Međutim, ove Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelije mogu značajno da se ekspandiraju *in vivo* kod limfopenije ili antigen stimulisane proliferacije [133]. Tačni mehanizmi koji su uzrok različitog ponašanja ovih ćelija u *in vivo* i *in vitro* uslovima nisu poznati.

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregulatorne ćelije ne predstavljaju uniformnu populaciju već se sastoje od prirodnih Treg ćelija koje su se razvile u timusu i stečenih ili indukovanih (iTreg) koje su generisane na periferiji. Indukovane Treg ćelije

nastaju konverzijom zrelih efektorskih T ćelija na periferiji ili ekspanzijom prirodnih Treg ćelija. Iz toga verovatno proizilazi različita antigena specifičnost repertoara njihovog T ćelijskog receptora. Pored toga, iTreg posebno su nestabilne i imaju tendenciju da izgube Foxp3 ekspresiju lakše od prirodnih Treg ćelija što je verovatno vezano za epigenetske razlike u Foxp3 genu kod ovih podgrupa [134]. Ove razlike mogu biti od značaja u terapijskim manipulacijama nTreg i iTreg ćelijama [135]. U nekim publikacijama pokazana je slična potentnost nTreg i iTreg ćelija u supresiji efektorskih T ćelija [136]. Međutim, relativan značaj nTreg i iTreg u transplatacionim modelima ostao je nepoznat. Prirodne Treg ćelije mogu takođe da budu aloreaktivne putem ukrštene reaktivnosti sa aloantigenima. U nekoliko transplantacionih modela indukcija tolerancije na alografta sprečena je eliminisanjem nTreg ćelija [93]. Tačna proporcija i identitet nTreg ćelija koje su aloreaktivne nije jasan, obzirom da ne postoje specifični markeri na osnovu kojih bi se razlikovale aloreaktivne nTreg od ne-aloreaktivnih nTreg ćelija. U idealnim uslovima, terapija koja promoviše Treg-posredovanu toleranciju treba selektivno i specifično da aktivira i ekspandira aloreaktivne nTreg ćelije [135].

Idealno gledano, iTreg mogle bi da imaju posebno značajnu ulogu u donor specifičnoj toleranciji obzirom da potiču od antigen specifičnih T efektorskih ćelija. Studije koje pokušavaju da ekspandiraju iTreg *ex vivo*, a potom ih koriste *in vivo* u adoptivnom transferu privukle su veliku pažnju, obzirom da u pojedinim modelima iTreg ćelije mogu da imaju ključnu ulogu u indukciji tolerancije [137]. Međutim, oskudnost iTreg ćelija *in vivo* čak i u tolerantnim uslovima zabrinjava. Potencijalni problem je kompeticija za prostor, izvore i preživljavanje između indukovanih i prirodnih Treg ćelija pa u navedenim uslovima iTreg ćelije mogu biti dodatno ugrožene. Drugi problem je mogućnost preusmeravanja indukcije Treg ćelija u pravcu patogenih Th17 ćelija u prisustvu inflamatornih citokina [138]. Da li bi eventualno blokiranje tkivne inflamacije podstaklo indukciju Treg ćelija ostaje da se dodatno ispita [135].

## 1.9 STRATEGIJE ZA EKSPANZIJU PRIRODNIH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ĆELIJA

### 1.9.1 Aloantigen-specifične CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelije kod naivnog domaćina

Aloantigeni mogu teorijski da indukuju razvoj regulatornih T ćelija pozitivnom selekcijom u timusu, klonalnom ekspanzijom perifernih prirodnih Treg ćelija koje pokazuju ukrštenu reaktivnost sa aloantigenima i konverzijom naivnih ili aktiviranih aloantigen-specifičnih perifernih ćelija u regulatorni fenotip.

Mada je timus potreban za produkciju prirodnih Treg ćelija [139, 140] nije poznato da li je i od esencijalnog značaja za razvoj aloantigen-specifičnih Treg ćelija ili su one generisane isključivo od perifernih T ćelija. Pokazano je da je ponovljena antigena ekspozicija na periferiji dovoljna za generisanje Treg ćelija [141]. Nakon transplantacije, kontinuirano prisustvo donorskih aloantigena iz grafta, trebalo bi da promoviše generaciju Treg ćelija, a postoje i jasni dokazi da je graft sam po sebi od krucijalnog značaja za održavanje tolerancije *in vivo* [142].

Imajući u vidu ukrštenu reaktivnost T ćelija [143] i raznovrsnost T ćelijskih receptora koje ispoljavaju prirodne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T ćelije [139] izgleda veoma verovatno da bi jedan deo prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih ćelija ukršteno reagovao sa aloantigenima. Međutim, broj ovih ćelija verovatno je mali i u nekim slučajevima nedovoljan da bi bile detektovane *in vivo* [117, 144]. Graca [145] i saradnici pokazali su da prirodne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T ćelije od naivnih miševa mogu da spreče reakciju odbacivanja kožnog transplantata nakon adoptivnog transfera bez obzira na odsustvo prethodnog iskustva sa donorskim aloantigenom. Uočeno je da se potentnost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> populacije povećava nakon indukcije transplantacione tolerancije, obzirom da je bilo potrebno 5 puta više CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T ćelije od naivnih miševa u odnosu na broj Treg ćelija od tolerantnih miševa koje su mogle da spreče naivne splenocite u odbacivanju kožnog grafta. To ukazuje na činjenicu da kapacitet da regulišu reakciju odbacivanja već postoji u naivnim miševima i može biti višestruko pojačan u „tolerantnim“ miševima. Za sada nije jasno da li je to posledica ekspanzije postojeće regulatorne populacije (ukrštena reaktivnost, vezana supresija), *de novo* formiranja regulatornih ćelija ili selektivne inaktivacije mrtvih ili netolerantnih ćelija čime se balans pomera ka regulatornim mehanizmima.

Nagahama i saradnici [146] pokazali su da kod naivnog miša, u T-ćelijski deficitarnom okruženju, *in vivo* izlaganje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T ćelija aloantigenima podstiče spontanu ekspanziju aloantigen-specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> prirodnih Treg ćelija. Ove Treg ćelije mogle su da spreče reakciju na alokalem posredovanu naknadno ubačenim naivnim T ćelijama i proizvedu trajni opstanak kožnog kalema kod 23% miševa primaoca [146, 147]. Trajno prihvatanje kalema može se postići ako se omogući *in vivo* antigen-specifična ekspanzija prirodnih Treg ćelija do postizanja dovoljnog broja i supresivne aktivnosti za kontrolu ekspanzije/aktivacije aloreaktivnih efektorskih ćelija.

### **1.9.2 In vivo indukcija antigen specifične ekspanzije prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija**

Mogu se izdvojiti dve mogućnosti za korišćenje prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T reg ćelija u indukciji graft-specifične tolerancije. Jedan način podrazumeva kontrolu neregulatornih ćelija i stvaranje imunoloških uslova koji će olakšati spontanu ekspanziju antigen-specifičnih prirodnih Treg ćelija. Redukcija ili blokada aktivnosti neregulatornih T ćelija omogućava aloantigenu stimulaciju preostalih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T reg ćelija i ekspanzija aloantigen-specifičnih Treg ćelija koje će potom dominantno da suprimiraju aloreaktivne T ćelije koje se oporavljaju od redukcije ili blokade. Monoklonska antitela i neki lekovi mogu da ispolje ovaj efekat [148,83,117,149,150,151]. Izlaganje alokalemu u prisustvu anti-CD4 mAt koja ne proizvode depleciju (non-depleting) ili blokirajućih anti-CD154 mAt dovodi do pojave antigen-specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija koje mogu da spreče odbacivanje alokalema [145,117,152,149]. Rapamicin [153] može da obogati Treg ćelije *in vitro* i *in vivo*. Još uvek se tačno ne zna na koji način navedeni terapijski protokoli indukuju antigen-specifične Treg ćelije koje mogu da suprimiraju anti-donorske T ćelije i da li ove antigen-specifične Treg ćelije nastaju ekspanzijom prirodnih Treg ili su indukovane od naivnih T ćelija. Takođe, nije poznato da li terapijski protokoli sa različitim molekularnim mehanizmima imaju u osnovi zajedničku ćelijsku bazu za uspostavljanje tolerancije na alokalem. U većini slučajeva, indukovana tolerancija može da se prenese na naivne primaoce adoptivnim transferom CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> populacije koju čine ekspanzirane prirodne, a moguće i indukovane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelije tj. konvertovane od CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> prekursora tokom *in vivo* tolerizacije [145,154,155,156].

### 1.9.3 Ex vivo indukcija antigen specifične ekspanzije prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija

Druga mogućnost indukcije tolerancije je da se prirodne Treg ćelije izoluju od primaoca, stimulišu *ex vivo*, a zatim ekspandirane antigen specifične Treg ćelije ponovo inokulišu primaocu pre transplantacije organa [147, 157].

Optimalna *ex vivo* ekspanzija svežih prirodnih Treg ćelija koje bi terapijski delovale na širok spektar aloreaktivnih efektorskih T ćelijskih klonova sa očuvanim određenim svojstvima kao što su opstanak ćelija nakon infuzije, *in vivo* migracija do mesta aloreaktivnosti i aloantigen-specifična supresija od suštinskog su značaja obzirom na mali broj prirodnih Treg ćelija na periferiji [92]. Mogućnost korišćenja Treg ćelija u imunoterapiji za indukciju antigen-specifične tolerancije ograničena je brojem ćelija. Regulatorne T ćelije obuhvataju samo 5-10% CD4<sup>+</sup> T ćelija na periferiji zdravih osoba [139]. Da bi se prevazišli ovi problemi razvijena je reproducibilna strategija gde se pomoću autologih dendritičnih ćelija, kao antigen prezentujućih ćelija, postiže selekcija i ekspanzija antigen-specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija iz sveže izolovanih poliklonalnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg *in vitro*, a ove ćelije zadržavaju svoje fenotipske karakteristike i stiču potentnu antigen-specifičnu supresivnu aktivnost [158].

Do sada se zajednička kultura sa anti-CD3 i anti-CD28mAt (obložene perle) pokazala kao najefikasnija metoda za ekspanziju nTreg ćelija kod miševa i ljudi [157]. Nakon adoptivnog transfera, 1 dan nakon transplanacije srca, *ex vivo* ekspandirane sveže nTreg ćelije opstale su, migrirale *in vivo* putem periferne krvi i limfoidnog tkiva kod Rag-/- recipijentnih miševa i snažno suprimirale razvoj reakcije odbacivanja alografta, ukazujući na sličnost sa svežim nTreg ćelijama čije je održavanje uslovljeno auto ili aloantigenima [157].

Imuni odgovor na transplantirano alogeno tkivo posredovan je T ćelijama koje prepoznaju donorske histokompatibilne antigene direktnim (donor MHC i peptidi) ili indirektnim putem (MHC primaoca i peptid koji potiče od donora) [159]. Smatra se da nakon transplantacije aloreaktivne CD4<sup>+</sup> ćelije koje poseduju indirektnu alospecifičnost imaju ključnu ulogu u hroničnoj reakciji, a kontrola ovih patogenih efektorskih ćelija donor-specifičnim Treg ćelijama mogla bi zbog toga da omogući transplantacionu toleranciju.

Nedavno su prezentovani protokoli za selekciju i ekspanziju Treg ćelija sa indirektnom alospecifičnošću za jedan antigen I klase MHC kompleksa. Antigen-specifične CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelije dobijene su ponovljenom stimulacijom sveže izolovanih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg iz slezine i limfnih čvorova CBA/Ca miševa pomoću autologih dendritičnih ćelija koje su pulsirane peptidom I klase-K<sup>b</sup>. Ove ćelije zadržale su visoku FoxP3 ekspresiju i bile potentnije od sveže izolovanih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija u supresiji proliferacije i produkcije citokina od strane efektorskih ćelija [160, 158]. U ovoj studiji nije uočena ograničena proliferacija efektorskih T ćelija u prisustvu Treg *in vivo*, što ukazuje da Treg ćelije nisu imale uticaj u fazi indukcije imunog odgovora. Međutim, nakon zajedničkog transfera sa naivnim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T ćelijama, Treg ćelije inhibirale su efektorsku funkciju kao odgovor na aloantigene što se manifestovalo smanjenom produkcijom Th1 citokina. To znači da aloreaktivne ćelije mogu da perzistiraju u prisustvu regulatornih T ćelija, ali razvoj njihove efektorske funkcije može biti kompromitovan. Takođe, veoma je važna očuvana migratorna sposobnost Treg ćelija i akumulacija na mestu aloantigene prezentacije. Ove Treg ćelije mogle su da regulišu indirektni odgovor efektorskih CD4<sup>+</sup> ćelija *in vivo* nakon timektomije i parcijalnog smanjenja broja T ćelija, ali ne i da inhibiraju direktni aloimuni odgovor nakon transplantacije kože kod miševa [160]. Navedeni podaci ukazuju da su potrebne regulatorne T ćelije sa širim aloreaktivnim spektrom imajući u vidu snagu postransplantacionog ranog direktnog odgovora u potpuno nepodudarnim kombinacijama donora i primaoca. Pomoću genske transdukcije T ćelijskog receptora dobijene su *in vitro* Treg ćelije koje su ispoljavale direktnu i indirektnu alospecifičnost i bile efikasne u indukciji trajnog opstanka MHC nepodudarnog srčanog alografta kod miševa [161].

#### **1.9.4 Ekspanzija antigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija iz nefrakcionisanih CD4<sup>+</sup>T ćelija**

Bez obzira na širok spektar reaktivnosti, broj nTreg ćelija koje reaguju na strani antigen je nizak i ne može da obezbedi zaštitu od brojnih glavnih i minornih nepodudarnih antigena kalema nakon transplantacije [162, 163]. Na suprot tome, Treg indukovane kao odgovor na antigen (iTreg) generisane su od naivnih T ćelija pod definisanim uslovima *in vivo* i *in vitro* [164, 165, 66, 167].



Za terapijske potrebe, moguće je koristiti potencijal prirodnih Treg ćelija, ali i *ex vivo* generisati T ćelije sa regulatornom aktivnošću prema definisanim antigenima, kao što su aloantigeni. Da bi se povećala količina antigen specifičnih Treg ćelija za *in vivo* ćelijsku terapiju, protokoli usmereni na ekspanziju Treg ćelija treba takođe da omoguće diferencijaciju indukovanih Treg ćelija od naivnih CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> prekursora. Pokazano je da kombinacija IL-2 i TGF- $\beta$  može da indukuje CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelije da razviju imunosupresivnu aktivnost [168, 166, 167, 169, 117]. Navedeni citokini indukuju i naivne humane aloantigen-stimulisane CD4<sup>+</sup> ćelije iz periferne krvi da postanu regulatorne CD25<sup>+</sup> ćelije sa fenotipom i citokin-nezavisnim supresivnim mehanizmima koji se ne razlikuju od prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija [168]. Takođe, ove ćelije su u stanju da indukuju druge CD4<sup>+</sup> ćelije da razviju citokin-zavisnu supresivnu aktivnost *in vitro* [117]. Zheng i saradnici [170] pokazali su da periferne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije *ex vivo* aloaktivirane u prisustvu IL-2 i TGF- $\beta$  ispoljavaju transkripcioni faktor Foxp3 i postaju potentne antigen-specifične CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> supresorske ćelije. U ovoj studiji Treg ćelije indukovane *ex vivo* iz neseparisanih T ćelija pomoću IL-2 i TGF- $\beta$  značajno su produžile opstanak srčanog alografta kod potpuno MHC-nepodudarnih miševa u odsustvu limfopenije i bez dodate imunosupresije (2 od 6 alograftova opstalo je 100 dana).

Takođe, nedavno je pokazano da stimulacija nefrakcionisanih CD4<sup>+</sup> ili CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> naivnih ćelija u prisustvu *non-depleting* anti-CD4 monoklonskih antitela (YTS 177) omogućava selekciju populacije Treg ćelija koje ispoljavaju CD25 i FoxP3 i koje su u stanju da suprimiraju proliferaciju i ekspresiju citokina od strane naivnih T ćelija, *in vitro*. Ono što je najznačajnije, ove Treg ćelije mogle su da spreče odbacivanje alogenog kožnog kalema posredovano CD45RB<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T ćelija nakon zajedničkog transfera primaocima, CBA.Rag<sup>-/-</sup> miševima [171]. Ovde je takođe pokazano da anti-CD4 monoklonska antitela u mešanoj limfocitnoj kulturi omogućavaju selektivnu ekspanziju inicijalnih prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija, ali i diferencijaciju alo-antigen specifičnih indukovanih regulatornih T ćelija, što protokol baziran na primeni anti-CD4 mAt čini još atraktivnijim za buduće kliničke aplikacije [171].

Osnovni mehanizam kojim terapija anti-CD4 antelima indukuje selekciju/obogaćivanje Treg ćelija *in vitro* treba da se ispita. CD4 je važan akcesorni i

ko-stimulatorni molekul koji pojačava signal koji prima TCR kompleks i pomaže u aktivaciji T ćelija [172]. Blokada ove interakcije pomoću anti-CD4 antitela povećava prag aktivacije putem TCR kompleksa, tako da pod određenim uslovima, samo ćelije sa visokim afinitetom imaju kapacitet da budu aktivirane i da proliferišu [173]. Oliveira i saradnici [171] ukazuju na mogućnost da ove ćelije koje pokazuju visok afinitet /specifičnost za TCR mogu biti identične ćelijama koje manifestuju regulatornu sposobnost u njihovoj studiji. Takođe, redukcija ili blokada nivoa CD4 ekspresije, može da konvertuje T ćelijski odgovor od stimulatornog u inhibitorni [174]. Pretpostavlja se da je primenom navedenog protokola, T ćelijska aktivacija ciljano otežana i samo mali procenat ćelija podleže aktivaciji i proliferaciji (regulatorna populacija), dok ćelije koje ne prime nijedan signal konačno umiru apoptozom (ovo obuhvata efektorsku populaciju). Pokazano je i da aloreaktivne T ćelije tretirane anti-CD4 monoklonskim antitelima odlikuje relativna rezistencija na aktivacijom indukovanu smrt [175]. Zbog toga se pretpostavlja da anti-CD4 mAt terapija aloreaktivnih ćelija podstiče ekspanziju i diferencijaciju antigen specifičnih Treg ćelija, koje odlikuje relativna rezistencija na aktivacijom indukovanu ćelijsku smrt, dok efektorske T ćelije umiru apoptozom [171].

### **1.10 ULOGA CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ĆELIJA U OPSTANKU KORNEALNOG ALOKALEMA**

Nedavno su publikovani rezultati studija koji ukazuju na ulogu Treg ćelija u očuvanju imunološke privilegije kornealnog alokalema [176, 177]. Pregledom drenirajućih limfnih čvorova kod miševa koji su odbacili ili prihvatili ortotopski kornealni alokalem utvrđeno je da su obe kategorije miševa ispoljile jednak broj CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija [176]. Međutim, Treg ćelije izolovane od miševa koji su prihvatili kornealni alokalem ispoljile su ~50% viši nivo Foxp3 ekspresije u poređenju sa Treg ćelijama kod primaoca sa odbačenim kalemovima. Takođe, adoptivni transfer Treg ćelije od primaoca sa prihvaćenim graftom doveo je do trajnog opstanka kornealnog kalema kod 67% naivnih miševa. S druge strane, adoptivni transfer Treg ćelije od miševa sa odbačenim graftovima proizveo je trajni opstanak kalema kod 33% naivna primaoca. Iz navedenog proizilazi da dugotrajan opstanak kornealnog alokalema zavisi od razvoja CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T reg ćelija i nivoa Fox3 ekspresije u ovim ćelijama.

Hori i saradnici [177] ukazali su na kritičnu ulogu GITR liganda u očuvanju imunološki privilegovanog statusa kornealnog alografta primenom antagonističkih anti-GITRL monoklonalnih antitela u eksperimentalnoj keratoplastici na miševima. GITR ligand, konstitutivno prisutan na kornealnim endotelnim ćelijama indukuje ekspanziju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T reg ćelija u rožnjači i doprinosi imunološkoj privilegiji kornealnog alokalema. Blokada GITR liganda praćena je infiltracijom Foxp3-CD4<sup>+</sup>T ćelijama i odbacivanjem alokalema. Takođe, redukcija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T reg ćelija dovela je do ubrzanog odbacivanja kornealnog grafta, ukazujući na značaj prisustva CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T reg ćelija za opstanak kornealnog alografta.

U studiji koju je publikovao Chauhan sa saradnicima [176], Foxp3 Treg ćelije iz drenirajućeg limfnog čvora primaoca sa spontano prihvaćenim kornealnim alokalemom, bile su efikasnije u supresiji proliferacije naivnih T ćelija, ali nisu uspele da suprimiraju proliferaciju alosenzitivisanih efektorskih T ćelija. Imajući to u vidu, navedeni autor sugeriše da su Treg ćelije efikasnije u regulisanju aloimunog odgovora u fazi indukcije u poređenju sa efektorskom fazom [176].

Ovi nalazi veoma su značajni za razvoj novih terapijskih strategija ka uspostavljanju imunološke privilegije kod visoko-rizičnog domaćina.

## 2. CILJ RADA

Bez obzira na imunološku privilegiju rožnjače i prednje očne komore [23, 29], kao najčešći razlog za propadanje kalema navodi se alogena reakcija. Reakcije odbacivanja dovode do gubitka donorskih endotelnih ćelija koje imaju kritičnu ulogu u održavanju kornealne transparentije. Kod jedne trećine propalih kalemova nađeni su znaci imunološke destrukcije [8]. S druge strane, u literaturi nema dovoljno informacija o profilaksi reakcije odbacivanja kornealnog alokalema u visoko-rizičnoj populaciji pacijenata. Mi smo u ovom radu iskoristili prednosti eksperimentalne keratoplastike u visoko-rizičnoj kombinaciji miševa. Genetski dobro okarakterisani inbred miševi, kao što su C57BL/6 i BALB/C, veoma su pogodni za ispitivanje terapijskih protokola, obzirom da imaju visoku stopu odbacivanja kornealnog kalema (100%).

U ovom radu postavili smo sledeće ciljeve:

- 1) Da se ispita efekat sistemske primene malih doza rapamicina u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa malom dozom ciklosporina A na opstanak kalema nakon eksperimentalne keratoplastike na miševina, kao i da se analiziraju potencijalni mehanizmi odgovorni za prolongaciju opstanka alokalema;
- 2) Da se ispita efekat intravenske aplikacije prirodnih, sveže izolovanih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija na opstanak kornealnog kalema kod naivnog primaoca, na modelu visoko-rizične eksperimentalne keratoplastike;  
Da se na istom modelu ispita *in vivo* efekat sistemske primene malih doza Rapa i CsA na terapijsku efikasnost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija nakon adoptivnog transfera naivnom primaocu;
- 3) Da se ispita da li *in vitro* ekspanzirane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelije, dobijene u mešanoj limfocitnoj kulturi u prisustvu anti-CD4 mAb koja ne vrše depleciju (*non-depleting*), zadržavaju svoj regulatorni potencijal *in vivo* nakon adoptivnog transfera, odnosno da li mogu da utiču na prolongaciju opstanka kornealnog kalema u eksperimentalnoj keratoplastici?

Da se ispita da li injekcija manjeg broja *in vitro* ekspandiranih antigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija u kombinaciji sa kratkotrajnom aplikacijom rapamicina može da odloži akutnu reakciju odbacivanja kornealnog kalema?

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1 LABORATORIJSKE ŽIVOTINJE**

U svim eksperimentima korišćeni su inbred BALB/c (H-2<sup>d</sup>) i C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) miševi muškog pola, starosti od 6 do 9 nedelja iz Charles River uzgajališta u Berlinu. C57BL/6 miševi služili su kao primaoci BALB/c kornealnog alografta. Ovi sojevi imaju potpuno nepodudaran glavni histokompatibilni kompleks kao i brojne minorne histokompatibilne antigene. Eksperimentalnim životinjama obezbeđena je standardna laboratorijska dijeta i i česmenska voda *ad libitum*. Prosečna težina eksperimentalnih životinja iznosila je 20-30g. Sve životinje tretirane su u skladu sa sledećim protokolima za upotrebu životinja u istraživanjima: National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' i German Guidelines on the use of animals in research (Berliner Senatsverwaltung).

#### **3.2 TRANSPLANTACIJA ROŽNJAČE NA MIŠEVIMA**

Ortotopska transplantacija rožnjače rađena je modifikacijom metode koju je ranije opisao Zhang [178]. Pre hirurške procedure miševi su duboko anestetizirani intraperitonealnom (i.p.) injekcijom ketamina, 3mg (Ketavet, Pharmacia GmbH, Germany) i 0.0075 mg ksilazina (Rompun 2 %, Bayer Vital GmbH, Germany). Za dilataciju zenice oka primaoca topikalno su aplikovane kapi fenilefrina u deseto-minutnim intervalima. Midrijaza je primenjena kako bi se izbeglo hirurško oštećenje dužice i stvaranje prednjih sinehija u veoma plitkoj prednjoj komori. BALB/c miševi korišćeni su kao donori, a C57BL/6 kao primaoci. Centralna 2.5mm rožnjače donora ekscidirana su primenom modifikovane "podvodne tehnike" koju je opisao Zhang [178].

##### **3.2.1 „Podvodna tehnika“ za pripremu donorskog kornealnog kalema**

Donorske životinje žrtvovane su u kutiji sa CO<sub>2</sub> tokom 3-5 minuta, koliko je bilo potrebno za bezbolnu smrt. U međuvremenu, parče stiropora (iz paketa za šavni material) 6x6 mm, fiksira se za dno Petrijeve šolje, koja se potom ispuni fiziološkim puferovanim rastvorom (PBS). Očna jabučica sa manjom količinom

periorbitalnog tkiva fiksirana je anatomskom zakrivljenom pincetom. Centralna rožnjača obeležena je trepanom prečnika 2.5 mm, bez otvaranja prednje očne komore. Nakon toga, oko je enukleisano i fiksirano na dnu Petrijeve šolje pomoću četiri suture (10.0 Ethicon). Prednja očna komora otvorena je špatulastom iglom (10.0 Ethicon). Donorska rožnjača u celini je ekscidirana kornealnim makazama duž prethodno obeležene granice i do transplantacije čuvana u hladnom PBS-u. Primenom „podvodne tehnike“ donorski bulbus je tokom cele procedure potopljen u PBS-u, tako da otvoreno oko ne gubi oblik i ne dolazi do savijanja donorskog kalem pri isecanju grafta kornealnim makazama.

### **3.2.2 Priprema ležišta za kalem kod primaoca**

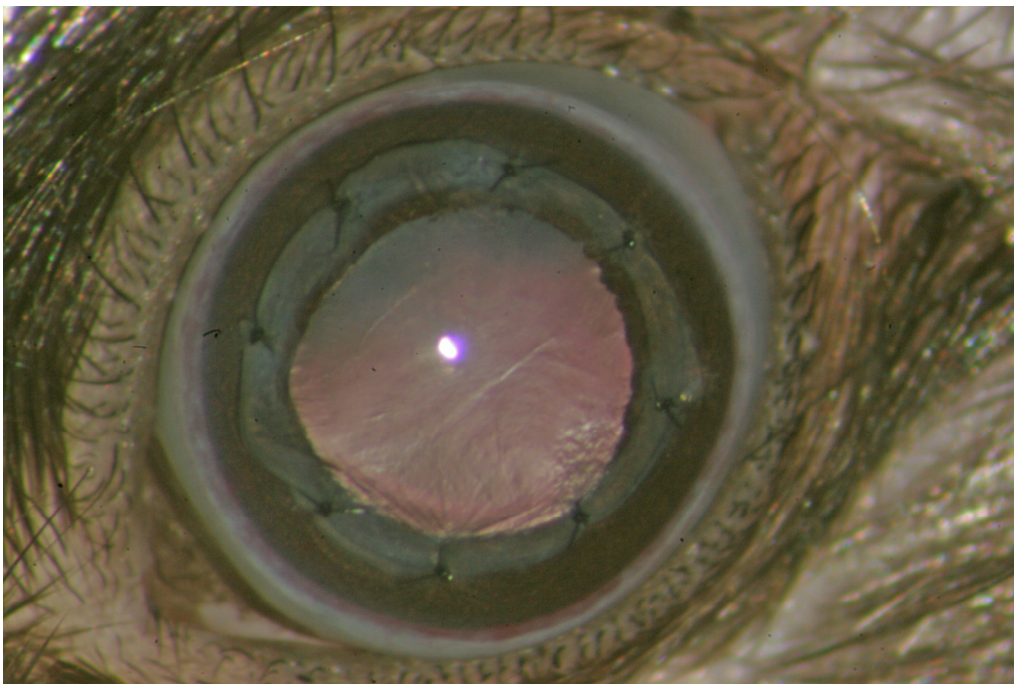
Glava životinje primaoca postavi se i fiksira na čvrstoj podlozi. Pomoću zakrivljene anatomske pincete fiksira se desno oko i pod kontrolom mikroskopa trepanom od 2.0 mm obeleži granica ležišta budućeg kalema na oku primaoca. Prednja komora se otvara pomoću igle od 30G i ispuni veoma malom količinom viskoleastika (Healon 5). Rožnjača se podeli na dve polovine koje se potom iseku Castroviejo makazama duž prethodno obeležene granice ležišta.

Pomoću malog parčeta transparentne folije (iz paketa za šavni material) donorska rožnjača se izvadi iz PBS rastvora (u Petrijevoj šolji) i postavi u pripremljeno ležište primaoca. Transplantat se fiksira pomoću 8 pojedinačnih sutura, 11-0 monofilament (Ethicon, Germany). Viskoelastik je odstranjen na kraju operacije. Prednja očna komora je formirana fiziološkim rastvorom i malom bulom vazduha. Na kraju operacije na površinu rožnjače aplikovana je antibiotska mast (Ofloxacin, Floxal™, Mann Pharma, Germany), a kapci ušiveni pomoću dve pojedinačne suture 8.0 (Ethicon, Germany) da bi se zaštitio transplantat. Kapci se otvaraju 48h nakon operacije. Kornealne suture se ne odstranjuju.

Sve operacije obavio je isti hirurg konvencionalnim oftalmološkim mikrohirurškim instrumentima pod operacionim mikroskopom (Slika1 i 2).



**Slika 1.** Mikrohkirurški instrumenti i šavni materijal za keratoplastiku na miševima



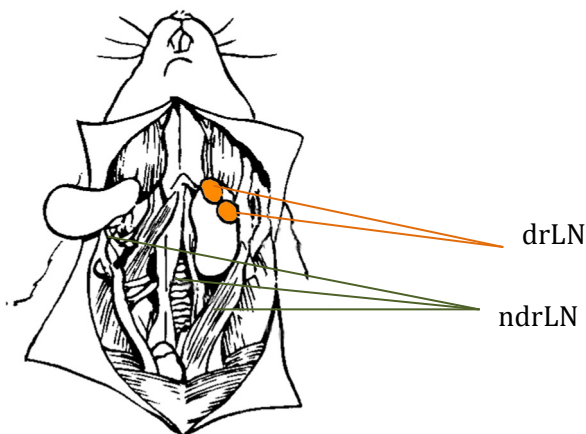
**Slika 2.** Klinički izgled alokalema nakon perforativne keratoplastike

### **3.3 UZIMANJE LIMFOIDNIH ORGANA ZA PRIPREMU LIMFOCITNE SUSPENZIJE**

Naivne životinje žrtvovane su u kutiji sa CO<sub>2</sub> do postizanja bezbolne smrti. Nakon dezinfekcije kože 70% alkoholom, napravljena je incizija na ventralnoj strani miša, a retrahovana koža fiksirana za odgovarajuću podlogu. Izvađeni su



sledeći limfni čvorovi: mandibularni, cervikalni, aksijalni, ingvinalni i mezenterični i slezina. Limfoidni organi stavljeni su u hladan PBS.



**Slika 3.** Raspored drenirajućih (drLN) i nedrenirajućih limfnih čvorova (ndrLN)

### 3.4 IZOLACIJA PRIRODNIH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ĆELIJA OD C57BL/6 MIŠEVA

Pojedinačna ćelijska suspenzija od slezine i limfnih čvorova dobijena je gnječenjem i potiskivanjem organa kroz odgovarajuće ćelijsko sito od 100µm. Nakon centrifugiranja 10 minuta sa 1200rpm (280xg), pelet ćelija iz limfnih čvorova resuspendovana je u 20ml PBS / 2% FCS i propuštena kroz ćelijsko sito od 40 µl. Iz resuspendovana peleti splenocita eritrociti su odstranjeni hipotonom lizom pomoću destilovane vode u trajanju do 30 sekundi. Nakon zaustavljanja lize eritrocita dodavanjem PBS / 2% FCS, suspenzija je propuštena kroz odgovarajuće ćelijsko sito (40 µl) i centrifugirana 10 minuta sa 1200rpm (280xg). Obe suspenzije (limfni čvorovi i slezina) pomešane su i podvrgnute magnetnoj separaciji prema uputstvima proizvođača. Čistoća ćelijske suspenzije kontrolisana je FACS bojenjem.

Za izolaciju prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija korišćen je odgovarajući kit (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit, # 130-091-041, Miltenyi Biotec). Izolacija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih ćelija podrazumeva dvostepenu proceduru tj. negativnu, a zatim pozitivnu selekciju prema navedenom MACS protokolu. Izolacija CD4<sup>+</sup> ćelija postiže se negativnom selekcijom. Neželjene ćelije su indirektno magnetisane koktelom biotin-konjungovanih antitela i anti-biotin mikroperlama (Miltenyi Biotec-MACS). Pozitivno selektirana frakcija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih T ćelija dobija se primenom CD25-PE antitela i anti-PE

mikroperli (Miltenyi Biotec-MACS). Nakon brojanja ćelija, procenat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih ćelija u svakoj frakciji evaluiran je protočnom citometrijom i iznosio je >85%. Procenat Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u prirodnom CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelijama iznosio je do 70%. Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u PBS-u do 5x10<sup>5</sup> ćelija /300μl za intravensku (i.v.) injekciju.

### **3.5 IZOLACIJA CD4<sup>+</sup> ĆELIJA OD C57BL/6 MIŠEVA**

CD4<sup>+</sup> ćelije izolovane su iz ćelijske suspenzije slezine i limfnih čvorova C57BL/6 miševa negativnom selekcijom, kao što je već opisano (MACS CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit, Miltenyi Biotec). Čistoća CD4<sup>+</sup> ćelije evaluirana je protočnom citometrijom pomoću FACS Calibur-a (Becton Dickinson, San Jose, California, U.S.A.) i iznosila je >95%. Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u medijumu obogaćenom sa 0,05mM β-merkaptetanola do koncentracije od 3x10<sup>6</sup> ili 4x10<sup>6</sup> ćelija/ml.

### **3.6 IZOLACIJA B ĆELIJA OD BALB/C MIŠEVA**

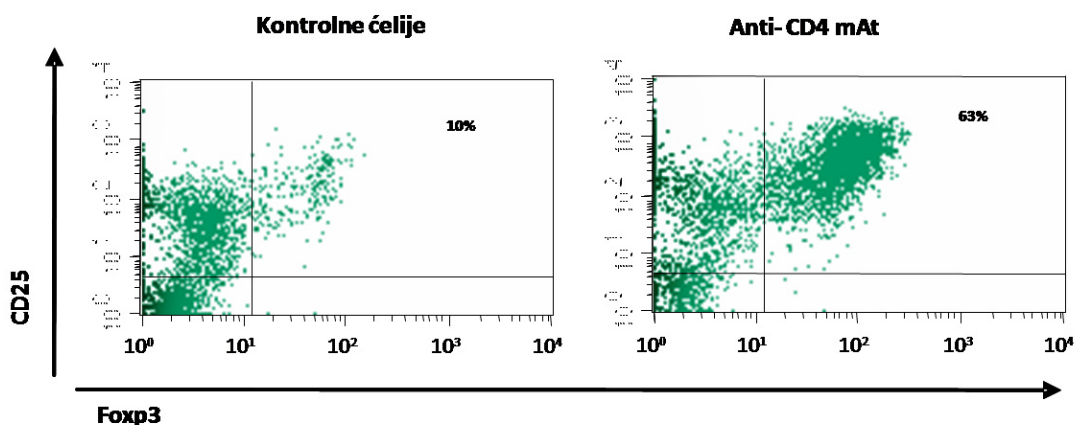
B ćelije izolovane su iz ćelijske suspenzije slezine negativnom selekcijom pomoću koktela biotin-konjungovanih antitela i anti-biotin mikroperli (Miltenyi Biotec-MACS) prema odgovarajućim uputstvima (B cell isolation kit, Miltenyi Biotec). Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u medijumu obogaćenom sa 0,05mM β-merkaptetanola do koncentracije od 3x10<sup>6</sup> ćelija /ml.

### **3.7 MEŠANA LIMFOCITNA KULTURA ĆELIJA (MLC)**

- a) Prečišćene CD4<sup>+</sup> ćelije koje potiču od C57BL/6 miševa, dobijene na gore opisan način, kultivisane su u koncentraciji od 3x10<sup>6</sup> ćelija po bunarčiću u prisustvu 5 μg/ml anti-CD4 monoklonskih antitela (klon YTS 177.9) zajedno sa 3x10<sup>6</sup> B ćelija od BALB/c miševa. Ovu kulturu ćelija označili smo kao MLC<sup>pres</sup> (prisutna anti-CD4 monoklonskih antitela).
- b) 1 ml prečišćene CD4<sup>+</sup> ćelijske suspenzije od C57BL/6 miševa, koja sadrži 3x10<sup>6</sup> ćelija/ml kultivisana je sa 3x10<sup>6</sup> B ćelija od BALB/c miševa bez prisustva anti-CD4 monoklonskih antitela. Na ovaj način dobijena je kontrolna kultura ćelija koju smo označili kao MLC<sup>abs</sup> (odsutna anti-CD4 monoklonskih antitela).

Ćelije su kultivisane jednu nedelju u inkubatoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), a potom korišćene za infuziju recipijentnim miševima. Čistoća ćelijske suspenzije kontrolisana je FACS bojenjem.

Antigen specifične Treg ćelije (MLC<sup>pres</sup>), 1x10<sup>5</sup> ili 5x10<sup>5</sup> u zapremini od 250 µl PBS-a, davane su u repnu venu recipijentnog miša jedan dan pre planirane transplantacije rožnjače. MLC<sup>abs</sup> ćelije primenjene su na isti način i služile su kao kontrolne ćelije. Procenat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u antigen specifičnim Treg ćelijama (MLC<sup>pres</sup>) kao i u kontrolnoj kulturi ćelija (MLC<sup>pres</sup>) određen je protočnom citometrijom. Približno 63% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija dobijenih u kulturisa sa anti-CD4 monoklonskim antitelima bilo je Foxp3<sup>+</sup> (MLC<sup>pres</sup>), suprotno kontrolnoj kulturi bez anti-CD4 mAt (MLC<sup>abs</sup>) u kojoj je procenat Foxp3<sup>+</sup> ćelija bio značajno niži i iznosio samo 10% (Slika 4).



**Slika 4.** Procenat CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u MLC sa ani-CD4 mAt i u kontrolnoj kulturi ćelija bez ani-CD4 mAt

### 3.8 TERAPIJSKI PROTOKOL

Ortotopska transplantacija rožnjače za procenu opstanka kalema urađena je kod 98 životinja. Sve operisane životinje podeljene su u sledeće grupe: a) kontrolne životinje bez postoperativne terapije; b) životinje tretirane sistemskom imunosupresivnom terapijom; c) životinje tretirane sveže izolovanim prirodnim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornim limfocitima i d) životinje tretirane *ex vivo* ekspaniranim antigen specifičnim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornim limfocitima.

## **A Kontrolne životinje bez postoperativne terapije**

- 1. grupa:** singena keratoplastika (BALB/c→BALB/c, C57BL/6→ C57BL/6)
- 2. grupa:** 10 C57BL/6 miševa dobija alogeni kornealni kalem od BALB/c miševa (BALB/c→ C57BL/6)
- 3. grupa:** 10 C57BL/6 miševa dobija alogeni kornealni kalem od BALB/c miševa, a potom i.p. injekcije PBS-a, na dan operacije i narednih 14 dana.

Singena keratoplastika urađena je kod 10 životinja u cilju kontrole hirurške tehnike. Alogena keratoplastika predstavlja kontrolnu grupu. Obzirom da su imunosupresivni lekovi rastvoreni u PBS-u i aplikovani tokom 15 dana, drugu kontrolnu grupu predstavljaju C57BL/6 životinje koje su na dan operacije i narednih 14 dana postoperativno dobile 0.25 ml PBS-a intraperitonealno.

## **B Životinje postoperativno tretirane sistemskom imunosupresivnom terapijom**

Imunosupresivni lekovi, CsA (Sandimmun, Novartis) i Rapa (Rapamune, Wyeth) rastvoreni su u PBS-u (CsA 3mg/kgTT i Rapa 0.5mg/kgTT). Pojedinačne doze (0.25ml) aplikovane su i.p. jednom dnevno, pomoću igle od 27 ½ G, na dan operacije i narednih 14 dana postoperativno.

- 4. grupa:** 10 C57BL/6 miševa dobija alogeni kornealni kalem od BALB/c miševa, a potom i.p. injekcije CsA (CsA 3mg/kgTT )
- 5. grupa:** 10 C57BL/6 miševa dobija alogeni kornealni kalem od BALB/c miševa, a potom i.p. injekcije Rapa (Rapa 0.5mg/kgTT)
- 6. grupa:** 10 C57BL/6 miševa dobija alogeni kornealni kalem od BALB/c miševa, a potom i.p. injekcije kombinacije CsA (3mg/kgTT) i Rapa (0.5mg/kgTT)

## **C Životinje koje su jedan dan pre keratoplastike tretirane prirodnim sveže izolovanim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg limfocitima**

Jedan dan pre planirane keratoplastike (BALB/c→ C57BL/6), naivni recipijent (C57BL/6) dobija i.v. injekciju regulatornih T ćelija resuspendovanih u PBS-u (0.25ml). Injekcije se daju u lateralnu repnu venu iglom od 27 ½ G.

Intraperitonealne injekcije CsA (3mg/kgTT) ili Rapa (0.5mg/kgTT) aplikovane su jednom dnevno na dan operacije i narednih 14 dana postoperativno.

- 7. grupa:** 8 C57BL/6 miševa dobija  $5 \times 10^5$  prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija i.v., jedan dan pre alogenog kornealnog kalema od BALB/c miševa
- 8. grupa:** 8 C57BL/6 miševa dobija  $5 \times 10^5$  prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija i.v., jedan dan pre alogenog kornealnog kalema od BALB/c miševa, a potom CsA 3mg/kgTT i.p.
- 9. grupa:** 9 C57BL/6 miševa dobija  $5 \times 10^5$  prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija i.v., jedan dan pre alogenog kornealnog kalema od BALB/c miševa, a potom Rapa 0.5mg/kgTT i.p.

**D Životinje koje su jedan dan pre keratoplastike tretirane *ex vivo* ekspaniranim aloantigen specifičnim CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg limfocitima**

- 10. grupa:** Naivni C57BL/6 miševi dobijaju  $5 \times 10^5$  aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija (MLC<sup>pres</sup>) i.v. jedan dan pre alogenog kornealnog kalema od BALB/c miševa
- 11. grupa:** Naivni C57BL/6 miševi dobijaju  $1 \times 10^5$  aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija (MLC<sup>pres</sup>) i.v. jedan dan pre alogenog kornealnog kalema od BALB/c miševa
- 12. grupa:** Naivni C57BL/6 miševi dobijaju  $1 \times 10^5$  aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija (MLC<sup>pres</sup>) i.v. jedan dan pre alogenog kornealnog kalema od BALB/c miševa, a potom Rapa 0.5mg/kgTT i.p.
- 13. grupa:** Naivni C57BL/6 miševi dobijaju  $5 \times 10^5$  kontrolnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija (MLC<sup>abs</sup>) i.v. jedan dan pre alogenog kornealnog kalema od BALB/c miševa.

### 3.9 EVALUACIJA TRANSPLANTATA NAKON KERATOPLASTIKE

Nakon keratoplastike, operisano oko se pregleda pod operacionim mikroskopom svaki drugi dan tokom prve 4 nedelje, a potom jednom nedeljno do isteka 100 dana. Evaluacija transplantata obuhvata procenu stepena zamućenosti kalema.

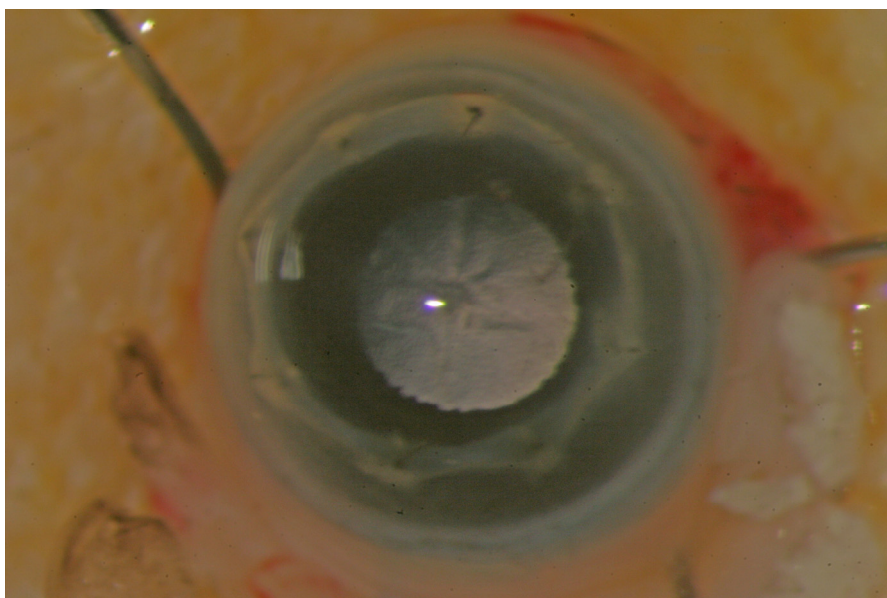
**Kornealno zamućenje** gradirano je na sledeći način [23]:

0, potpuno transparentna rožnjača; 1+, minimalno, površno zamućenje rožnjače sa jasno vidljivom zenicom i strukturom dužice; 2+, minimalno, duboko stromalno zamućenje, zenica i struktura dužice se još uvek vide; 3+, umereno stromalno zamućenje rožnjače, vidi se samo zenica; 4+, intenzivno stromalno zamućenje, nazire se samo prednja komora; 5+ maksimalno stromalno zamućenje, ne vidi se prednja komora. Rožnjače sa dva sukcesiva zamućenja gradirana kao 3+ smatraju se za odbačene transplantate. Transplantati sa tehničkim komplikacijama kao što su intraokularno krvarenje, katarakta i infekcije isključeni su iz eksperimenta.

### 3.10 EKSPERIMENTALNI DIZAJN

U cilju dalje evaluacije mehanizama koji su eventualno doprineli prolongaciji opstanka kornealnog grafta, naknadno je urađena transplantacija rožnjače kod još 52 životinje (BALB/c→C57BL/6). Primaoci su grupisani i tretirane na isti način kao već gore navedene grupe za procenu vremena opstanka kalema (vidi terapijski protokol). Svaka analizirana grupa imala je 3 do 5 C57BL/6 recipijentnih miševa koji su tretirani na već opisan način, prema protokolu za grupe obeležene rednim brojevima od 3 do 13. Desetog postoperativnog dana primaoci su žrtvovani, a njihovi kornealni graftovi, drenirajući (drLN) i nedrenirajući submandibularni limfni čvorovi (ndrLN) i slezina podvrgnuti su daljim analizama. Kornealni kalem uključujući i spoj kalema sa ležištem primaoca dobijeni su već opisanom „podvodnom tehnikom“ pomoću trepana prečnika 2.5mm. Graftovi su odmah smrznuti u tečnom azotu, a kasnije analizirani. Jednoćelijska suspenzija splenocita, pripremljena na već opisan način, čuvana je na -80 °C i kasnije analizirana.

- A. Prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> limfocita u sekundarnim limfnim organima (drLN, ndrLN, slezina) određena je protočnom citometrijom odmah nakon uzimanja navedenih organa.
- B. Aloantigen specifične IFN- $\gamma$  produkujuće T ćelije u slezini analizirane su pomoću IFN- $\gamma$  ELISPOT-a.
- C. Pomoću kvantitativnog RT-PCR-a analizirana je iRNK ekspresija sledećih gena u kornealnim kalemovima: CD3, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, Foxp3 i HPRT, i u splenocitima: MHCII i DC-LAMP.
- D. U cilju histopatološke analize kornealnog kalema, naknadno je urađena transplantacija rožnjače kod još 9 životinja (BALB/c  $\rightarrow$  C57BL/6). Primaoci su grupisani i tretirani na sledeći način: PBS, Rapa i CsA+Rapa, sa po tri životinje u svakoj grupi.



**Slika 5.** E nukleisano oko 10. postoperativnog dana

### **3.10.1 Protočna citometrija**

Ćelijske suspenzije od drenirajućih, nedrenirajućih limfnih čvorova i slezine posebno su pripremljene na već opisan način. Za bojenje površnih ćelijskih antigena CD4 i CD25, ćelijska suspenzija je nakon ispiranja inkubirana sa sledećim antitelima: CD4-PerCP klon L3T4, CD25-APC klon PC61 (oba BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) tokom 20 minuta na 4°C. Intraćelijsko bojenje FoxP3 urađeno je

prema uputstvima proizvođača (Foxp3-PE klon FJK-16s, eBiosciences, San Diego, CA, USA). Ukratko, nakon ispiranja, ćelijske suspenzije su inkubirane u fiksaciono/permeabilacionom rastvoru (20 minuta, 4°C, u marku), a potom, posle duplog ispiranja u permeabilacionom rastvoru inkubirane su sa fluorohrom konjugovanim anti-FoxP3 antitelima, 30 minuta na 4°C. Ćelije su analizirane pomoću FACS Calibur protočnog citometra (Becton Dickinson, San Jose, California, U.S.A.) koji sadrži 488 nm argon laser. Dobijeni podaci analizirani su pomoću CellQuest softverskog paketa (Becton-Dickinson).

### **3.10.2 IFN- $\gamma$ ELISPOT**

Splenociti C57BL/6 primaoca, dobijeni na već opisan način, služili su kao efektorske ćelije, a CD19<sup>+</sup> B ćelije od naivnih BALB/c miševa dobijene pomoću B ćelijskog selekcionog kita (StemCell, Vancouver, BC, Canada) korišćene su kao stimulatorske ćelije. Obe ćelijske populacije zajedno su kultivisane u jednakim koncentracijama u kompletnom RPMI medijumu, 24h na temperaturi od 37°C u PVDF pločama sa 96-bunarčića (Millipore, Billerica, MA, USA). PMA/jonomicin stimulisane efektorske ćelije služile su kao pozitivna kontrolna, a sam medijum bez antigena kao negativna kontrola. Odgovarajuća IFN- $\gamma$  monoklonska antitela primenjena su prema uputstvima proizvođača za Mouse IFN $\gamma$  ELISPOT Ready-Set-Go kit (eBioscience, San Diego, CA, USA). Ukratko, ELISPOT posude sa 96-bunarčića prvo su obložene sa 100 $\mu$ l/bunarčiću rastvorom primarnih antitela i inkubirane tokom noći na 4°C. Nakon, blokade i ispiranja u PBS-u i ELISPOT oblažućem puferu (eBioscience, San Diego, CA, USA) ćelije su kultivisane kao što je već opisano. Nakon inkubacije, ispiranja u PBS-u i PBS Tween-u, dodato je 100 $\mu$ l/bunarčiću rastvora biotinizovanih detekcionih antitela za IFN- $\gamma$ , tokom noći na 4°C. Narednog dana, nakon ispiranja, sveže pripremljen 3-amino-9-etil karbazol rastvor, 100 $\mu$ l/bunarčiću korišćen je kao substrat za razvoj spotova na sobnoj temperaturi u trajanju od 10-60 minuta. Ukupan broj spotova izračunat je primenom ImmunoSpot Analyzer-a (Cellular Technology Ltd., Shaker Heights, OH).



### **3.10.3 Kvantitativni RT-PCR**

Ekscidirani kornealni kalem, dijametra 2.5mm zamrznut je u tečnom azotu i čuvan na -80°C. Za analizu intrakornealne i splenocitne genske ekspresije, ukupna ćelijska RNK izolovana je pomoću sledećeg kita: Strataprep-Total-RNA-Miniprep-Kit™ (Stratagene, Heidelberg, Germany). RNK je reverzno transkribovana u komplemetarnu DNA primenom sledećeg kita: QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany). Pomoću QuantiTect Reverse Transcription Kit-a (Qiagen, Germany) analizirana je iRNK ekspresija sledećih gena u kalemu: CD3, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 i Foxp3 HPRT, a u splenocitima: MHCII i DC-LAMP, sa odgovarajućim qPCR prajmerima (tabela 2, Eurogentec, Belgium). Broj ciklusa na kom fluerescencija dostiže prag ( $C_T$  vrednost) korišćen je za kvantitativno merenje. Vrednosti su date kao  $2^{-\Delta C_T}$ . Nivo ekspresije analiziranih gena dat je u odnosu na konstitutivno eksprimiran gen (HPRT).

### **3.10.4 Histopatologija**

Kornealni alokalemovi uključujući i ležište primaoca, dobijeni su „podvodnom tehnikom“. Transplantati su fiksirani u 4% formalinu i kalupljeni u parafinu. Preseci debljine 5 $\mu$ m bojeni su hematoksilin-eozinom i analizirani svetlosnim mikroskopom.

## **3.11 STATISTIKA**

Podaci su analizirani pomoću SPSS 16.0 programa. Opstanak kalemaprikazan je primenom Kaplan-Meier-ove analize. Log-rank test korišćen je za poređenje vremena opstanka kalema. Značajnost razlika izračunavana je pomoću Man-Whitney i Kruskal-Wallis-ovog neparametrijskog statističkog testa. Statistički značajnom smatrana je p-vrednost  $\leq 0.05$ .

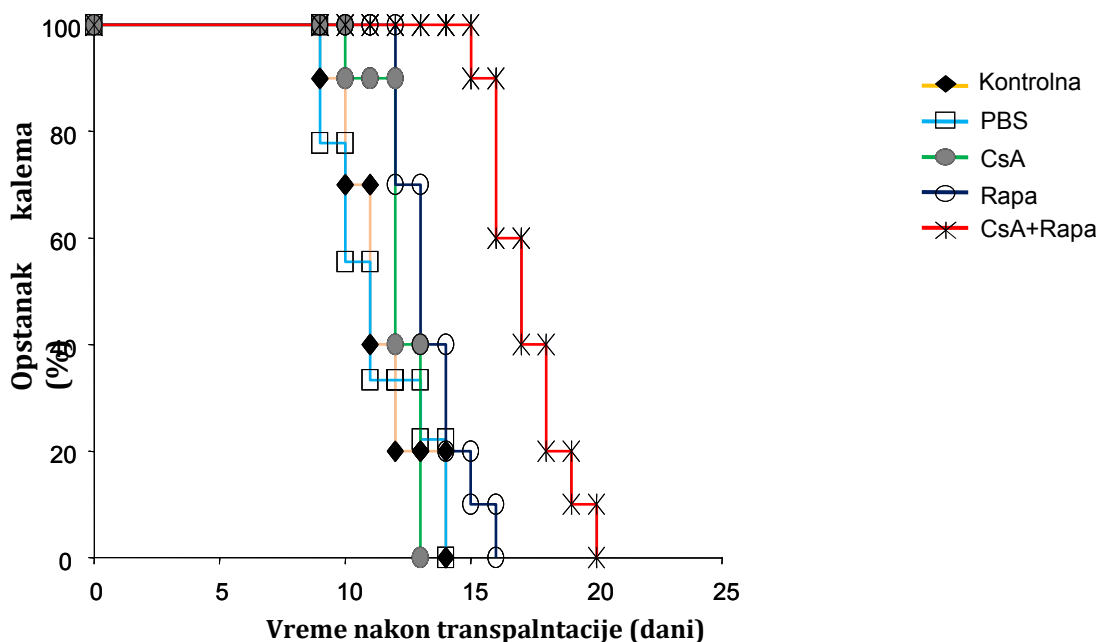
## 4. REZULTATI

### 4.1 EFEKAT SISTEMSKE IMUNOSUPRESIVNE TERAPIJE NA OPSTANAK KORNEALNOG ALOKALEMA

#### 4.1.1 Efekat sistemske primene malih doza rapamicina i ciklosporina A na opstanak kornealnog alokalema

Sistemska imunosupresivna terapija indikovana je kod pacijenata sa visokim rizikom za odbacivanje kalema nakon keratoplastike. Zbog toga je imunomodulatorni efekat rapamicina u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa ciklosporinom A ispitivan kod visoko rizične kombinacije miševa (BALB/c → C57BL/6) za odbacivanja kornealnog transplantata.

Singeni kalemovi kod C57BL/6 primaoca bili su transparentni tokom celog opservacionog perioda u trajanju od 100 dana. Transplantacija BALB/c kornealnih kalemova C57BL/6 primaocima imala je stopu odbacivanja 100% u obe kontrolne grupe, uključujući primoce koji nisu imali postoperativnu terapiju (srednje vreme opstanka (SVO) iznosilo je  $11.4 \pm 1.64$  dana ) kao i grupu primaoca koja je dobijala i.p. injekcije PBS-a (SVO=  $11.2 \pm 1.91$  dana). Nije bilo statistički značajne razlike u vremenu opstanka alotransplantata između navedenih kontrolnih grupa,  $p=0.72$  (Grafikon 1, Tabela 1).



**Grafikon 1.** Kaplan-Meier-ove krive opstanka kornealnog alokalema nakon primene različitih imunomodulatornih terapijskih protokola.

U poređenju sa kontrolnom grupom, kasnije odbacivanje kalema sa generalno nižim stepenom zamućenja konstatovano je u grupi koja je postoperativno tretirana samo rapamicinom, 0.5 mg/kg ( $13.4 \pm 1.34$  dana,  $p=0.027$ ). Mada monoterapija sa CsA u dozi od 3mg/kg nije značajno odložila odbacivanje kalema ( $SVO=12.2 \pm 0.91$  dana,  $p=0.49$ ), kombinacija malih doza Rapa i CsA značajno je produžila opstanak kornealnog alokalema ( $SVO=17.1 \pm 1.37$  dana,  $p=0.0001$ ) u ovoj visoko rizičnoj kombinaciji miševa. Takođe, kombinovana terapija bila je značajno superiornija u odnosu na Rapa monoterapiju ( $p=0.0001$ ). Sve tretirane životinje odbacile su kalemove zaključno sa devetnaestim danom nakon transplantacije, 5 dana posle isključenja sistemske terapije (*grafikon 1, tabela 1*).

**Tabela 1.** Vreme opstanka kornealnog kalema nakon alogene transplantacije rožnjače.

Grupa	Vreme opstanka (dani)	SVO $\pm$ SD
Kontrolna, bez terapije	9, 10, 10, 11, 11, 11, 12, 12, 14, 14	$11.4 \pm 1.64$
PBS	9, 9, 10, 10, 10, 11, 11, 13, 14, 14	$11.2 \pm 1.91$
CsA 3mg/kg	10, 12, 12, 12, 12, 12, 13, 13, 13, 13	$12.2 \pm 0.91$
Rapa 0.5mg/kg	12, 12, 12, 13, 13, 13, 14, 14, 15, 16	$13.4 \pm 1.34$
Rapa 0.5mg/kg + CsA 3mg/kg	15, 16, 16, 16, 17, 17, 18, 18, 19, 19	$17.1 \pm 1.37$

#### 4.1.2 Efekat imunosupresivne terapije na iRNK transkripciju u kalemu

Obzirom na činjenicu da je uvođenje CsA u kombinovanu terapiju doprinelo značajnom produženju opstanka alokalema u odnosu na Rapa monoterapiju, dalje smo ispitivali potencijalne mehanizme odgovorne za navedeni terapijski efekat. Prvo smo analizirali T ćelijsku infiltraciju i transkripciju citokina u kornealnom kalemu. Za tu svrhu, kornealni graftovi uključujući spoj kalema i rožnjače domaćina uzeti su 10. postoperativnog dana. Na toj vremenskoj distanci nakon keratoplastike, kod ove visoko rizične kombinacije miševa, reakcija odbacivanja kalema već je u toku u PBS kontrolnoj grupi (skor kornealnog zamućenja je 3 i 4), a

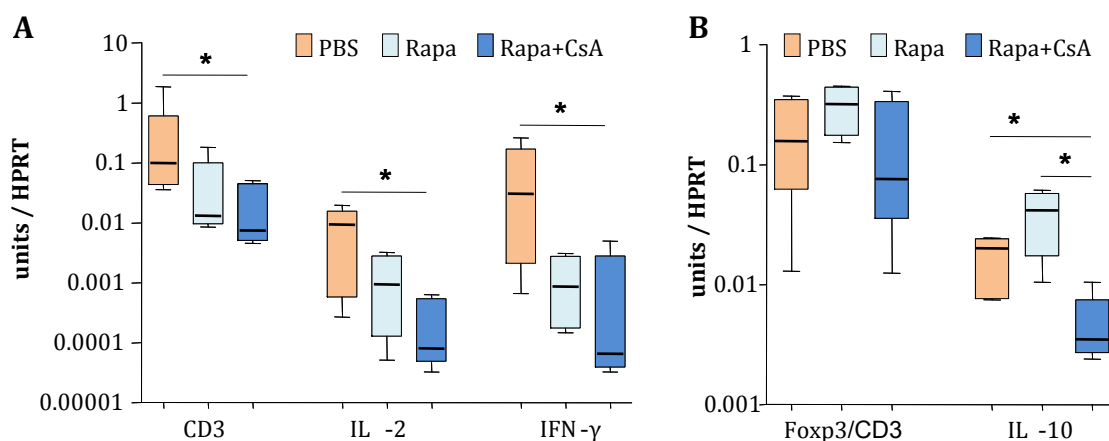
potpuno inhibirana u svim kalemovima primaoca tretiranih kombinovanom terapijom (Rapa+CsA, skor kornealnog zamućenja je 0). Kod životinja koje su dobijale samo rapamicin, 4 grafta od ukupno pet analiziranih nije bilo odbačeno, a ispoljili su sledeće skorove kornealnog zamućenja: 0,0,1 i 2.

**Tabela 2.** Klinički skor zamućenja kornealnog kalema 10. postoperativnog dana.

Grupa	Skor kornelnog zamućenja
PBS	3+, 3+, 4+, 4+, 4+
Rapa 0.5mg/kg	0, 0, 1+, 2+,3+
Rapa 0.5mg/kg + CsA 3mg/kg	0, 0, 0, 0,0

RT-PCR analiza kornealnih kalemova nakon desetodnevne primene rapamicina pokazala je redukovanu iRNK ekspresiju za CD3, IL-2 i IFN- $\gamma$ , ali bez statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 2A,  $p=0.055$ ,  $p=0.062$ ,  $p=0.050$ , po redu kako je navedeno). Međutim, kombinovana terapija sa CsA dovela je do značajne nishodne regulacije CD3 transkripcije, odnosno T ćelijske infiltracije u alograftu ( $p=0.028$ ). Takođe, nivo iRNK ekspresije proinflamatornih citokina kao što su IL-2 i IFN- $\gamma$  bio je značajno snižen ( $p=0.027$  i  $p=0.028$ ) (grafikon 2A). Mali porast ekspresije IL-10 kod Rapa monoterapije nije dostigao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0.086$ ), dok je kombinovana terapija statistički značajno suprimirala transkripciju IL-10 u kornealnom kalemu ( $p=0.027$ ) (grafikon 2B). U kornealnim uzorcima analizirana je i Foxp3 transkripcija. Mada je terapija rapamicinom proizvela mali porast Foxp3 transkripcije, a dodatak CsA suprimirao infiltraciju T ćelijama, ovaj efekat nije bio statistički značajan ( $p=0.221$ ).

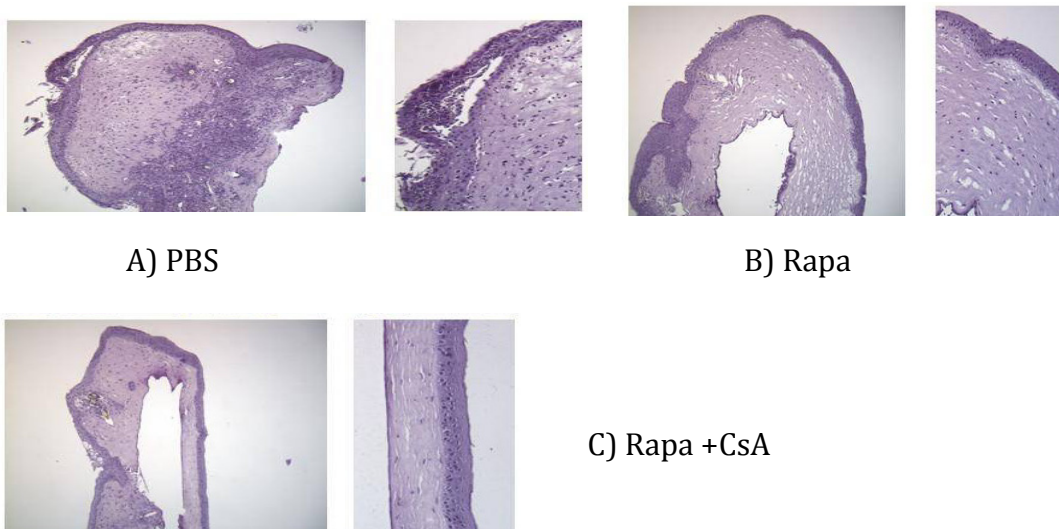
Navedeni rezultati pokazali su da kombinovana terapija malim dozama CsA i rapamicina efikasno modulira ranu iRNK ekspresiju inflamatornih i infiltracionih markera, što doprinosi prolongaciji opstanka alokalema. Ovo je takođe u korelaciji sa histološkom slikom kornealnih transplantata koji su uzeti destog dana nakon keratoplastike (grafikon 3).



**Grafikon. 2.** RT-PCR analiza iRNK ekspresionih profila u kornealnim alokalemovima za različite terapijske grupe (n=5, svaka grupa). Nivo ekspresije sledećih gena: CD3, IL-2, IFN- $\gamma$  (A), IL-10 i Foxp3 (B) analiziran je u odnosu na konstitutivno ekspimiran gen (HPRT) (log-skala). Kombinovana terapija Rapa+CsA značajno je redukovala nivo CD3 markera kao i analiziranih citokina (\*p<0.05).

#### 4.1.3 Histologija kornealnih kalemova

Histološka analiza kornealnih kalemova kod miševa koji su tretirani rapamicinom pokazala je diskretnu mononuklearnu ćejisku infiltraciju i stromalni edem (*grafikon 3*). Međutim, histopatološki preseki kornealnih alograftova kod miševa koji su dobijali kombinovanu terapiju imali su normalnu arhitekturu bez inflamatornih ćelija. Suprotno tome, opsežna mononuklearna ćejiska infiltracija i stromalni edem dominiraju u histološkoj slici odbačenih kornealnih graftova u PBS kontrolnoj grupi. Takođe, histološka slika transplantata i iRNK ekspresija infiltracionih i inflamatornih markera u graftu značajno korelira sa skorom kornealnog zamućenja.

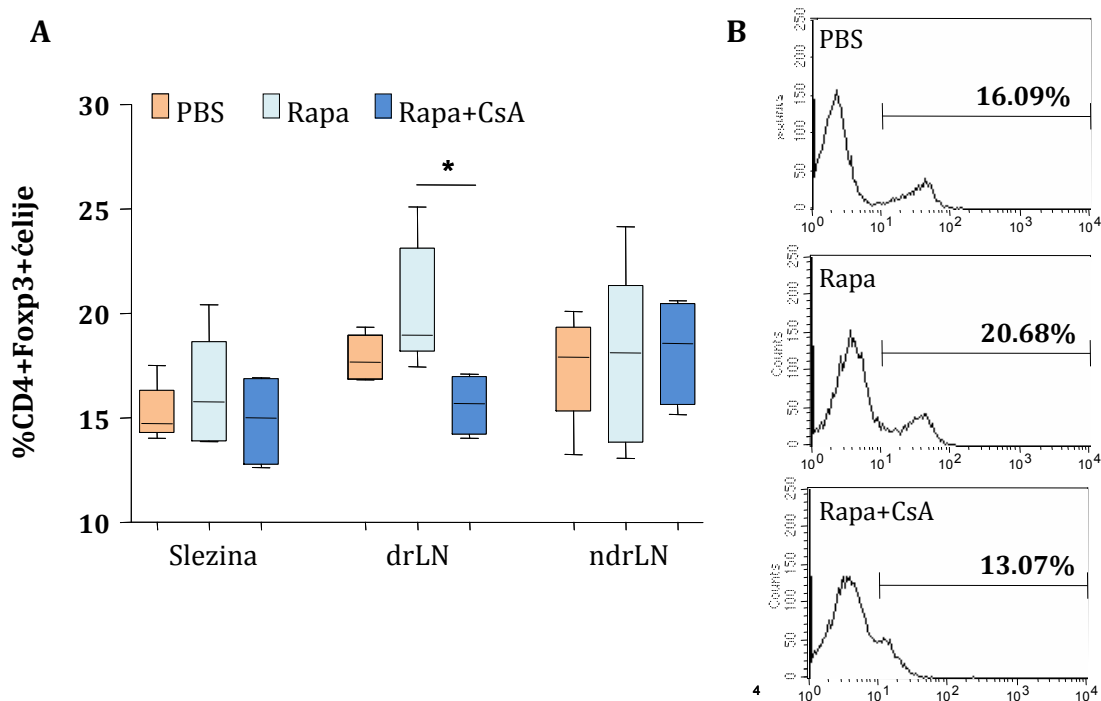


**Grafikon 3.** Histološki preseki kornealnih alokalemova koji su uzeti desetog dana nakon keratoplastike i obojeni hematoksilinom i eozinom. Edem i gusta infiltracija mononuklearnim ćelijama uočava se u kontrolnoj PBS grupi (A). Kornealni preseki iz Rapa grupe pokazuju značajno manji stepen edema i infiltracije (B). Kornealni preseki grafta koji potiču od primaoca tretiranih kombinovanom terapijom Rapa+CsA pokazuju normalnu debljinu rožnjače i odsustvo inflamatornih ćelija (C).

#### 4.1.4 Analiza akumulacije Treg ćelija u sekundarnim limfoidnim organima protočnom citometrijom

Da bi smo ispitali efekat rapamicina *in vivo* u prisustvu ili bez CsA na regulatorne T ćelije, merili smo prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> limfocita u sekundarnim limfoidnim organima. Desetog postoperativnog dana, submandibularni drenirajući limfni čvorovi, kao i nedrenirajući limfni čvorovi sa suprotne strane i slezina podvrgnuti su analizi protočnom citometrijom. Miševi koji su tretirani Rapa monoterapijom pokazali su tendenciju ka porastu prisustva CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drLN-ima ( $20.3 \pm 2.6 \%$ ) u poređenju sa PBS kontrolnom grupom ( $17.8 \pm 0.9\%$ ,  $p=0.055$ ) (*grafikon 4A, 4B*). Na suprot tome, dodatak CsA značajno je smanjio prisustvo regulatornih T ćelija ( $15.6 \pm 1.2\%$ ,  $p=0.012$ ). Međutim, navedene promene u broju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> limfocita nisu uočene u slezini i ndrLN-ima kod primaoca koji su tretirani Rapa monoterapijom ( $16.17 \pm 2.4\%$  u slezini i  $17.69 \pm 3.8 \%$  u ndrLN) ili kombinovanom terapijom sa

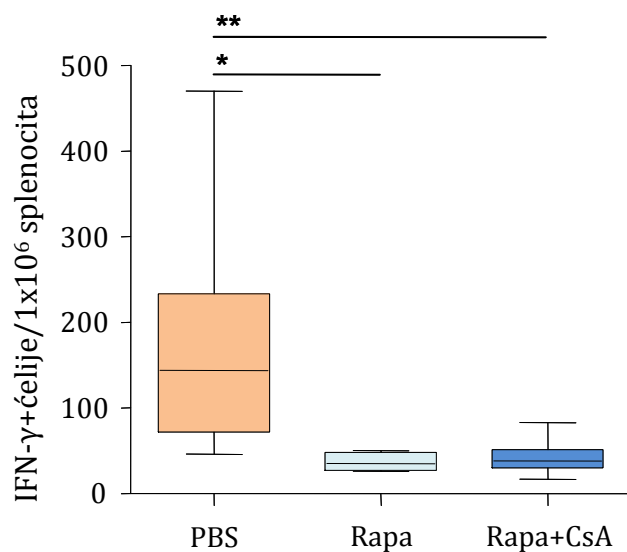
CsA ( $14.9 \pm 1.9\%$  u slezini i  $18.2 \pm 2.2\%$  u ndrLN) u poređenju sa PBS kontrolnom grupom ( $15.198 \pm 1.2\%$  u slezini i  $17.46 \pm 2.2\%$  u ndrLN) (*grafikon 4A*).



**Grafikon 4.** Analiza prisustva CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u različitim terapijskim grupama (PBS, Rapa, Rapa+CsA) pomoću protočne citometrije. Ćelijska suspenzija pripremljena je od slezine, drenirajućih i nedrenirajućih limfnih čvorova 10. dana nakon kornealne transplantacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=5, svaka grupa), \*p<0.05 (A). Reprezentativni rezultati koji pokazuju procenat CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u drLN koji potiču od PBS, Rapa i Rapa+CsA primaoca (B).

#### 4.1.5 Terapijski efekat na IFN- $\gamma$ produkujuće aloreaktivne T ćelije

Rapa monoterapija i kombinacija malih doza Rapa i CsA sprečili su razvoj aloantigen specifičnih IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija u slezini desetog dana nakon transplantacije (*grafikon 5*, p=0.0115 i p=0.0072). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike između Rapa monoterapije i kombinovane terapije (p>0.05) u prevenciji razvoja aloantigen specifičnih IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija.



**Grafikon 5.** Razvoj IFN- $\gamma$  produkujućih aloreaktivnih T ćelija utvrđen je pomoću Elispota. Rapa monoterapija kao i kombinovana terapija sa CsA signifikantno je sprečila razvoj aloantigen specifičnih IFN- $\gamma$  produkujućih T ćelija u slezini koja je uzeta 10 dana nakon keratoplastike (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD ( $n=5$ , svaka grupa).

## 4.2 EFEKAT IMUNOSUPRESIVNIH LEKOVA NA FUNKCIONALNI KAPACITET PRIRODNIH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ĆELIJA NAKOM ADOPTIVNOG TRANSFERA

### 4.2.1 Efekat adoptivnog transfera prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija na opstanak kornealnog alokalema

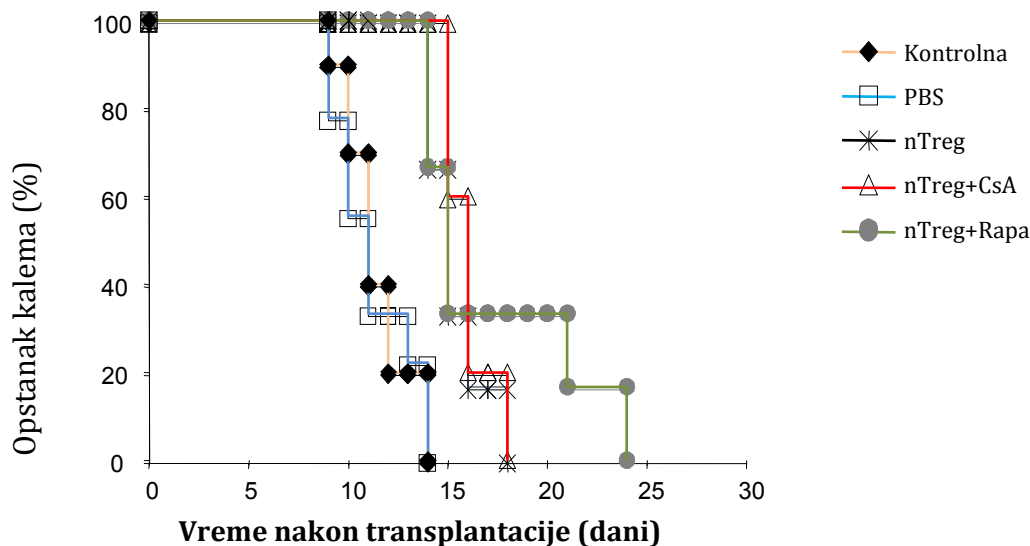
U poređenju sa kontrolnom grupom, jedna aplikacija  $5 \times 10^5$  prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatornih T ćelija C57BL/6 miševima, dan pre planirane transplantacije rožnjače, značajno je prolongirala opstanak kornealnog alokalema (SVO =  $15.8 \pm 1.64$  dana,  $p=0.0001$ ). Zanimljivo je da dodatak 3 mg/kg CsA (i.p.) tokom 14 dana nije dodatno prolongirao vreme opstanka kalema (SVO =  $15.5 \pm 1.19$  dana) u poređenju sa primaocima koji su tretirani samo jednom injekcijom prirodnih Treg ćelija ( $p=0.621$ ). Suprotno tome, dodatna terapija sa 0.5 mg/kg rapamicina bila je efikasnija i dovela do najdužeg opstanka kornealnog alografta (SVO =  $18.0 \pm 3.47$  dana) u ovoj visoko rizičnoj kombinaciji miševa (tabela 3). Grafikon 6 pokazuje da nije bilo statistički značajne razlike u opstanku kalema



između navedenih grupa (nTreg, nTreg + CsA, nTreg + Rapa), mada je uočena tendencija ka značajnijoj prolongaciji opstanka kalema kod primaoca koji su tretirani kombinacijom prirodnih Treg i rapamicina (nTreg+Rapa, p=0.09). Sve tretirane životinje odbacile su svoje graftove do 24. dana, tj. 10 dana nakon isključenja imunosupresivne terapije.

**Tabela 3.** Vreme opstanka kornealnog kalema nakon alogene keratoplastike

Grupa	Vreme preživljavanja (dani)	SVO ± SD
Kontrolna, bez terapije	9, 10, 10, 11, 11, 11, 12, 12, 14, 14	11.4 ± 1.64
Kontrolna, PBS	9, 9, 10, 10, 10, 11, 11, 13, 14, 14	11.2 ± 1.91
nTreg	14, 14, 15, 15, 16, 17, 18, 18	15.8 ± 1.64
nTreg+Rapa	14, 14, 15, 15, 18, 20, 21, 21, 24	18.0 ± 3.47
nTreg+CsA	14, 15, 15, 15, 15, 16, 16, 18	15.5 ± 1.19



**Grafikon 6.** Kaplan-Meier-ove krive opstanka kornealnog alokalema nakon primene različitih imunomodulatornih terapijskih protokola.

#### 4.2.2 Klinička analiza kornealnih kalemova desetog postoperativnog dana

Kornealni transplantati uključujući i spoj sa rožnjačom domaćina podvrgnuti su daljim analizama desetog postoperativnog dana. Suprotno PBS kontrolnoj grupi sa već tada klinički vidljivom reakcijom odbacivanja (skor zamućenja 3 i 4), kod svih primaoca koji su tretirani kombinacijom nTreg+Rapa reakcija odbacivanja kalema bila je potpuno inhibirana. Desetog postoperativnog dana u ovoj grupu 3/4 grafta bila su potpuno providna (skor zamućenja 0), a jedan je imao veoma blag edem sa skorom 1+. Interesantno je da su obe grupe primaoca, tretirane samo prirodnim Treg ćelijama ili kombinacijom sa CsA, pokazala skoro identičan skor kornealnog zamućenja desetog postoperativnog dana. Ovi transplantati ispoljili su blag edem kalema sa skorom zamućenja 1+ ili nižim kod 3/4 primaoca u grupi nTreg i 4/5 primaoca u nTreg+CsA (tabela 4).

**Tabela 4.** Klinički skor zamućenja kornealnog kalema 10. postoperativnog dana

Grupa	Skor kornealnog zamućenja
PBS	3+, 3+, 4+, 4+,4+
nTreg	0, 1+, 1+, 2+,
nTreg + CsA	0, 1+, 1+, 1+, 2+
nTreg + Rapa	0, 0, 0, 1+

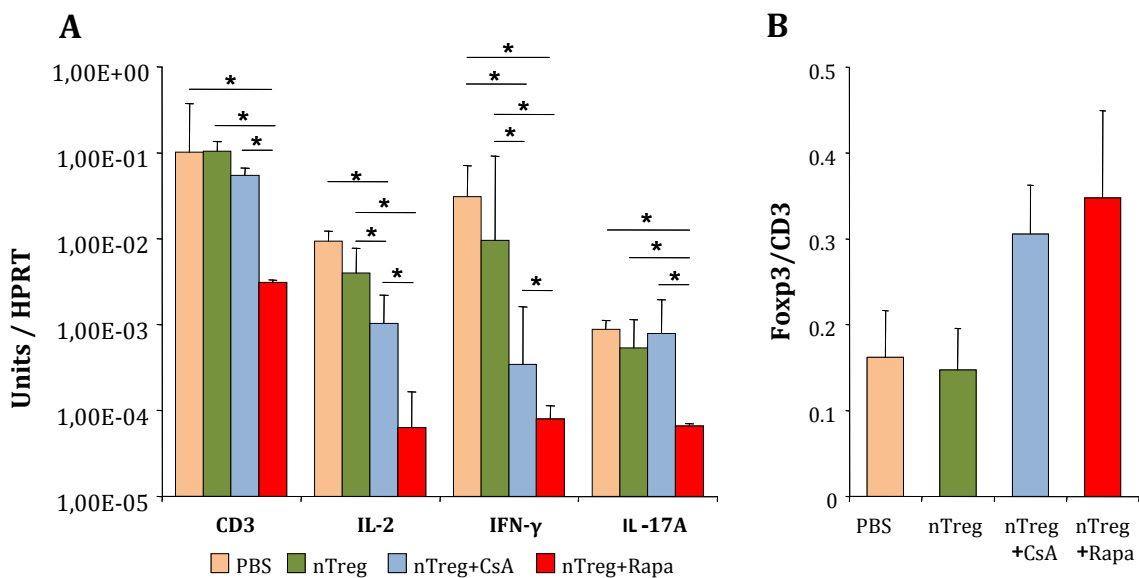
#### 4.2.3 Efekat transfera prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija i imunosupresivne terapije na iRNK transkripciju u kalemu

Aplikacija  $5 \times 10^5$  prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija produžila je opstanak kornealnog alokalema. U cilju dalje analize graft-protektivnih mehanizama regulatornih T ćelija, u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa imunosupresivnim lekovima, analizirali smo T ćelijsku infiltraciju grafta i transkripciju Th1 citokina primenom kvantitativnog RT-PCR-a. Desetog postoperativnog dana kornealni uzorci su pripremljeni na način kako je već opisano. RT-PCR analize pokazale su da

izolovan adoptivni transfer prirodnih Treg ćelija nema značajan efekat na sledeću iRNK ekspresiju u kalemu: CD3 ( $p=0.568$ ), IL-2 ( $p=0.935$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0.685$ ) i IL-17A ( $p=1.0$ ).

Zanimljivo je da je kombinovana terapija sa prirodnim Treg ćelijama i CsA pokazala sličnu transkripciju za CD3 ( $p=0.428$ ) i IL-2 ( $p=0.361$ ) i IL-17 ( $p=1.0$ ). Međutim, u poređenju sa injekcijom prirodnih Treg ćelija, dodatak CsA redukovao je transkripciju IL-2 ( $p=0.046$ ), dok je transkripcija IF- $\gamma$  značajno snižena u poređenju sa PBS kontrolnom grupom ( $p=0.018$ ), ali i grupom recipijenata koji su dobili samo prirodne Treg ćelije jedan dan pre keratoplastike ( $p=0.032$ ). Suprotno tome, transfer prirodnih Treg ćelija sa naknadnom primenom rapamicina tokom 14 dana pokazao je trend ka redukciji iRNK ekspresije IL -2 u graftu ( $p=0.053$ ), dok je CD3 ( $p=0.020$ ) i IFN- $\gamma$  ( $p=0.025$ ) značajno snižen u poređenju sa PBS kontrolnom grupom, ali i recipijentima tretiranim samo prirodnim Treg ćelijama (CD3:  $p=0.017$ , IL-2:  $p=0.017$  i IFN- $\gamma$ :  $p=0.017$ ). Takođe, dodatak rapamicina nakon transfera prirodnih Treg ćelija značajno je redukovao transkripciju IL-17A ( $p=0.040$ ). Transkripcija IL-10 citokina u graftu nije se značajno razlikovala između ispitivanih grupa (PBS, nTreg, nTreg + CsA, nTreg+ Rapa),  $p=0.896$  (*grafikon 7A*).

U kornealnim uzorcima takođe je analizirana i Foxp3 transkripcija. U poređenju sa PBS primaocima, transfer prirodnih Treg ćelija, samih ili u kombinaciji sa imunosupresivnim lekovima, nije imao značajan efekat na Foxp3 transkripciju u kornealnom kalemu desetog postoperativnog dana (nTreg:  $p=0.935$ , nTreg+CsA:  $p=0.144$ , nTreg+ Rapa:  $p=0.180$ ) (*grafikon 7B*).

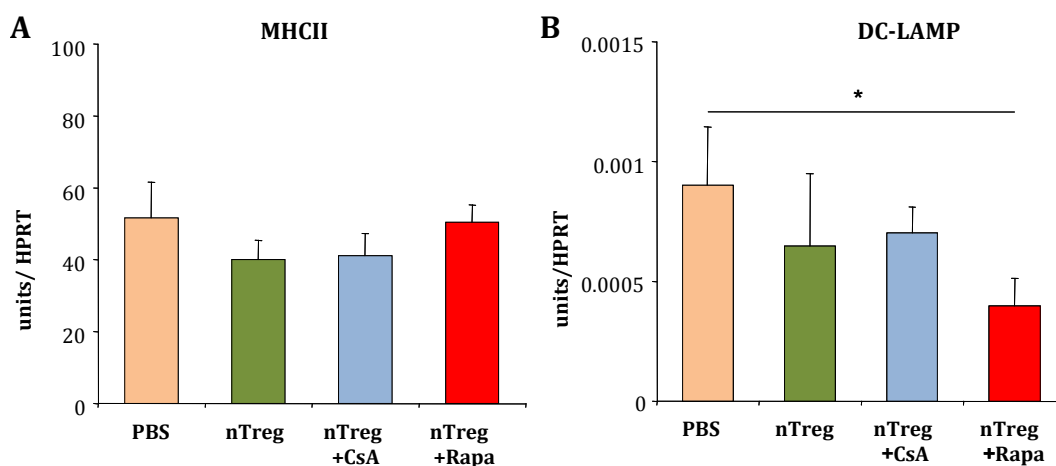


**Grafikon 7.** RT-PCR analiza iRNA ekspresionih profila u kornealnim alokalemovima za različite terapijske grupe (n=5, svaka grupa). Nivo ekspresije sledećih gena: CD3, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17A (A), i Foxp3/CD3 (B) analiziran je u odnosu na konstitutivno eksprimiran gen (HPRT) (log-skala). Injekcija nTreg ćelija nije uticala na ekspresiju navedenih gena. Dodatak rapamicina značajno je redukovao nivo CD3 markera kao i analiziranih citokina (\*p<0.05).

#### 4.2.4 Efekat transfera prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija i imunosupresivne terapije na iRNA transkripciju u splenocitima

U splenocitima je pomoću kvantitativne RT-PCR metode analizirana MHCII i DC-LAMP transkripcija. DC-LAMP je transmembranski glikoprotein kojeg eksprimiraju zrele dendritične ćelije. U poređenju sa PBS kontrolnom grupom, transfer prirodnih Treg ćelija, samih ili u kombinaciji sa CsA nije uticao na DC-LAMP transkripciju (nTreg: p=0.2, nTreg+CsA: p=0.631). Suprotno tome, transfer prirodnih Treg ćelija sa naknadnom primenom rapamicina tokom 14 dana značajno je redukovao nivo DC-LAMP iRNA ekspresije u splenocitima (nTreg+Rapa: p=0.039) (*grafikon 8B*).

Primena imunosupresivne terapije nakon injekcije prirodnih Treg ćelija nije uticala na MHCII transkripciju u splenocitima (nTreg: p=0.153, nTreg+CsA: p=0.568, nTreg+ Rapa: p=0.732) (*grafikon 8A*).

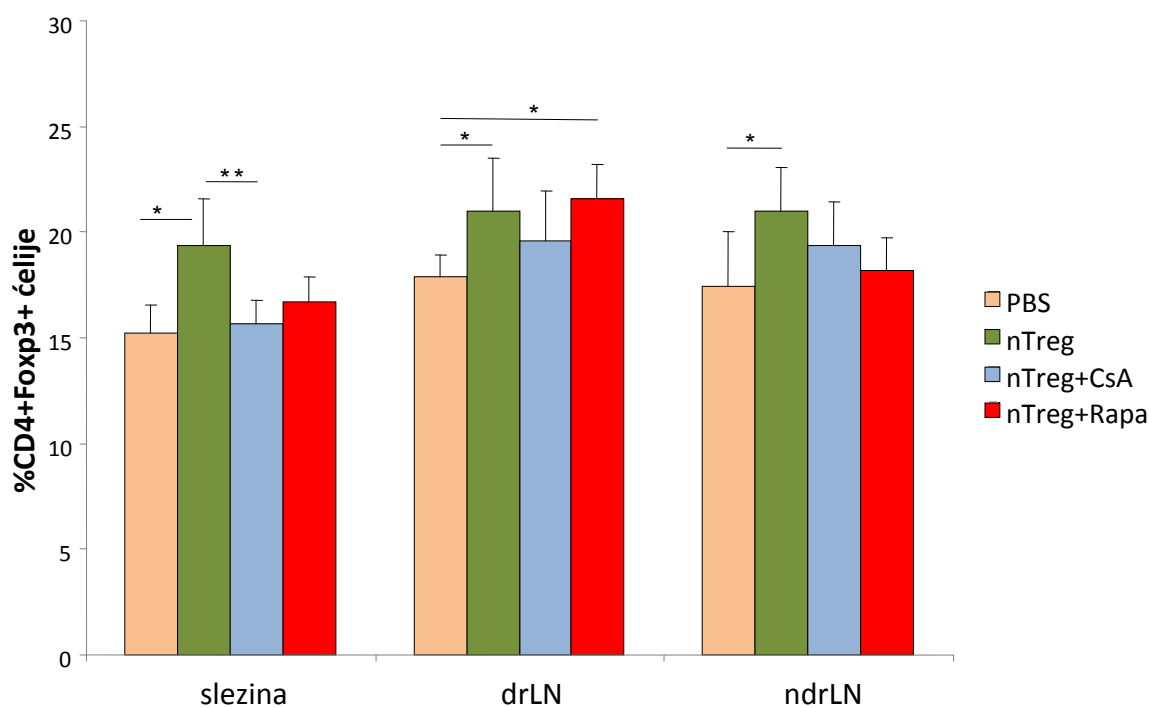


**Grafikon 8.** RT-PCR analiza iRNA ekspresionih profila u splenocitima za različite terapijske grupe (n=5, svaka grupa). Nivo ekspresije sledećih gena: MHCII (A) i DC-LAMP (B) analiziran je u odnosu na konstitutivno eksprimiran gen (HPRT) (log-skala). Dodatak rapamicina značajno je redukovao DC-LAMP transkripciju (\*p<0.05).

#### 4.2.5 Analiza akumulacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> limfocita u sekundarnim limfoidnim organima nakon adoptivnog transfera prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija

Da bi se utvrdio efekat immunosupresivnih lekova CsA i rapamicina na funkcionalni kapacitet prirodnih Treg ćelija nakon adoptivnog transfera, merili smo prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> limfocita u sekundarnim limfoidnim organima. Za tu svrhu, desetog postoperativnog dana nakon transplantacije rožnjače, submandibularni drLN-i kao i ndrLN-i sa suprotne strane i slezina podvrgnuti su protočnoj citometriji kao što je već opisano. Transfer nTreg ćelija značajno je povećao prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drLN-ima (21.0 ± 2.46%, p=0.011) u poređenju sa PBS primaocima (17.86 ± 1.08%). Takođe, kod kombinacije prirodnih Treg ćelija i rapamicina značajno je povećano prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u drLN-ima (21.60 ± 1.63%, p=0.025), dok je dodatak CsA onemogućio značajnu ekspanziju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u drLN-ima (19.55 ± 2.40%, p=0.201) nakon jedne injekcije nTreg ćelija u poređenju sa PBS primaocima. Jedna injekcija prirodnih Treg ćelija značajno je povećala prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u slezini (19.30 ± 2.16%, p=0.018) i ndrLN-

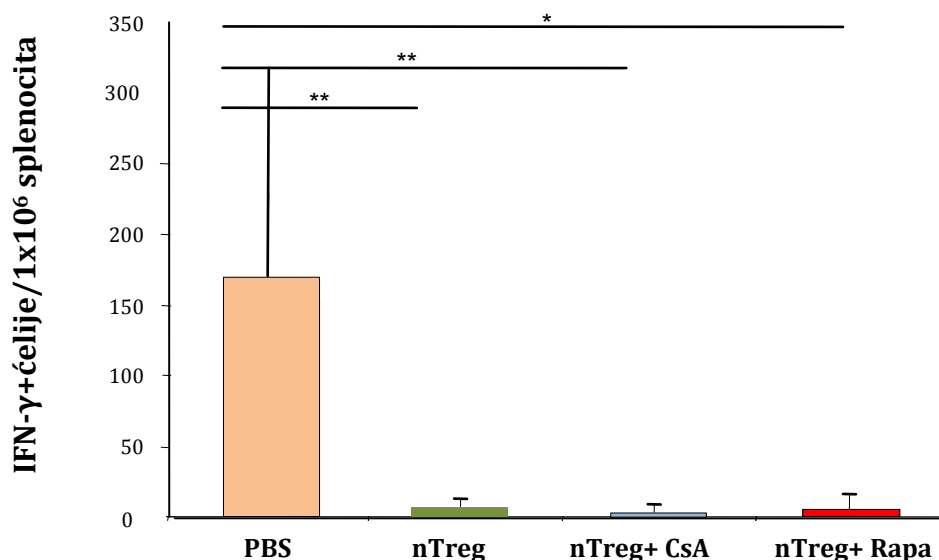
ima ( $20.99 \pm 2.09\%$ ,  $p = 0.028$ ) u poređenju sa PBS grupom (slezina:  $15.19 \pm 1.35\%$ , ndrLN:  $17.46 \pm 2.55$ ). Međutim, ove promene u ekspanziji  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatornih T ćelija u slezini i ndrLN-ima nisu bile značajne kod primoca sa kombinacijom adoptivnog transfera nTreg ćelija i rapamicina (slezina:  $16.99 \pm 1.19\%$ ,  $p=0.10$  i ndrLN:  $18.18 \pm 1.51\%$   $p=0.88$ ) ili CsA (slezina:  $15.66 \pm 1.05\%$ ,  $p=0.20$  i ndrLN:  $19.37 \pm 2.07\%$ ,  $p=0.20$ ) u poređenju sa PBS kontrolnom grupom. Međutim, dodatak CsA značajno je snizio prisustvo  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatornih ćelija u slezini u poređenju sa grupom koja je dobila samo injekciju prirodnih Treg ćelija ( $p=0,01$ ) (grafikon9).



**Grafikon 9.** Analiza prisustva  $CD4^+Foxp3^+$  ćelija u različitim terapijskim grupama (PBS, nTreg, nTreg+CsA, nTreg+Rapa) pomoću protočne citometrije. Ćelijska suspenzija pripremljena je od slezine, drLN i ndrLN, desetog dana nakon kornealne transplantacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD ( $n=5$ , svaka grupa),  $*p<0.05$ ,  $**p\leq 0.01$ .

#### 4.2.6 Terapijski efekat na IFN- $\gamma$ produkujuće aloreaktivne T ćelije

Adoptivni transfer prirodnih Treg ćelija, samih ili u kombinaciji sa CsA ili rapamicinom sprečili su razvoj aloantigen specifičnih IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija u slezini desetog dana nakon transplantacije (nTreg:  $p=0.004$ ; nTreg+CsA:  $p=0.004$  i nTreg+Rapa:  $p=0.016$ ) (grafikon 10).



**Grafikon 10.** Primenom Elispot analize utvrđen je razvoj IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija u slezini koja je uzeta 10 dana nakon keratoplastike. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD ( $n=5$ , svaka grupa) (\*\* $p<0.01$ ).

### 4.3 EFEKAT ALOANTIGEN SPECIFIČNIH Treg ĆELIJA U ODNOSU NA PRIRODNE Treg ĆELIJE U PREVENICIJI ODBACIVANJA KORNEALNOG ALOKALEMA

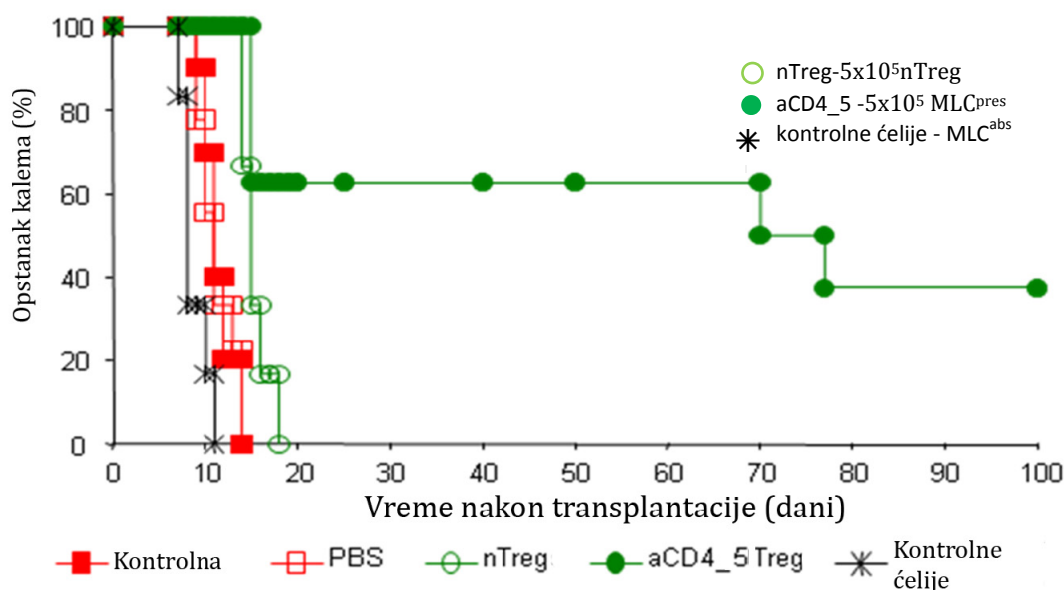
#### 4.3.1 Efekat adoptivnog transfera antigen specifičnih Treg ćelija na opstanak kornealnog alokalema

Inokulacija  $5 \times 10^5$  aloantigen specifičnih T regulatornih ćelija (MLC<sup>pres</sup>) 1 dan pre transplantacije rožnjače značajno je produžila opstanak kalema u poređenju sa kontrolnom PBS grupom. Srednje vreme opstanka iznosilo je  $61.3 \pm 40.24$  dana ( $n=8$ ,  $p=0.0001$ ), a 37.5 % miševa nije odbacilo kalem tokom perioda praćenja koji je iznosio više od 100 dana, pa se ovi kalemovi mogu smatrati trajno prihvaćenim. Suprotno tome, injekcija  $5 \times 10^5$  kontrolnih ćelija (MLC<sup>abs</sup>) dovela je do akutnog odbacivanja kalema (SVO:  $8.86 \pm 1.46$  dana,  $n=7$ ,  $p=0.02$ ) u poređenju sa PBS grupom (tabela 5, grafikon 11).

Takođe smo analizirali da li jedna injekcija od  $1 \times 10^5$  aloantigen specifičnih Treg ćelija ( $MLC^{pres}$ ) u kombinaciji sa 0.5 mg/kgTT rapamicina tokom 14 dana može efikasnije da spreči odbacivanje alokalema. Ovde smo pokazali da transfer  $1 \times 10^5$   $MLC^{pres}$  u kombinaciji sa kratkotrajnom primenom rapamicina značajno produžava opstanak kornealnog alokalema (SVO:  $36.6 \pm 28.8$  dana,  $n=6$ ) u poređenju sa adoptivnim transferom od  $1 \times 10^5$   $MLC^{pres}$  bez imunosupresivne terapije (SVO:  $10 \pm 0$  dana,  $p= 0.0082$ ). Međutim, sve životinje su odbacile kornealni alokalem do 77. dana, tj. 63 dana nakon isključenja imunosupresivne terapije (tabela 5, grafikon 12).

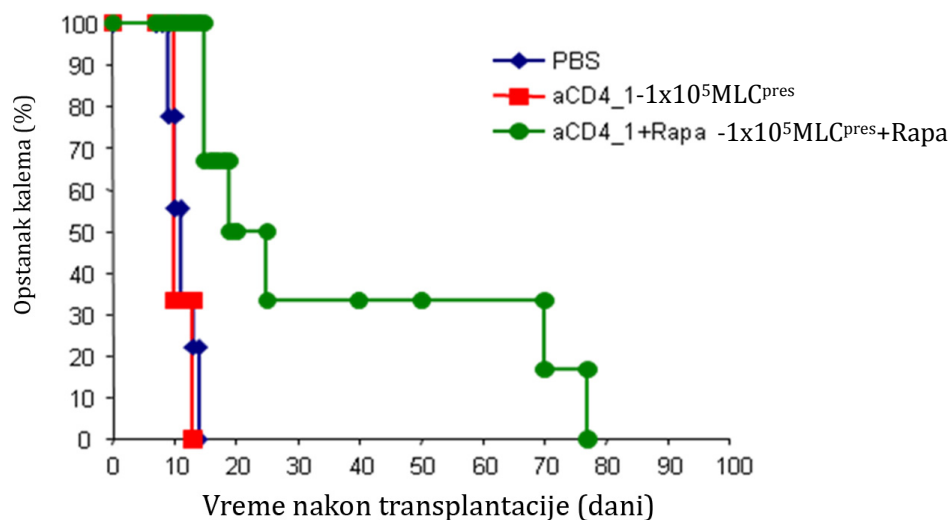
**Tabela 5.** Vreme opstanka kornealnog kalema nakon alogene keratoplastike

Grupa	Vreme preživljavanja (dani)	SVO $\pm$ SD
Kontrolna, PBS	9, 9, 10, 10, 10, 11, 11, 13, 14, 14	$11.2 \pm 1.91$
Kontrolne ćelije $5 \times 10^5$ $MLC^{abs}$	7, 8, 8, 8, 10, 10, 11	$8.86 \pm 1.46$
$5 \times 10^5$ $MLC^{pres}$ Treg (aCD4_5 Treg)	14, 15, 15, 70, 77, 100, 100, 100	$61.38 \pm 40.24$
$1 \times 10^5$ $MLC^{pres}$ Treg (aCD4_1 Treg)	10, 10	10
$1 \times 10^5$ $MLC^{pres}$ Treg+Rapa (aCD4_1+ Rapa)	15, 15, 19, 24, 70, 77	$36.67 \pm 28.8$
$5 \times 10^5$ nTreg	14, 14, 15, 15, 16, 17, 18, 18	$15.8 \pm 1.64$



**Grafikon 11** Kaplan-Meier-ove krive opstanka kornealnog alokalema nakon primene različitih imunomodulatornih terapijskih protokola.





**Grafikon 12.** Kaplan-Meier-ove krive opstanka kornealnog alokalema nakon primene različitih imunomodulatornih terapijskih protokola.

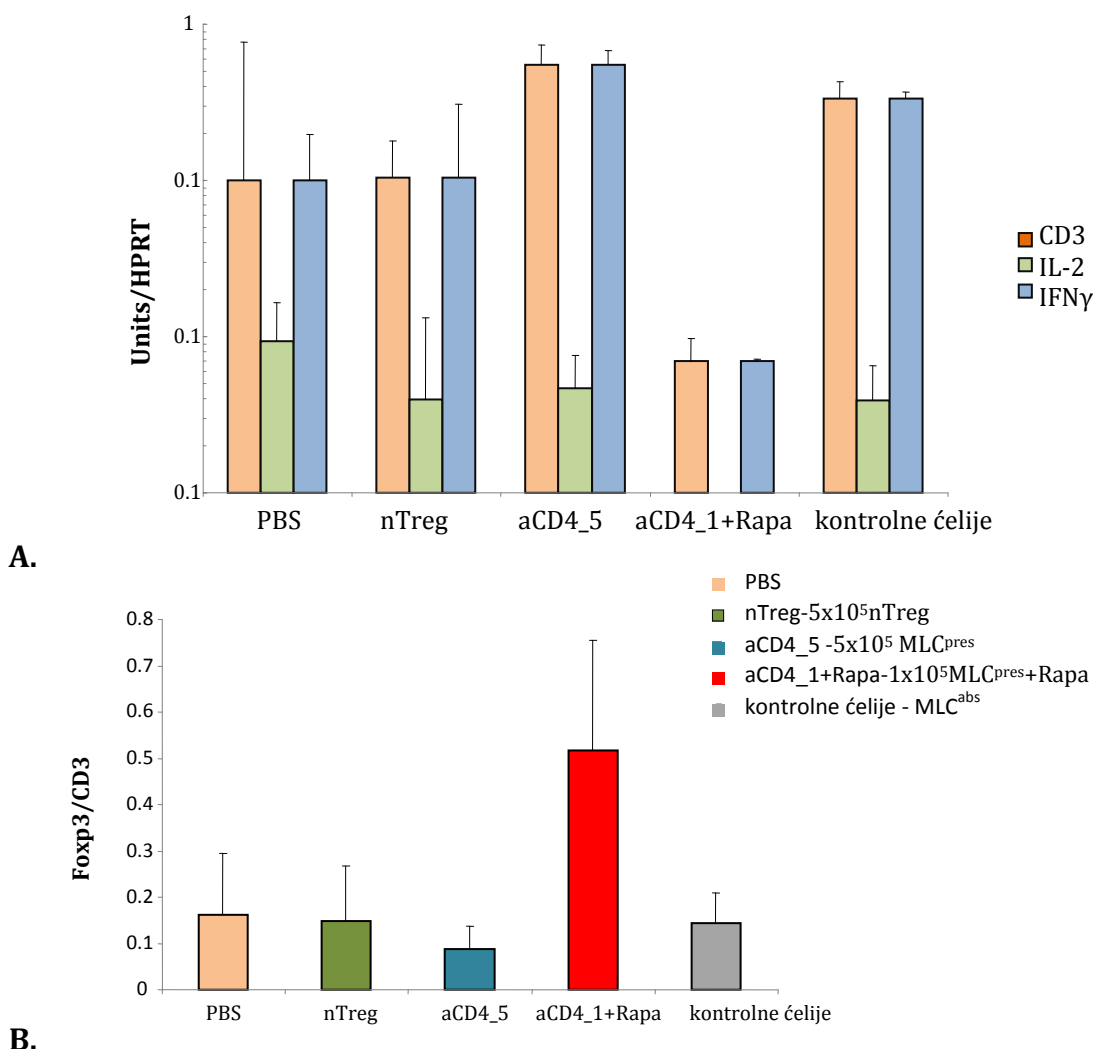
#### 4.3.2 Efekat antigen specifičnih Treg ćelija i immunosupresivne terapije na iRNK transkripciju u kalemu

U cilju boljeg razumevanja graft-protektivnih mehanizama adoptivne ćelijske terapije, primenjene u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa imunomodulatornom terapijom, dalje smo analizirali T ćelijsku infiltraciju u kalemu kao i transkripciju Th1 citokina pomoću kvantitativnog RT-PCR-a. Za potrebe ovog eksperimenta, kornealni kalemovi uključujući i spoj sa rožnjačom domaćina ekscidirani su na već opisan način desetog dana nakon keratoplastike. Navedene analize pokazale su da samo jedna injekcija  $5 \times 10^5$  prirodnih Treg ćelija nema značajan efekat na sledeću iRNK ekspresiju u kalemu: CD3 ( $p=0.568$ ), IL-2 ( $p=0.935$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0.685$ ) i IL-17A ( $p=1.0$ ). Zanimljivo je da je rekonstitucija primaoca sa  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> proizvela sličnu transkripciju IL-2 ( $p=0.584$ ) i IF- $\gamma$  u graftu ( $p=0.144$ ) kao i jedna injekcija  $5 \times 10^5$  prirodnih Treg ćelija u odnosu na kontrolnu PBS grupu.

Dodatna primena rapamicina tokom 14 dana u kombinaciji sa transferom  $1 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> regulatornih T limfocita značajno je smanjila sledeću iRNK ekspersiju u graftu: CD3 ( $p=0.011$ ), IL-2 ( $p=0.011$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0.011$ ) i IL-17A ( $p=0.05$ ) u poređenju sa primaocima koji su tretirani samo adoptivnim transferom MLC<sup>pres</sup> Treg ćelija jedan dan pre keratoplastike. Takođe, ova transkripcija značajno je redukovana i u poređenju sa grupom koja je dobila samo prirodne Treg ćelije: CD3 ( $p=0.008$ ), IL-2 ( $p=0.008$ ) i IFN- $\gamma$  ( $p=0.023$ ). Šta više, dodatak male doze rapamicina značajno je

redukovao nivo CD3 markera ( $p=0.011$ ) i IFN- $\gamma$  ( $p=0.014$ ) u poređenju sa kontrolnom PBS grupom (grafikon 13A).

U kornealnim uzorcima analizirana je i Foxp3 transkripcija. Transfer nTreg ćelija ili aloantigen specifičnih Treg ćelija (MLC<sup>pres</sup>) nije imao značajan efekat na Foxp3 transkripciju u kalemu u poređenju sa PBS primaocima (nTreg:  $p=0.935$ ; MLC<sup>pres</sup>:  $p=0.144$ ). Međutim, transfer  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> značajno je snizio Foxp3 transkripciju u poređenju sa transferom  $5 \times 10^5$  nTreg ćelija ( $p=0.046$ ). Interesantno, dodatak rapamicina doveo je do više Foxp3 transkripcije od strane infiltrujućih T ćelija u kalemu, međutim navedena razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.142$ ) (grafikon 13B).

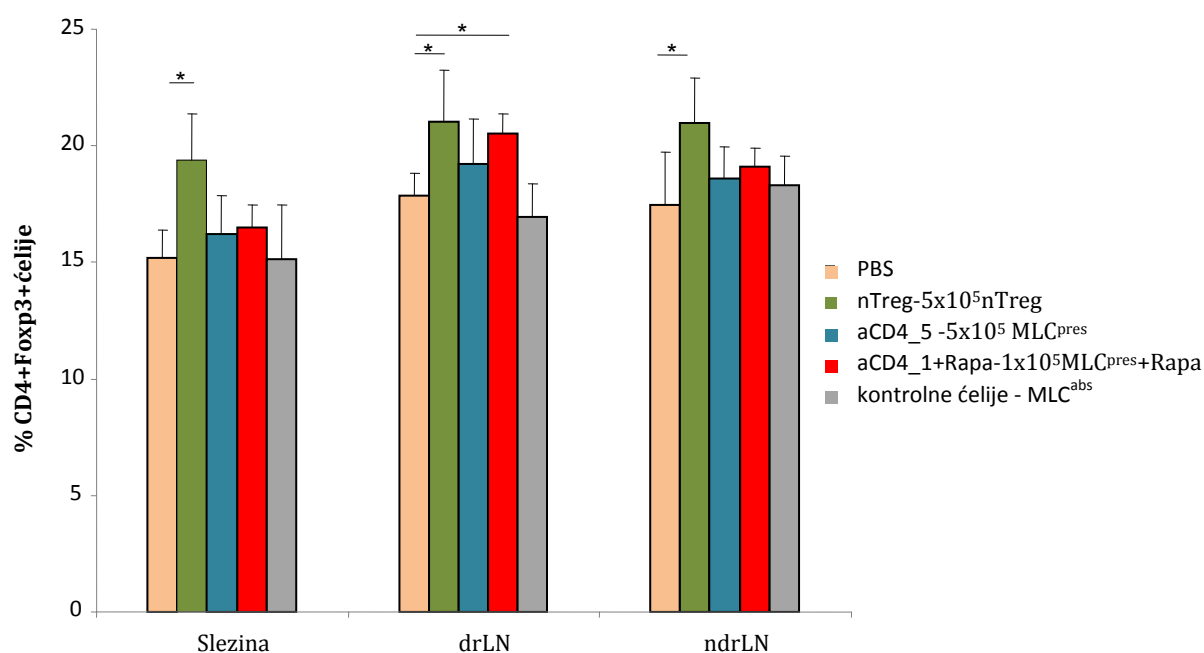


**Grafikon 13.** RT-PCR analiza iRNA ekspresionih profila u u kornealnim alokalemovima za različite terapijske grupe ( $n=3-5$ , svaka grupa). Nivo ekspresije sledećih gena: CD3, IL-2, IFN- $\gamma$  (A), i Foxp3/CD3 (B) analiziran je u odnosu na

konstitutivno eksprimiran gen (HPRT) (log- skala). Dodatak rapamicina značajno je redukovao transkripciju navedenih infiltracionih i inflamatornih markera ( $p < 0.05$ ) (A) ali nije značajno povećao Foxp3 transkripciju u kalemu od strane infiltrujućih T ćelija (B).

#### **4.3.3 Analiza akumulacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u sekundarnim limfoidnim organima protočnom citometrijom nakon adoptivnog transfera antigen specifičnih Treg ćelija**

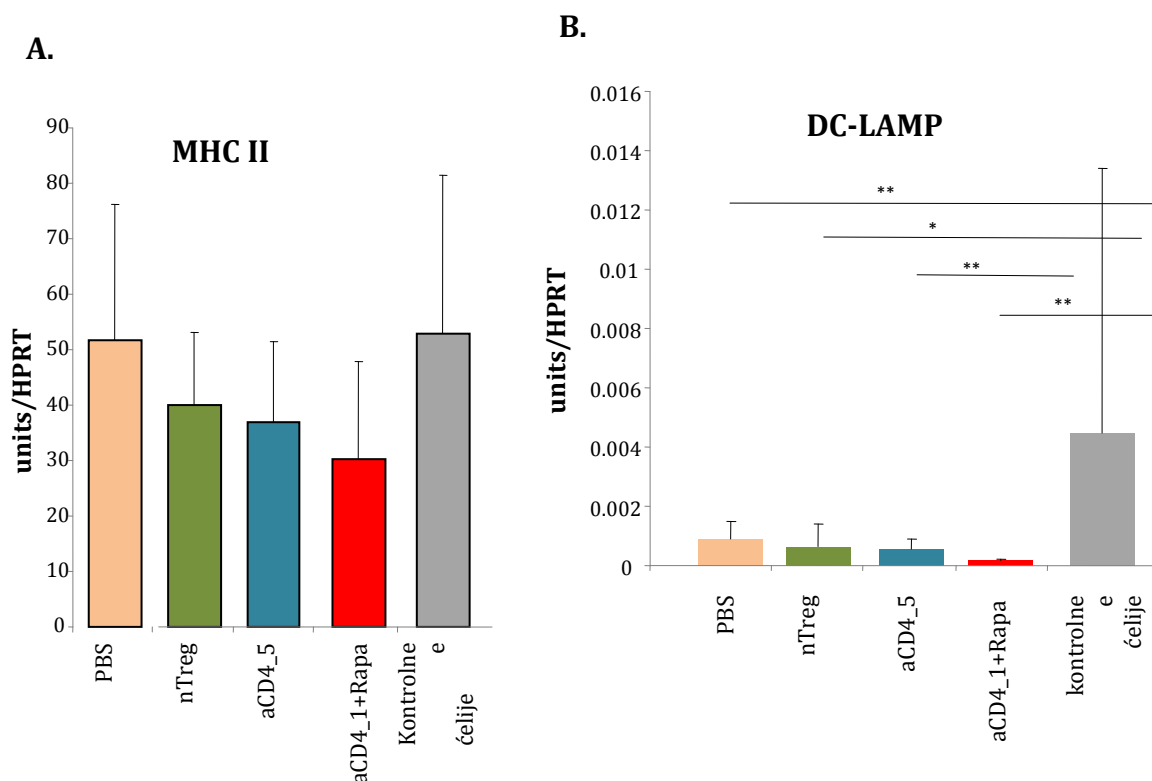
Kao što je već opisano, desetog postoperativnog dana, ćelijska suspenzija dobijena od slezine, ipsilateralnih submandibularnih drLN-a kao i ndrLN-a sa suprotne strane podvrgnuta je analizi protočnom citometrijom. Transfer prirodnih Treg ćelija značajno je povećao prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drLN-ima ( $21.0 \pm 2.46\%$ ,  $p=0.011$ ) u poređenju sa PBS kontrolnom grupom ( $17.86 \pm 1.08\%$ ). Takođe, transfer prirodnih Treg ćelija značajno je povećao prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u slezini ( $19.30 \pm 2.16\%$ ,  $p=0.018$ ) i ndrLN-ima ( $20.99 \pm 2.09\%$ ,  $p=0.028$ ) u poređenju sa PBS grupom (slezina:  $15.18 \pm 1.35\%$ , ndrLN:  $17.46 \pm 2.55$ ). Međutim, navedene promene u ekspanziji CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u slezini ( $16.19 \pm 1.84$ ), drLN-ima ( $19.23 \pm 2.08$ ) i ndrLN-ima ( $18.57 \pm 1.53$ ) nisu bile statistički značajne kod primaoca koji su dobili  $5 \times 10^5$  aloantigen specifičnih Treg (MLC<sup>pres</sup>) jedan dan pre keratoplastike u poređenju sa PBS i MLC kontrolnom grupom (MLC<sup>abs</sup>),  $p > 0.05$ . S druge strane, dodatna aplikacija rapamicina tokom 14 dana u kombinaciji sa transferom  $1 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> jedan dan pre keratoplastike značajno je povećala prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drLN-ima ( $20.52 \pm 0.98$ ,  $p=0.014$ ) u poređenju sa PBS primaocima (*grafikon 14*).



**Grafikon 14.** Analiza prisustva CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u različitim terapijskim grupama (PBS, 5x10<sup>5</sup>nTreg, 5x10<sup>5</sup> MLC<sup>pres</sup>, 1x10<sup>5</sup>MLC<sup>pres</sup>+Rapa, kontrolne ćelije- MLC<sup>abs</sup>) pomoću protočne citometrije. Desetog dana nakon keratoplastike pripremljena je ćelijska suspenzija od slezine, drenirajućih i nedrenirajućih limfnih čvorova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=5, svaka grupa), \*p<0.05.

#### 4.3.4 DC-LAMP transkripcija u splenocitima

U slezinama primaoca koje su uzete desetog postoperativnog dana analizirana je i ekspresija DC-LAMP transkripta pomoću kvantitativnog RT-PCR-a. Tendencija ka redukciji DC-LAMP transkripcije uočena je u splenocitima životinja koje su tretirane MLC<sup>pres</sup> antigen specifičnim Treg ćelijama u poređenju sa kontrolnom grupom koja je dobila MLC<sup>abs</sup> ćelije jedan dan pre keratoplastike (p=0.078). Međutim dodatna aplikacija rapamicina značajno je snizila transkripciju markera sazrevanja dendritičnih ćelija (DC-LAMP) u splenocitima (p=0.01) (*grafikon 15*).

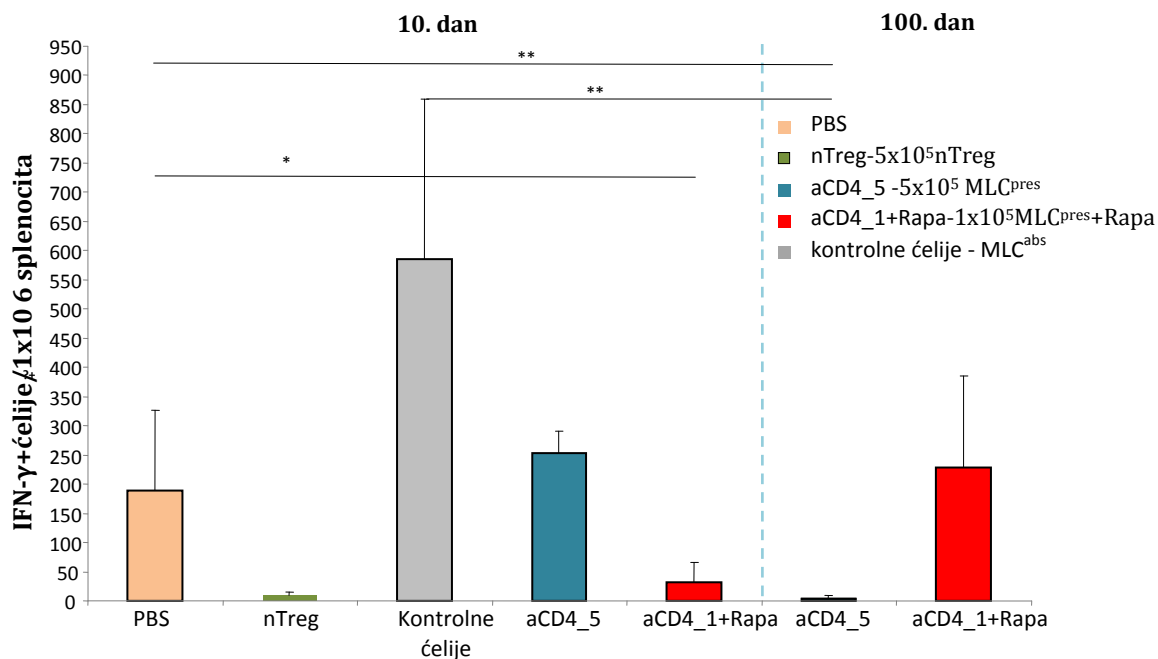


**Grafikon 15.** RT-PCR analiza mRNA ekspresionih profila u splenocitima za različite terapijske grupe (n=3-5, svaka grupa). Nivo ekspresije sledećih gena: MHCII (A) i DC-LAMP CD3 (B) analiziran je u odnosu na konstitutivno eksprimiran gen (HPRT) (log- skala). Dodatak rapamicina značajno je redukovao DC-LAMP transkripciju (\*p<0.05, \*\*p≤ 0.01).

#### 4.3.5 Terapijski efekat na IFN- $\gamma$ produkujuće aloreaktivne T ćelije

Transfer prirodnih Treg ćelija značajno je redukovao razvoj aloantigen specifičnih memorijskih ćelija u slezini, desetog dana nakon keratoplastike (p=0.004). Međutim, kod miševa koji su tretirani aloantigen specifičnim Treg ćelijama ELISPOT analiza pokazala je samo tendenciju ka redukciji prisustva aloantigen specifičnih IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija (p=0.058), dok je dodatak rapamicina značajno redukovao broj alospecifičnih IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija (p=0.023) u ranom postoperativnom periodu. Međutim, nakon isključena rapamicina broj aloreaktivnih ćelija je rastao tako da nakon 100 dana nije bile statistički značajne razlike u odnosu na PBS grupu (p=0.482) kao i

kontrolnu MLC<sup>abs</sup> grupu (p=0.116). Na suprot navedenom, sto dana nakon keratoplastike aloreaktivne IFN- $\gamma$  produkujuće memorijske ćelije nisu mogle da se detektuju u slezini životinja koje su dobile  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> ćelija i značajno su redukovane u poređenju sa PBS grupom (p=0.008) ili kontrolnom grupom koja je dobila MLC<sup>abs</sup> ćelije jedan dan pre keratoplastike (p=0.010) (grafikon 16).



**Grafikon 16.** Primenom Elispot analize utvrđen je razvoj aloreaktivnih IFN- $\gamma$  produkujućih memorijskih T ćelija u slezini koja je uzeta 10 dana i 100 dana nakon keratoplastike. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD (n=5, svaka grupa) (\*p<0.05, \*\*p $\leq$ 0.01).

## 5. DISKUSIJA

Imunološki odgovor na transplantiranu rožnjaču glavni je uzrok oštećenja i gubitka kalema nakon keratoplastike. Intenzitet i priroda imunog odgovora na transplantirano tkivo uslovljeni su vrstom kalema (kornealni ili limbokornealni) i prirodom ležišta domaćina (stepen vaskularizacije, deficit stem ćelija).

Predisponirajući faktori rizika za odbacivanje kornealnog kalema mogu biti prepoznati preoperativno i obuhvataju: duboku vaskularizaciju u 2 ili više kvadranta, prethodno odbačene kalemove kao i inflamaciju u vreme keratoplastike [5, 179, 6, 180, 7,8]. Takođe, u faktore rizika ubraja se veliki dijametar kalema, blizina alokalema limbusu recipienta. [181, 182, 183]. Kod visoko-rizične keratoplastike bez primene sistemske imunosupresivne terapije propadanje kalema u prvoj postoperativnoj godini javlja se u preko 50% slučajeva [3, 184]. Bez obzira na mogućnost direktnog ukapavanja steroidnih kapi u visokim koncentracijama na transplantirani kornealni kalem, ova terapijska strategija dovoljna je samo kod keratoplastike normalnog rizika. Klonalna ekspanzija aloreaktivnih T ćelija odvija se u limfoidnim organima, pa je zbog toga kod visoko-rizične keratoplastike pored topikalne aplikacije steroidnih kapi neophodno uvesti i sistemske imunosupresivne terapije.

Smisao vremenski ograničene imunosupresivne terapije je da spreči akutno odbacivanje kalema i obezbedi uslove za promovisanje graft-protektivnih ćelija i citokina koji će omogućiti opstanak kalema bez dodatne imunosupresivne terapije. Uvođenjem efikasne imunosupresivne terapije opstanak transplantata značajno je produžen. Međutim, kasni gubitak kalema usled hronične reakcije odbacivanja zajedno sa neželjenim efektima dugotrajne imunosupresivne terapije glavne su prepreke ka uspešnoj transplantaciji.

Nekoliko studija pokazalo je da regulatorne T ćelije koje su sposobne da spreče odbacivanje kalema mogu biti indukovane primenom određenih monoklonskih antitela, kostimulatornih inhibitora ili imunosupresivnih lekova [185, 145, 149, 150]. Takođe, pokazano je da ishod transplantacije zavisi od balansa između pomenutih regulatornih i aloreaktivnih T ćelija [186, 118, 187, 188]. Međutim, u modelu sa potpuno nepodudarnim MHC antigenima, veliki broj aloreaktivnih T ćelija mora biti odstranjen da bi se postigao dugotrajan opstanak kalema [186, 188], pa

alternativna strategija može biti kombinacija transfera Treg ćelija sa sistemskom primenom određenih imunosupresivnih lekova. U terapijskom smislu, adoptivni transfer regulatornih T ćelija redukovao bi potrebu za primenom savremenih nespecifičnih imunosupresivnih lekova i poboljšao opstanak alokalema. Ovo je posebno važno za buduće strategije kod pacijenata sa visoko-rizičnom keratoplastikom obzirom da ovi pacijenti nisu životno ugroženi.

Nove terapijske strategije nakon keratoplastike proizilaze iz boljeg poznavanja mehanizama odbacivanja kornealnog kalema i preuzimanja postojećih uspešnih terapijskih protokola iz transplantacije solidnih organa.

### **5.1. EFEKAT SISTEMSKE IMUNOSUPRESIVNE TERAPIJE NA OPSTANAK KORNEALNOG ALOKALEMA**

Značajan broj pacijenata kod kojih je urađena keratoplastika imaju ležište rožnjače koje je izgubilo imunološku privilegiju zbog prethodne kornealne infekcije, neovaskularizacije ili inflamacije [189]. Preko 50% visoko rizičnih kalemova odbaci se bez obzira na primenjenu antiinflamatornu terapiju [190, 8]. Imunomodulatorni terapijski protokoli koji se koriste u prevenciji reakcije odbacivanja kalema rožnjače preuzeti su i prilagođeni iz drugih oblasti transplantacione medicine. Savremene strategije u prevencije odbacivanja alografta baziraju se na kombinaciji imunomodulatornih lekova u cilju redukcije njihovih neželjenih efekata [191].

U ovoj studiji analizirali smo efekat male doze sistemske primene rapamicina, u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa CsA, u prevenciji odbacivanja kornealnog alokalema kod visoko rizičnog eksperimentalnog modela. Pokazali smo da Rapa monoterapija umereno odlaže reakciju odbacivanja ( $p=0.03$ ), dok kombinovana terapija (Rapa+CsA) statistički visoko značajno prolongira opstanak alokalema ( $p=0.0001$ ).

Oba leka, Rapa i CsA, kao imunosupresivni agensi, nezavisno su ispitivani u eksperimentalnoj keratoplastici [192, 193]. U dosadašnjim studijama pokazan je povoljan efekat rapamicina na opstanak kornealnog alokalema [193, 194]. Međutim, postoje konfliktne opservacije u pogledu imunomodulatornog efekta CsA u različitim eksperimentalnim modelima [192, 195]. Zanimljivo je da je Zhang sa saradnicima [192]



pokazao da maksimalna sistemska doza CsA nije imala značajan efekat na opstanak kornealnog alokalema kod miševa. Naši rezultati u skladu su sa navedenim zapažanjem i pokazuju da kratkotrajna aplikacija male doze CsA takođe nije produžila opstanak kalema. Nedavno je pokazano da kod pacova dodatak Rape može da ublaži nefrotoksični efekat CsA samo ako se redukuje doza oba agensa [196]. Zbog toga smo, da bi izbegli toksične efekte, koristili male doze CsA u našoj studiji.

Naši rezultati u pogledu opstanka kornealnog alokalema postignuti primenom Rape, u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa CsA, u skladu su sa ranijim zapažanjima Thompson-a i saradnika u eksperimentalnoj keratoplastici na pacovima / [194]. U istoj studiji, u nisko rizičnoj kombinaciji životinja, mala doza rapamicina prolongirala je opstanak kornealnog grafta samo nekoliko dana, dok je kombinovana terapija značajno produžila opstanak kornealnog grafta. Takođe, efekat kombinovane primene malih doza rape i CsA na opstanak kornealnog kalema bio je uporediv sa rezultatima viskodozne monoterapije. Međutim, sedam dana nakon ukidanja terapije došlo je do odbacivanja kalema, kako navodi Thompson [194]. Slično navedenim rezultatima, u našoj studiji, 5 dana nakon ukidanja terapije sve životinje odbacile su alokalemove u ovoj visoko rizičnoj kombinaciji miševa.

Da bi smo ispitali potencijalne mehanizme koji su mogli da vode ka dužem opstanku kornealnog alokalema, analizirali smo gensku ekspresiju proinflamatornih molekula u graftu. Reakcija odbacivanja kornealnog alografta predstavlja reakciju kasnog odbacivanja koja uključuje CD4<sup>+</sup>T ćelije kao predominantni ćelijski tip.

Mada su i Th1 i Th2 citokini implicirani u reakciji odbacivanja rožnjače, izgleda da su citokini uključeni u Th1 imunitet relevantniji [77,197,198,73,199,200,201]. Ranije studije pokazale su da lokalna IL-4 genska terapija, kao i nishodna regulacija interleukina-4, Th2 citokina, lokalnim CTLA4 Ig genskim transferom nije dovela do produženja opstanka kornealnog alokalema [202, 203].

U ovoj studiji transkripcija markera infiltrujućih T ćelija (CD3), Th1 citokina (IFN- $\gamma$ , IL-2) i Th2 citokina (IL-10) značajno je redukovana primenom kombinovane terapije sa ciklosporinom A i rapamicinom. Na suprot tome, Rapa monoterapija bila je manje efikasna u inhibiciji ekspresije citokina u kalemu i

sledstveno manje efikasna u produženju opstanka kornealnog alokalema. Takođe, povećana transkripcija navedenih citokina bila je u korelaciji sa izraženom mononuklearnom ćelijskom infiltracijom zapaženom u svim histološkim presecima odbačenih kornealnih alograftova u PBS kontrolnoj grupi. Ovi podaci ukazuju da kombinovana terapija sa malom dozom CsA i rapamicina efikasno modulira iRNK ekspresiju inflamatornih i infiltracionih markera.

Nedavno je jedan broj eksperimentalnih studija pokazao različit efekat rapamicina i CsA na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelije. Sugerisano je da CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelije mogu biti rezistentnije na inhibitorni efekat rapamicina u poređenju sa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> efektornim T ćelijama, dok CsA konzistentno redukuje nivo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija na periferiji [153, 204, 205]. Zanimljivo je zapažanje Kawai-a i saradnika da mala doza CsA nije narušila razvoj Treg ćelija *in vivo* [206]. Zbog toga smo analizirali uticaj male doze rapamicina, u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa ciklosporinom A, na prisustvo Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija. Nedavno je prisustvo Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija pokazano u neodbačenim bubrežnim graftovima kod miševa [207], ali i u odbačenim kod primata, kao i prihvaćenim kožnim transplantatima [208, 209]. Cauhan i saradnici, u nedavno publikovanoj studiji, nalaze veći absolutni broj Treg ćelija u odbačenim kornealnim kalemovima u poređenju sa prihvaćenim kalemovima, što je ujedno bio i glavni razlog za povećanu Foxp3 iRNK ekspresiju u odbačenim alokalemovima [176]. U našoj studiji nije bilo značajne razlike u nivou iRNK ekspresije za Foxp3 u kornealnim kalemovima. Predpostavljamo da je prisustvo Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u odbačenim i transparentnim kalemovima jedan fiziološki odgovor na prateću inflamaciju u ovoj visoko rizičnoj kombinaciji miševa, obzirom da su svi kalemovi na kraju bili odbačeni. Ova pretpostavka je u skladu sa nedavnom sugestijom da ulazak Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija predstavlja jedan mehanizam za stabilizaciju inflamacije u alograftu [176,210]. Takođe, ovde smo pokazali da imunomodulatorna terapija nije imala značajan efekat na Foxp3 iRNK ekspresiju u graftu. Ovo je u skladu sa publikacijom koja takođe nije pokazala postojanje razlike u Foxp3 ekspresiji tokom terapije ciklosporinom A bez obzira na eventualno postojanje ili odsustvo reakcije odbacivanja bubrežnog alografta [208].

Takođe, dokazano je i prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelije u limfoidnom tkivu primaoca posle eksperimentalne transplantacije [117,211]. Pokazano je da je

migracija Treg ćelija u drenirajuće limfne čvorove neophodna za njihovu supresivnu ulogu [211, 212]. Danas se zna, prema radovima Niederkorn-a [43, 213] i Streilein-a [214, 215] da se regulatorni alospecifični graft protektivni mehanizmi generišu u slezini nakon transplantacije rožnjače, dok je postojanje okulo-limfatične osovine bitno za aloimunizaciju [216, 217]. Pokazano je da je submandibularni drenirajući limfni čvor esencijalan za aloimunizaciju u reakciji odbacivanja kornealnog kalema [216, 217]. Mi smo u našoj studiji pokazali različit efekat rapamicina, primenjenog u vidu monoterapije u odnosu na kombinaciju istog sa ciklosporinom A, na homeostazu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u ovom drenirajućem limfnom čvoru. Frekvencija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u drLN-u pokazala je tendenciju ka porastu, ali nije dostigla statistički nivo značajnosti (fig 4, p=0.055). Međutim, kombinovana primena ciklosporina A sa rapamicinom značajno je snizila procenat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg u drLN-u. Nedavno je postavljena hipoteza po kojoj odbacivanje kalema ili njegovo trajno prihvatanje zavisi od balansa između citopatskih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> u odnosu na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelije [186, 118]. U navedenim eksperimentima, mi nismo postigli toleranciju koja je krajnji cilj transplantacije. Međutim, najverovatnije u ovoj visoko rizičnoj kombinaciji za odbacivanje transplantata, delecioni mehanizmi imaju važnu ulogu u prolongaciji opstanka kornealnog kalema obzirom da veliki broj aloreaktivnih T ćelija mora biti efikasno blokiran. U studiji koju je publikovao Chauhan sa saradnicima, [176] Foxp3 Treg ćelije iz drenirajućeg limfnog čvora, od primaoca sa spontano prihvaćenim kornealnim alokalemom, nisu uspele da suprimiraju proliferaciju alosenzitivisanih efektorskih T ćelija. Navedeni autor sugerše da su Treg ćelije efikasnije u regulisanju aloimunog odgovora u fazi indukcije u poređenju sa efektorskom fazom [176]. U našoj studiji Rapa monoterapija kao ni kombinovana terapija sa malom dozom CsA nije narušila homeostazu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u slezini i nedrenirajućim limfnim čvorovima. Takođe, obe terapijske strategije efikasno su inhibirale IFN- $\gamma$  produkujuću aloreaktivne T ćelije u slezini.

## 5.2. EFEKAT IMUNOSUPRESIVNIH LEKOVA NA FUNKCIONALNI KAPACITET PRIRODNIH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćELIJA

U terapijskom kontekstu akumulirani su dokazi na eksperimentalnim modelima koji pokazuju da administracija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija primaocima može biti efikasna strategija u kontroli imunog odgovora nakon transplantacije organa ili ćelija [218, 219, 93]. Takođe, pokazano je da sveže izolovane prirodne regulatorne T ćelije dobijene od naivnih životinja mogu da inhibiraju reakciju odbacivanja alografta kod glodara [220, 188, 187, 157]. Graca i saradnici [209] pokazali su da prirodne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T ćelije od naivnih miševa mogu da spreče reakciju odbacivanja kožnog transplantata nakon adoptivnog transfera, bez obzira na odsustvo prethodnog iskustva sa donorskim aloantigenom, ukazujući na činjenicu da kapacitet da regulišu reakciju odbacivanja alografta pre-egzistira u naivnim miševima. Nakon transplantacije, kontinuirano prisustvo donorskih aloantigena iz kalema trebalo bi da promoviše generaciju Treg ćelija, a postoje i jasni dokazi da je kalem sam po sebi od krucijalnog značaja za održavanje tolerancije *in vivo* [221, 222].

U našoj studiji, injekcija sveže izolovanih prirodnih Treg ćelija jedan dan pre keratoplastike, značajno je produžila opstanak kompletno MHC nepodudarnih miševa bez dodatne imunosupresije ( $p=0.0001$ ). Klinički ishod, odbacivanje ili tolerancija, počiva na fragilnom balansu između imunoregulatornih i alodestruktivnih T ćelija [187, 118, 187, 188].

Da je odnos aloantigen-reaktivnih Treg prema eferentnim T ćelijskim klonovima krucijalan za postizanje optimalne supresije proizilazi iz činjenice da je dugotrajan opstanak srčanog alografta postignut kod 62,5% Rag-/-miševa samo kod zajedničke infuzije ekspanziranih prirodnih Treg ćelija i Teff u odnosu 4:1, ali ne i u odnosu 1:1 [188,187, 223, 147]. Tačan mehanizam alosupresije posredovan nTreg ćelijama u ovom modelu nije jasan, ali na multiple mehanizme ukazano je na drugim transplantacionim modelima [93, 224, 144, 225, 226, 118]. *In vitro* podaci ukazuju da pošto su jednim aktivirane nTreg ćelije mogu da ispolje antigen nespecifičnu supresiju [227]. Međutim, noviji *in vivo* podaci ukazuju da nTreg ćelije mogu suprimirati T ćelijsku aktivnost i na antigen-specifičan način [228, 229, 230, 231].

Značaj balansa između Treg i Teff proizilazi i iz terapijske efikasnosti Treg ćelija koja je ograničena na primaoce sa limfopenijom obzirom da je kod MHC

nepodudarnih alokalemova potrebna delecija velikom broja aloreaktivnih T ćelija [232, 233,234, 235], imajući u vidu njihov ogroman broj [236]. U skladu sa nevedenim su i naši rezultati obzirom da u ovoj visoko-rizičnoj kombinaciji Treg ćelijska terapija nije dovela do trajnog opstanka alokalema. Jedan od načina da se pojača efikasnost Treg ćelija *in vivo* podrazumeva kontrolu neregulatornih T ćelija i stvaranje iminoloških uslova koji će olakšati spontanu ekspanziju antigen specifičnih prirodnih Treg ćelija koje potom mogu da suprimiraju aloreaktivne T ćelije koje se oporavljaju od redukcije ili blokade [147]. Monoklonska antitela i neki lekovi mogu da ispolje ovaj efekat [148, 83, 117, 149, 150, 151]. Nedavno je jedan broj eksperimentalnih studija ukazao na različit efekat rapamicina i CsA na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelije. Sugerisano je da CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelije mogu biti rezistentnije na inhibitorni efekat rapamicina u poređenju sa CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> efektornim T ćelijama, dok CsA konzistentno redukuje nivo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija na periferiji [116, 204, 205]. Zbog toga postoji veliko interesovanje u pogledu efekta ovih imunosupresivnih lekova na razvoj i funkciju Treg ćelija u eksperimentalnim i kliničkim studijama [93].

U našoj studiji, kombinovana terapija sa prirodnim Treg ćelijama i malom dozom CsA (3.0 mg/kg) ili rapamicina (0.5 mg/kg) tokom 14 dana značajno je produžila vreme opstanka kalema u poređenju sa kontrolnim primaocima (nTreg+CsA: p=0.00079 i nTreg+Rapa: p=0.00068). Mada dodatak CsA ili rapamicina nije značajno odložio reakciju odbacivanja kalema u poređenju sa jednom injekcijom prirodnih Treg ćelija (nTreg+CsA: p=0.621 i nTreg+Rapa: p=0.09), tendencija ka daljoj prolongaciji opstanka alokalema viđena je kod primaoca koji su tretirani kombinacijom prirodnih Treg ćelija i rapamicina.

U studiji koju su publikovali Lim i saradnici [237] transfer nTreg ćelija u kombinaciji sa punom terapijskom dozom rapamicina (1.5mg/kg/d, 8 dana) prolongirao je opstanak kožnog kalema kod MHC nepodudarnih miševa za 10 dana (SVO=30) u odnosu na Treg ćelijsku terapiju bez imunosupresiva (SVO=21). Na suprot tome, CsA u punoj terapijskoj dozi (20mg/kg/dan) ispoljio je negativan efekat na Treg ćelijsku terapiju i skratio opstanak kožnog alokalema za 5 dana. Isti eksperiment sproveden je sa malom dozom CsA i rapamicina. Male doze CsA (5mg/kg/day) nisu pokazale antagonistički efekat na Treg ćelijsku terapiju mada

nisu ni produžile opstanak kalema (SVO=26.5). Zanimljivo je da je rapamicin u maloj dozi (0.3mg/kg/day) produžio opstanak kalema za 8 dana (SVO=34) i pokazao efikasnost u prolongaciji opstanka alotransplantata uporedivu sa punom terapijskom dozom navedenog imunosupresiva. Takođe, u našoj studiji povećane doze nije uticalo na značajnu prolongaciju opstanka kornealnog alokalema (rezultati nisu prikazani).

Poznato je da dendritične ćelije imaju kritičnu ulogu u regulisanju stečenog imunog odgovora ne samo zbog njihove uloge u prezentaciji antigena već i zbog uticaja na ishod antigene prezentacije. Nakon antigene prezentacije nezrelim dendritičnim ćelijama dolazi do suboptimalne aktivacije T ćelija a u nekim slučajevima i razvoja T ćelijske tolerancije [238]. Pomoću rapamicina pokazano je da je mTOR potreban za proces aktivacije/maturacije dendritičnih ćelija [239, 240]. Demonstrirano je da rapamicin inhibira maturaciju dendritičnih ćelija [239, 240]. Takođe, prisustvo rapamicina doprinosi redukovanoj ekspresiji MHC i kostimulatornih molekula kod dendritičnih ćelija koje potiču iz kostne srže [241, 242]. U našoj studiji male doze imunosupresivne terapije nakon injekcije prirodnih Treg ćelija nisu uticale na transkripciju II klase MHC kompleksa u splenocitima. Međutim, primenom rapamicina nakon transfera prirodnih Treg ćelija značajno je redukovana DC-LAMP ( $p=0.039$ ), transmembranski glikoprotein specifičan za zrele dendritične ćelije lokalizovane u T ćelijskim zonama limfoidnog tkiva [243]. Ovaj antigen prvo se ispoljava u kompartmentu II klase MHC kompleksa, ukazujući na njegov značaj u obradi antigena [244]. Takođe, nedavno je pokazano da dendritične ćelije koje sazrevaju u prisustvu rapamicina predstavljaju slabe stimulatore CD4<sup>+</sup> efektorskih ćelija, a imaju kapacitete da indukuju aktivaciju i proliferaciju CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih ćelija [242].

Rezultati eksperimentalnih studija ukazuju da ulazak Treg ćelija u drenirajuće limfne čvorove primaoca predstavlja neophodan preduslov za kontrolu antidonorske imunološke reakcije [211]. U stvari, ekspresija CD62L (L-selektin) ćelijskog adhezionog molekula esencijalna je za ulazak regulatornih T ćelija u sekundarne limfoidne organe [211]. U našoj studiji, prirodne Treg ćelije eksprimirale su CD62L (podaci nisu prikazani u rezultatima) i do 70% Treg ćelija bilo je Foxp3<sup>+</sup>. Obzirom da CD62L<sup>+</sup> podgrupa regulatornih T ćelija primarno

reaguje na CCL19, pretpostavljamo da su navedene ćelije sposobne da *in vivo* migriraju u sekundarne limfoidne organe i ispolje svoju supresivnu funkciju [227, 245]. Treg ćelije mogu da deluju direktno na efektorske ćelije i suprimiraju njihovu funkciju i da deluju indirektno modulirajući antigen-prezentujuće ćelije [246, 247].

Ovde smo pokazali da je nakon injekcije prirodnih Treg ćelija, samih ili u kombinaciji sa rapamicinom, značajno povećano prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima ( $p=0.011$ ,  $p=0.025$ ). Dodatak male doze CsA nakon injekcije prirodnih Treg ćelija onemogućio je ekspanziju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drLN-ima. Međutim, obe terapijske strategije efikasno su inhibirale IFN- $\gamma$  produkujuće memorijske ćelije u slezini. U jednom modelu sistemska administracija antigena uz primenu rapamicina promovisala je *de novo* generaciju Foxp3<sup>+</sup> regulatornih ćelija *in vivo* [248]. Takođe, na drugom modelu miševi tretirani rapamicinom bez antigene administracije pokazali su povećan odnos Treg u odnosu na efektorske T ćelije [204]. Smatra se da u navedenim modelima Treg ćelije kroz mehanizme nezavisne od mTOR signalnog puta, kao što je ushodna regulacija Pim2 kinaze, mogu da prevaziđu efektorske ćelije kod kojih dolazi do mTOR blokade pod dejstvom rapamicina [249].

Da bi smo ispitali potencijalne mehanizme koji bi mogli da prolongiraju opstanak kornealnog alokalema, analizirali smo iRNK gensku ekspresiju proinflamatornih molekula. U našoj studiji transfer prirodnih Treg ćelija nije imao značajan efekat na transkripciju pridruženih markera infiltrujućim T ćelijama (CD3), Th1 citokina (IFN- $\gamma$ , IL-2), Th2 citokina (IL-10) i Th17 citokina (IL-17A). Međutim, zanimljiva je efikasnija inhibicija ekspresije citokina u kalemu nakon primene rapamicina u poređenju sa CsA što bi moglo da vodi ka dodatnom produženju opstanka kalema. Smisao imunosupresivne terapije je u prevenciji inflamacije koju je izazavao sam transplantat i stvaranje uslova za aktivaciju i ekspanziju Treg ćelija [18]. Takođe, u ovoj visoko rizičnoj kombinaciji miševa, relativno veliki broj aloreaktivnih T ćelija mora biti efikasno blokiran kako bi se postigao određen balans između imunoregulatornih i aloagresivnih T ćelija. Primena rapamicina može imati povoljan efekat obzirom da se smatra da ovaj lek podstiče deleciju efektorskih ćelija

promocijom ćelijske smrti indukovane aktivacijom, a da pri tom istovremeno indukuje regulatorne T ćelije na periferiji [250].

Nedavno su identifikovane CD4<sup>+</sup> Th17 ćelije, nova podgrupa za koju je karakteristična sekrecija interelukina 17A [78]. U nekim radovima Th17 ćelije se dovode u vezu sa reakcijom odbacivanja transplantata za koju se ranije smatralo da je Th1 posredovana [79]. Takođe, Kopf H i saradnici [251], pokazali su da rapamicin promoviše generaciju Treg ćelija i inhibira generaciju Th17 ćelija za razliku od CsA koji inhibira obe T ćelijske populacije, ukazujući na dodatne mehanizme u već poznatom tolerogenom kapacitetu rapamicina. U skladu sa navedenim su i naši rezultati obzirom da je dodatak rapamicina nakon injekcije Treg ćelija značajno redukovao nivo IL-17A. U eksperimentalnoj keratoplastici navode se kontraverzni rezultati u pogledu uloge IL-17A na opstanka kornealnog alokalema. Nedavno su Cunnusamy i saradnici [72] pokazali da sistemska blokada IL-17A pomoću monoklonskih antitela narušava imunološku privilegiju i ubrzava odbacivanje kornealnog alokalema. Zanimljivo je da su Chen i saradnici demonstrirali odbacivanje svih C57Bl/6 kornealnih alokalemova kod IL-17 deficijentnih BALB/c (IL-17 KO BALB/c), ali sa značajno dužim opstankom kalema. Isti autori pokazali su da se IL-17 produkuje u ranoj fazi reakcije odbacivanja i da delecija IL17 gena odlaže, ali ne sprečava reakciju odbacivanja kornealnog alokalema [252].

Ovde smo takođe pokazali da imunoterapija prirodnim regulatornim T ćelijama, sama ili u kombinaciji sa malim dozama CsA ili rapamicina, nema značajan efekat na Foxp3 iRNK transkripciju u kalemu. Pretpostavljamo da prisustvo Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelija u odbačenim ali i providnim kalemovima u ranom periodu nakon transplantacije predstavlja fiziološki odgovor na postojeću inflamaciju u ovoj visoko rizičnoj kombinaciji miševa, obzirom da su svi kalemovi na kraju bili i odbačeni. Ovo je u skladu sa nedavnom hipotezom da ulazak Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelija predstavlja jedan mehanizam za stabilizaciju inflamacije u alograftu [176, 210], dok Haanstra [208] navodi da Foxp3 treba smatrati delom normalnom imunog odgovora tokom reakcije odbacivanja kalema.



### 5.3. ULOGA ALOANTIGEN SPECIFIČNIH Treg ĆELIJA U ODNOSU NA PRIRODNE Treg ĆELIJE U PREVENCIJI ODBACIVANJA KORNEALNOG ALOKALEMA

Imajući u vidu da CD25 i Foxp3 predstavljaju specifične markere koji omogućavaju detekciju i manipulaciju prirodnim Treg ćelijama, sve je više dokaza koji ukazuju da se populacija Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija može upotrebiti ne samo za prevenciju i terapiju autoimunih bolesti već i za indukciju transplantacione tolerancije [253]. Do sada je regulatorna uloga prirodnih i aloantigen specifičnih Treg ćelija u aloimunom odgovoru potvrđena *in vivo* u eksperimentalnim modelima sa limfopenijom ili imunosupresijom [254, 255]. Mi smo u ovoj studiji analizirali i poredili doprinos adoptivne ćelijske terapije primenom *in vitro* ekspanziranih aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija u odnosu na injekciju sveže izolovanih prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija u prevenciji reakcije odbacivanja kalema rožnjače u prethodno nemanipulisanoj visoko rizičnoj kombinaciji miševa.

Do sada je opisano nekoliko različitih pristupa za ekspanziju antigen specifičnih Treg ćelija [160, 256, 257]. Nedavno su, Oliveira i saradnici [171] pokazali da stimulacija ukupnih CD4<sup>+</sup> naivnih ćelija pomoću aloantigen prezentujućih ćelija u prisustvu *non-depleting* anti-CD4 antitela (YTS177) povlači selekciju populacije Treg ćelija koje ekspimiraju CD25, CD62L, CCR7 i Foxp3. Takođe, navedene Treg ćelije mogle su da spreče reakciju odbacivanja kožnog transplantata posredovanu CD45<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> ćelijama kada su ove ćelije zajedno aplikovane CBA.Rag-/- recipijentima [171].

Polazeći od već uspostavljenog *in vitro* protokola [171], mi smo ovde ispitivali da li jedna slična strategija može da se primeni za selekciju i ekspanziju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelija *in vitro* koje zadržavaju svoj regulatorni potencijal *in vivo*. U našoj studiji, aloantigen specifične regulatorne T ćelije (MLC<sup>pres</sup>) generisane su u mešovitoj limfocitnoj kulturi, sačinjenoj od prečišćenih CD4<sup>+</sup> naivnih ćelija i alogenih B limfocita, u prisustvu *non-depleting* anti-CD4 monoklonskih antitela. Ove T regulatorne ćelije mogle su da suprimiraju proliferaciju naivnih singenih T ćelija *in vitro*. Interesantno je da su i sveže izolovane prirodne Treg ćelije i aloantigen specifične Treg ćelije mogle da spreče maturaciju donorskih

dendritičnih ćelija a time i alostimulaciju T ćelija. Međutim, aloantigen specifične Treg ćelije bile su superiornije u odnosu na prirodne Treg obzirom da su mogle da spreče alostimulaciju posle LPS indukovane maturacije (navedeni podaci nisu prikazani u rezultatima). Približno 63% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija dobijenih u kulturisa sa anti-CD4 monoklonskim antitelima bilo je Foxp3<sup>+</sup> (MLC<sup>pres</sup>), suprotno kontrolnoj kulturi bez anti-CD4 mAt (MLC<sup>abs</sup>) u kojoj je procenat Foxp3<sup>+</sup> ćelija bio značajno niži i iznosio samo 10%.

Najznačajniji rezultat je da su ove MLC<sup>pres</sup> Treg ćelije proizvele dugotrajno prihvatanje BALB/C kornealnog kalema kod 37.5% C57BL/6 primaoca bez primene dodatne imunosupresivne terapije. Na suprot navedenom, transfer prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija proizveo je značajnu ali kratku prolongaciju opstanka kornealnog alokalema. Ovo je u skladu sa ranijim publikacijama u kojima se takođe navodi da su antigen specifične Treg ćelije bile potentnije u odnosu na poliklonalne prirodne Treg ćelije u indukciji transplantacione tolerancije na eksperimentalnim modelima [160, 258, 259].

Pokazano je da aktivacija regulatornih T ćelija može da se odvija na oba načina, direktnim i indirektnim putem, a njihova imunoregulatorna funkcija favorizovana je kod imunog odgovora na alograft koji se odvija indirektnim putem [260]. Akutna reakcija odbacivanja transplantata uglavnom se vezuje za direktnu prezentaciju antigena, dok se smatra da je hronična reakcija odbacivanja primarno posredovana T ćelijama specifičnim za indirektno prezentovane donorske antigene [261].

Nedavno je u jednoj studiji pokazano da regulatorne T ćelije specifične za direktno prezentovane donorske antigene sprečavaju samo akutnu reakciju odbacivanja, bez obzira na hematopoetski himerizam. Međutim, regulatorne ćelije koje su specifične za direktno i indirektno prezentovane aloantigene sprečavaju i akutnu i hroničnu reakciju odbacivanja kalema. [258].

Zanimljivi su rezultati Tsang-a i saradnika [259], koji navode skoro identičnu efikasnost Treg ćelija koje imaju direktnu alospecifičnost i TCR-transduktovanih regulatornih T ćelija koje poseduju obe alospecifičnosti u indukciji dugotrajnog opstanka potpuno MHC nepodudarnih srčanih graftova, mada su histološke analize ovih graftova pokazale značajnu superiornost TCR-transduktovanih regulatornih T limfocita. Golshayan [160] je pokazao da Treg ćelije koje su specifične za indirektno

prezentovane aloantigene I klase glavnog histokompatibilnog kompleksa mogu biti selektirane iz prirodnih Treg ćelija i ekspanzirane *in vitro* pomoću H2K<sup>b</sup> peptida kojim su pulsirane nezrele dendritične ćelije. Ove donor specifične Treg ćelije mogu da regulišu indirektni imuni odgovor efektorskih CD4<sup>+</sup> T ćelija *in vivo*, kod transplantacije kože na eksperimentalnom modelu sa umanjenim brojem T ćelija. Međutim, ekspanzirane Treg ćelije nisu mogle da inhibiraju direktan put aloimunog odgovora, tako da je C56BL/6 kožni transplantat odbačen istom kinetikom kao i kod kontrolnih miševa. Nedavno je takođe pokazano da linija Treg ćelija koja poseduje indirektnu alospecifičnost može indukovati trajni opstanak BALB/c srca transplantiranog B6 primaocima kada se kombinuje sa privremenim smanjenjem broja CD8<sup>+</sup> T ćelija i kratkotrajnom imunosupresijom pomoću rapamicina [161]. Zanimljivo je da u ovoj studiji nije uočena značajna razlika u opstanku kalema između Treg ćelija sa direktnom u odnosu na ćelije koje su imale indirektnu alospecifičnost.

Mi smo u našoj studiji pokazali da antigen specifične Treg ćelije usmerene ka kontroli direktnog puta prezentacije antigena mogu da spreče akutnu reakciju odbacivanja kornealnog alokalema u visoko rizičnoj kombinaciji miševa sa potpuno nepodudarnim glavnim i minornim histokompatibilnim antigenima. Ovo je u skladu sa konceptom da kod visoko rizične transplantacije rožnjače direktan put antigene prezentacije posredstvom donorskih kornealnih dendritičnih ćelija ima dominantnu ulogu u alosenzitizaciji [262]. Mi nismo uradili histološku analizu prihvaćenih kalemova 100 dana nakon keratoplastike, kojom bi isključili eventualnu inflamatornu reakciju niskog stepena i potencijalno hronično odbacivanje kalema, što je ranije opisano kod transplantacije solidnih organa [258]. Međutim, na istoj vremenskoj distance (dan 100.) nisu mogle da se detektuju IFN- $\gamma$  produkujuće aloreaktivne ćelije u slezini primaoca sa neodbačenim kalemom, koji su dobili injekciju od  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> ćelija.

Pokazali smo da transfer  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> ćelija dovodi trajnog opstanaka kalema kod nekih primaoca, dok injekcija od  $1 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> ćelija u kombinaciji sa kratkotrajnom aplikacijom rapamicina značajno produžava vreme opstanaka kornealnog alokalema (SVO:  $36.6 \pm 28.8$  dana). Ovo je u skladu sa nedavnom opservacijom Tsang-a i saradnika [161] da manje injekcija alloantigen specifičnih

Treg ćelija može biti nedovoljno za postizanje trajnog opstanka alokalema na modelu eksperimentalne transplantacije srca.

U našoj studiji adoptivni transfer prirodnih kao i aloantigen specifičnih Treg ćelija nije imao značajan efekat na CD3, IL-2 i IFN- $\gamma$  transkripciju u kalemu. Dodatna aplikacija rapamicina značajno je snizila akumulaciju navedenih markera u kalemu, redukovala nivo markera maturacije dendritičnih ćelija u slezini i time mogla da utiče na produženje opstanka kornealnog alokalema.

Takođe, dodatak rapamicina u kombinaciji sa transferom  $1 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> ćelija značajno je povećao prisustvo Foxp3<sup>+</sup>Treg ćelija u drenirajućem limfnom čvoru. Međutim ekspanzija CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drenirajućim i nedrenirajućim limfnim čvorovima nije bila statistički značajna kod primaoca koji su dobili  $5 \times 10^5$  aloantigen specifičnih Treg ćelija jedan dan pre planirane keratoplastike. Ovo je u skladu sa nedavnim zapažanjem na modelu keratoplastike kod miševa gde nije nađena razlika u prisustvu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u drenirajućem limfnom čvoru kao ni kalemu kod primaoca koji su prihvatili alograft u odnosu na primaoce kod koji je došlo do reakcije odbacivanja kalema u nisko rizičnoj kombinaciji miševa [176]. Međutim, uočen je značajan porast u ekspresiji Foxp3 iRNK u drenirajućem limfnom čvoru primaoca sa neodbačenim kalemom u odnosu na primaoce sa odbačenim alokalemovima. Takođe, ove Foxp3 Treg ćelije bile su efikasnije u prevencije reakcije odbacivanja rožnjače nakon eksperimenata sa adoptivnim transferom. Funkcionalni status Treg ćelija i nivo Foxp3 ekspresije direktno su povezani sa potencijalom regulatornih T ćelija u prevenciji reakcije odbacivanja kalema, kao što je nedavno pokazao Chauhan sa saradnicima [176].

Mehanizmi kojim terapija anti-CD4 antitelima indukuje selekciju regulatornih T ćelija *in vivo* nisu do kraja razjašnjeni. Poznato je da primena *non-depleting* anti-CD4 mAt (YTS 177) i donor specifične transfuzije kod naivnih miševa omogućava razvoj aloantigen reaktivnih CD4<sup>+</sup>Treg ćelija koje primaoca čine tolerantnim na naknadno transplantiran alokalem [117, 144, 263, 264]. Još uvek se ne zna tačno na koji način navedeni terapijski protokoli indukuju antigen-specifične Treg ćelije koje mogu da suprimiraju anti-donor T ćelije. Nedavno su Nagahama i saradnici [151] pokazali da kombinovana terapija sa anti-CD4 mAt i DST može da indukuje donor-specifičnu toleranciju na DBA/2 kožni kalem kod BALB/c miševa rekonstituisanih

sa nefrakcionisanim T ćelijama, ali ne i kod transfera T ćelija koje su lišene Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg populacije. Anti-CD4/DST omogućava *in vivo* ekspanziju antigen-specifičnih Treg ćelija, a inhibira ekspanziju antigen specifičnih efektorskih T ćelija (GITR<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> T ćelija). U skladu sa *in vivo* eksperimentima su i *in vitro* rezultati obzirom da su anti-CD4 antitela inhibirala ekspanziju GITR<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> T ćelija u mešanoj limfocitnoj reakciji. Takođe i kod imunog odgovara u potpunog MHC nepodudarnoj kombinaciji između BALB/c (H-2d) T ćelija i B6 (H-2b) dendritičnih ćelija, anti-CD4 omogućio je ekspanziju Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija, a inhibirao ekspanziju efektorskih T ćelija. Navedeni rezultati ukazuju da osetljivost na anti-CD4 predstavlja fundamentalnu razliku između prirodnih Treg i neregulatornih CD4<sup>+</sup> T ćelija.

Oliveira i saradnici [171] takođe su nedavno pokazali da anti-CD4 mAb u mešanoj limfocitnoj kulturi omogućavaju selektivnu ekspanziju inicijalnih prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija, ali i diferencijaciju alo-antigen specifičnih indukovanih regulatornih T ćelija. Mi smo u našoj studiji, koristeći sličnu strategiju, takođe potvrdili efikasnost anti-CD4 antitela u selekciji Treg ćelija koje su *in vivo* suprimirale reakciju odbacivanja kornealnog alokalema u visko-rizičnoj kombinaciji miševa.

Osnovni mehanizam kojim terapija anti-CD4 antitelima indukuje selekciju Treg ćelija *in vitro* nije sasvim poznat. CD4 je važan akcesorni i ko-stimulatorni molekul koji pojačava signal koji prima TCR kompleks i pomaže u aktivaciji T ćelija [172]. Blokada ove interakcije pomoću anti-CD4 antitela povećava prag aktivacije putem T ćelijskog receptora [173]. Pretpostavlja se da je primenom navedenog protokola T ćelijska aktivacija ciljano otežana i samo mali procenat ćelija podleže aktivaciji i proliferaciji (regulatorna populacija), dok ćelije koje ne prime nijedan signal konačno umiru apoptozom (ovo obuhvata efektorsku populaciju) [171].

Pored toga što su Foxp3 Treg prirodno u takozvanom „antigen-stimulisanom“ statusu već u timusu pre aktuelnog kontakta sa antigenom na periferiji, ove ćelije se lakše aktiviraju od naivnih i zbog visoke ekspresije T ćelijskih akcesornih molekula uključujući adhezione molekule kao što je LFA-1 [265]. Ustvari, Foxp3 ćelije fizički prevladavaju neregulatorne T ćelije u agregaciji oko antigen-prezentujućih ćelija *in vitro* pomoću LFA-1-zavisnog mehanizma i suprimiraju ushodnu

regulaciju ekspresije CD80/CD86 putem CTLA-4 zavisnog mehanizma i maturaciju antigen prezentujućih ćelija [266, 267]. Navedeni nalazi ukazuju da antigen stimulisane Treg ćelije mogu biti rezistentnije u odnosu na naivne T ćelije prema ko-stimulatornoj blokadi, pomoću na primer anti-CD4, omogućavajući predominantnu ekspanziju antigen-specifičnih Treg [268].

Naši rezultati mogu da doprinesu boljem razumevanju uloge prirodnih i antigen specifičnih Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija u prevenciji reakcije odbacivanja kornealnog alokalema u visoko-rizičnoj kombinaciji miševa. Takođe, ovde smo pokazali i terapijski potencijal *non-depleting* anti-CD4 antitela u selekciji i ekspanziji regulatornih T ćelija.

#### 5.4 KLINIČKA RELEVANTNOST REZULTATA

Genetski dobro okarakterisani modeli na životinjama, pre svega pacovima i miševima, već su obezbedili važne dokaze o imunološkoj privilegiji rožnjače i imunobiologiji reakcije odbacivanja nakon keratoplastike i time omogućili dalja istraživanja imunologije transplantiranog alokalema. Takođe, pokazalo se da su rezultati dobijeni na eksperimentalnom modelu često primenjivi i u humanoj medicini. Kao i kod ljudi, važne imunološke reakcije kod ovih životinja pod kontrolom su gena glavnog histokompatibilnog kompleksa. Glavni histokompatibilni kompleks lokalizovan je na 6. hromozomu kod ljudi i 17. hromozomu kod miševa. Kod ljudi, ovi geni nazvani su humani leukocitni antigeni ili HLA geni, a kod miševa su poznati kao H-2 geni. Zanimljivo je da je raspored ovih gena sličan kod ljudi i miševa. Kod obe vrste postoje po tri glavna gena I klase i to su HLA-A, HLA-B i HLA-C kod ljudi, i H2-K, H2-D i H2-L kod miševa. Svaki od ovih gena kodira  $\alpha$  lanac odgovarajućeg proteina I klase MHC molekula. Drugu subjedinicu molekula I MHC klase ( $\beta$ 2 mikroglobulin) kodiraju geni lokalizovani na 15. hromozomu kod ljudi i 2. hromozomu kod miševa. Region II klase MHC kompleksa obuhvata gene koji kodiraju  $\alpha$  i  $\beta$  lanac odgovarajućeg molekula II (MHC) klase i to su HLA-DR, HLA-DP i HLA-DQ kod ljudi, a H-2A i H-E kod miša [269].

Značaj HLA antigena za keratoplastiku već je potvrđen na eksperimentalnim modelima pod kontrolisanim uslovima [270, 16]. Distribucija ovih antigena u rožnjači

takođe je slična kod ljudi i miševa. Antigeni glavnog histokompatibilnog kompleksa I klase najviše su zastupljeni u epitelu, a značajno manje u stromi i endotelu. HLA antigeni II klase mogu se naći u kornealnom epitelu, pre svega u limbalnom regionu i stromi [271]. Međutim, ekspresija antigena povećava se kod odbacivanja kalema [271], usled hirurške intervencije i inflamacije. Langerhansove ćelije i makrofage imaju značajnu ulogu u humanoj i eksperimentalnoj keratoplastici na miševima.

Takođe, na eksperimentalnoj keratoplastici kod glodara pokazano je da kod određenih donor-primac kombinacija, minorni histokompatibilni (H) antigeni predstavljaju veću prepreku za opstanak kalema u odnosu na MHC aloantigene [272, 23]. Minorni H antigeni su peptidi koji potiču od polimorfnih proteina. Imunogenost H antigena nastaje usled njihove prezentacije na plazma membrani u kontekstu HLA molekula I i II klase, gde ih prepoznaju aloreaktivne HLA restriktivne T ćelija. Antigeni H-Y grupe eksprimirani su samo kod muškaraca i prisutni su u svim tkivima uključujući i rožnjaču. Obzirom da se epitopi H-Y antigena ispoljavaju u kontekstu HLA-A1, moguća je imunološka reakcija na ovaj kalem ako je primalac žena. Većina minornih H antigena kodirana je od strane autozomnih hromozoma i kod ljudi su uglavnom nepotpuno okarakterisani [269].

U kliničkoj praksi HLA tipizacija ne primenjuje se rutinski, mada su mnoge studije, pretežno u Evropi, pokazale značajnu korist za opstanak grafta kod HLA-A, HLA-B, i HLA-DR tipizacije [15, 16, 273]. Dugatrajan opstanak kalema poboljšalo bi se rutinskom HLA tipizacijom glavnih i selektiranih minornih histokompatibilnih antigena.

Sve ovo navedeno ukazuje da rezultati ove studije sprovedeni na animalnom modelu sa potpuno nepodudarnim glavnim i minornim histokompatibilnim antigenima mogu bazično biti primenjeni i na kliničke probleme posle perforativne keratoplastike.

Mogućnost eksperimentalnog testiranja preventivnih i terapijskih strategija u jednom visoko tkivno nepodudarnom sistemu sa konstantnim HLA disparitetom može biti od velikog kliničkog značaja. Animalni modeli su već korišćeni za testiranje novih oblika terapije kod keratoplastike. Studije na pacovima i miševima pogodne su za ovu vrstu istraživanja imajući u vidu već navedene prednosti ovih modela.

Rožnjača je privilegovana za transplantaciju kako u pogledu anatomskih karakteristika tako i zbog mogućnosti da se lekovi aplikuju direktno na transplantirano tkivo redukujući na taj način sistemske neželjene efekte. U visokorizičnim situacijama imunološka privilegija je narušena pa je rizik za gubitak grafta tokom godinu dana veći od 50% bez primene sistemske imunosupresije [3, 184]. Aktivacija recipijentnog imunog sistema na transplantat i klonalna ekspanzija aloreaktivnih T ćelija odvija se u limfoidnom tkivu. Ova hipoteza potvrđena je u eksperimentalnoj keratoplastici gde je pokazano da se odbacivanje kalema ne javlja kod primaoca sa prethodno odstranjenim sekundarnim limfoidnim organima [217]. Kako topikalni steroidi ne dostižu limfoidne organe a sistemski steroidi nisu dovoljno efikasni u supresiji klonalne ekspanzije T ćelija, neophodna je primena sistemske imunosupresivne terapije da bi se sačuvao providan kornealni alokalem.

Zbog nedostatka velikih komparativnih prospektivnih studija, protokoli koji se koriste u praksi bazirani su na individualnom kliničkom iskustvu, nekim eksperimentalnim dokazima i malim nekontrolisanim i/ili retrospektivnim kliničkim studijama.

Rapamicin i CsA, kao imunosupresivni agensi, nezavisno su ispitivani u eksperimentalnoj keratoplastici [192, 193]. Pozitivna klinička iskustva sa ciklosporinom A u prevenciji odbacivanja kornealnog kalema nakon visokorizične keratoplastike pokazana su u nekoliko kontrolisanih i nekontrolisanih kliničkih studija [3, 184, 274]. S druge strane, jedan broj autora nije potvrdio pozitivan efekat CsA na ishod visokorizične keratoplastike [275, 276, 277].

Sa pojavom novih potentnih imunosupresiva kao što su rapamicin i MMF, koji nemaju nefrotoksični potencijal inhibitora kalcineurina, pažnja je preusmerena na kombinovane imunomodulatorne protokole. Imunosupresivni potencijal može se povećati kombinacijom dva imunosupresiva, time se smanjuju toksični neželjeni efekti specifični za pojedinačno primenjene lekove. Pokazana je efikasnost kombinacije CsA i MMF-a nakon kliničke limbokeratoplastike [278]. Klinička efikasnost kombinovane primene CsA i rapamicina potvrđena je nakon transplantacije solidnih organa [279, 280].

Imajući u vidu prednosti eksperimentalne transplantacije na miševima za imunološka istraživanja, analizirali smo kombinovani efekat malih doza rapamicina i



ciklosporina A na opstanak kornealnog alokalema u visoko-rizičnoj kombinaciji miševa. Kombinovana terapija sa sinergističkim immunosupresivnim lekovima povećava efikasnost i istovremeno redukuje neželjene toksične efekte selektivnom primenom nižih doza. Ovo je posebno važno za pacijente sa visoko-rizičnom keratoplastikom obzirom da bolesnici nisu vitalno ugroženi, pa je precizna kalkulacija potencijalnog rizika i pozitivnog efekta sistemske immunosupresivne terapije veoma važna i treba je pažljivo sprovesti kod svakog pacijenta.

Mada immunosupresivna terapija smanjuje rizik od odbacivanja transplantata, ona može da ima i negativan uticaj na razvoj antigen-specifičnih Treg ćelija. Zbog toga postoji veliko interesovanje u pogledu efekta immunosupresivnih lekova na razvoj i funkciju Treg ćelija u eksperimentalnim i kliničkim studijama [93]. Kalcineurinski inhibitori (CNI), kao što je CsA, sprečavaju T-ćelijsku aktivaciju pa mogu da onemoguće indukciju tolerancije posredovanu Treg ćelijama. Immunosupresivni lekovi koji ne sprečavaju T ćelijsku aktivaciju, kao što je Rapam, bolji su izbor za indukciju tolerancije [4]. Takođe nakon transplantacije, nekoliko studija poredilo je pacijente koji su primali CNI sa onima koji su lečeni rapamicinom. U jednoj studiji, nakon transplantacije bubrega, kod pacijenata koji su primali CNI-e konstatovan je značajno niži procenat perifernih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T ćelija u poređenju sa pacijentima koji su tretirani rapamicinom [281]. Druga studija, navodi redukovan broj perifernih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija kod pacijenata sa stabilnim transplantatom jetre koji su lečeni visokim dozama CNI u poređenju sa niskim dozama CNI ili zdravim volonterima [282]. U funkcionalnom smislu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelije od pacijenata tretiranih rapamicinom suprimiraju direktan imuni odgovor, ali na žalost nisu poređene sa Treg ćelijama od pacijenata tretiranih CNI-ima [281]. Takođe, nedavno je publikovano da konverzija immunosupresivne terapije sa kombinacije takrolimus/MMF na rapamicin monoterapiju nakon transplantacije bubrega značajno povećava procenat i absolutni broj cirkulišućih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg, dok konverzija na takrolimus monoterapiju nije imala ovaj efekat [113]. Navedeni rezultati ukazuju na različito pomenje balansa između Treg i Tef ćelija pod uticajem CNI ili rapamicina [283]. Da li porast proporcije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>T ćelija kod pacijenata tretiranih rapamicinom doprinosi tolerogenijem imunom odgovoru prema graftu ostaje da se utvrdi.

Kako imunosupresivna terapija sa ciklosporinom A ili rapamicinom može imati značajan uticaj na razvoj i funkciju regulatornih T ćelija, naši rezultati mogu biti dodatna podrška savremenim strategijama u kliničkoj transplantaciji baziranim na pažljivoj selekciji imunosupresivnih lekova.

U transplantaciji, FOXP3<sup>+</sup> T ćelije imaju ulogu u supresiji aloreaktivnih T ćelija i u indukciji transplantacione tolerancije. U kliničkim studijama analizirana je FOXP3 ekspresija u uzorcima grafta i perifernoj krvi, ali klinički značaj varijacija u ekspresiji i frekvenciji ovih ćelija nije potpuno jasan. Takođe, za interpretaciju rezultata u transplantacionim uslovima neophodno je razumevanje efekata imunosupresivne terapije na FOXP3 ekspresiju kao i potpunije poznavanje imunobiologije ovih ćelija.

Kod akutne reakcije odbacivanja kalema nakon transplantacije bubrega i srca nađene su veće vrednosti iRNK nivoa u uzorcima biopsije u poređenju sa uzorcima bez histološke potvrde akutnog odbacivanja [284, 210]. Takođe, viši nivo FOXP3 ekspresija izgleda da je udružen sa reverzibilnom akutnom reakcijom i nižim stepenom propadanja grafta.

Pokazano je da pacijenti sa hroničnim odbacivanjem nakon transplantacije bubrega imaju manji broj perifernih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>T ćelija u odnosu na pacijente sa operativnom tolerancijom i stabilnom funkcijom grafta ili zdravu kontrolnu grupu. Analiza FOXP3 ekspresije pokazala je smanjen broj CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija sa normalnim regulatornim profilom, dok je kod pacijenata sa prihvaćenom graftom broj ovih ćelija bio sličan zdravim volonterima [285]. Slični rezultati konstatovani su kod pacijenata sa stabilnom transplantacijom jetre [286, 287]. Navedeni podaci ukazuju na moguću doprinos broja Treg ćelija na dugotrajan ishod grafta [285].

U poređenju sa Treg ćelijama kod miša, humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T ćelije nisu u potpunosti okarakterisane, a razumevanje njihove imunobiologije od ključnog je značaja pre početka kliničke aplikacije. Treg ćelije ispoljavaju intracelularni transkripcioni faktor FOXP3 [288] koji ima ključnu ulogu u generisanju i perifernom održavanju Treg ćelija kod glodara [258] i ljudi [289]. Međutim, postoje i neka ograničenja za primenu samo FOXP3 ekspresije za studiju Treg ćelija kod ljudi. Postoje dokazi koji ukazuju da se humani FOXP3 tranzitorno ispoljava u aktiviranim T ćelijama, nekada bez regulatornog fenotipa [287]. Takođe to je intracelularni protein pa se ne može koristiti za izolaciju Treg ćelija za funkcionalna ispitivanja.

Zbog malog broja Treg ćelija u perifernoj krvi, optimalna *ex vivo* ekspanzija sa očuvanjem određenih svojstva kao što su opstanak ćelija nakon infuzije, *in vivo* migracija ćelija do mesta aloreaktivnosti kao i aloantigen-specifična supresija od esencijalnog su značaja da bi ove ćelije mogle da se primene u humanoj medicini [290, 291]. Do sada se kultura sa anti-CD3 i anti CD28 mAt (obložene perle navedenim antitelima) pokazala kao najefikasnija metoda ekspanzije prirodnih Treg ćelija kod miševa i ljudi [292].

Kao i svaka terapija, klinička primena *ex-vivo* ekspanziranih Treg ćelija takođe je udružena sa potencijalnim rizicima. Postoji teorijski rizik da ove ćelije mogu *in vivo* da se transformišu u efektorske T ćelije, naročito ako se radi o infuziji antigen-specifičnih Treg ćelija [293, 294]. Takođe, pokazano je da su IL-6 [295] i IL-1 [296] potrebni za konverziju Treg ćelija u proinflamatorne efektorske ćelije kod miševa i ljudi. Ovo predstavlja ozbiljan rizik imajući u vidu inflamatorne signale udružene sa hirurškom traumom u toku same transplantacije.

Studije su pokazale da su antigen-specifične ćelije potentnije u odnosu na poliklonalne Treg ćelije [160, 258, 259]. Značajna prednost ovih ćelija je što se imunomodulatorna funkcija ostvaruje u limitiranim zonama, uključujući kalem i drenirajuće limfne čvorove [297], pa je na taj način izbegnuta potencijalna pansupresija. Mi smo takođe pokazali u našoj studiji da su antigen-specifične Treg ćelije bile značajno potentnije u prevenciji odbacivanja kornealnog alokalema u odnosu na sveže izolovane prirodne Treg ćelije. Međutim, poliklonalne ćelije u izvesnim transplantacionim uslovima imaju značaj zbog velike frekvencije aloreaktivnih prekursora, kao što je pokazano kod pacijenta koji su razvili GVHD (graft versus host disease) nakon transplantacije kostne srži [298].

Takođe, opisane su i kliničke strategije za ekspanziju antigen-specifičnih Treg ćelija koje poseduju indirektnu [299, 256] i/ili direktnu alospecifičnost [300]. Međutim, pre kliničke aplikacije *ex vivo* ekspanziranih Treg ćelija u transplantaciji tkiva i organa njihov potencijal i karakteristike moraju biti dodatno testirane na animalnim modelima.

Bolje poznavanje Treg ćelija i njihove uloge u eksperimentalnoj keratoplastici otvara nove perspektive za prevenciju odbacivanja kornealnog alokalema u kliničkoj transplantaciji.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U ovoj studiji analizirali smo efekat sistemske primene male doze rapamicina, u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa malom dozom CsA, u prevenciji odbacivanja kornealnog alokalema u visoko rizičnom eksperimentalnom modelu. Pokazali smo da rapamicin monoterapija umereno odlaže reakciju odbacivanja kalema, dok kombinovana terapija (Rapa+CsA) produžava opstanak kalema na statistički značajno višem nivou. Kombinovana imunomodulatorna terapija efikasno modulira iRNK ekspresiju inflamatornih i infiltracionih markera što je verovatno uticalo na odlaganje reakcije odbacivanja kornealnog alokalema. Dodatak male doze CsA nije ispoljio značajan supresivni efekat na Foxp3 iRNK ekspresiju u kalemu. Takođe, navedena kombinovana terapija sa malim dozama rapamicina i CsA očuvala je homeostazu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg ćelija u slezini.
2. Ovde smo pokazali da jedna injekcija od 5x10<sup>5</sup> sveže izolovanih prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatornih ćelija, kao i kombinacija adoptivnog transfera prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija sa malom dozom CsA ili rapamicina značajno produžava opstanak kornealnog alokalema u visoko rizičnoj kombinaciji donora i primaoca. Mala doza CsA nije ispoljila negativan efekat na terapijsku efikasnost prirodnih Treg ćelija, mada nije ni dodatno produžila opstanak kalema. S druge strane, dodatak rapamicina pokazao je tendenciju ka daljoj prolongaciji opstanka kalema. Takođe, primenom rapamicina nakon transfera prirodnih Treg ćelija značajno je redukovano DC-LAMP marker, specifičan za zrele dendritične ćelije lokalizovane u limfoidnom tkivu. Rapamicin je efikasnije inhibirao ekspresiju citokina u kalemu što može biti dodatni razlog za odlaganje reakcije odbacivanja. Nakon injekcije prirodnih Treg ćelija, samih ili u kombinaciji sa rapamicinom, značajno je povećano prisustvo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima. Dodatak male doze CsA nakon injekcije prirodnih Treg ćelija onemogućio je ekspanziju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija u drLN-ima. Međutim, sve terapijske strategije efikasno su inhibirale IFN- $\gamma$  produkujuće memorijske ćelije u slezini.

Kako imunosupresivna terapija sa CsA ili rapamicinom, može imati značajan uticaj na razvoj i funkciju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija, naši rezultati mogu biti dodatna podrška pažljivoj selekciji imunosupresivnih lekova u kliničkoj transplantaciji.

3. Mi smo ovde pokazali da *in vitro* stimulacija naivnih nefrakcionisanih CD4<sup>+</sup> ćelija u mešanoj limfocitnoj kulturi sa alogenim B limfocitima, u prisustvu *non-depleting* anti-CD4 mAt, povlači selekciju populacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg ćelija koje ekspimiraju Foxp3 u visokom procentu u poređenju sa kontrolnom grupom i ispoljavaju svoj regulatorni potencijal *in vivo*.

Najznačajniji rezultat je da je injekcija od  $5 \times 10^5$  aloantigen specifičnih Treg ćelija indukovala trajno prihvatanje BALB/C kornealnog kalema kod 37.5% C57BL/6 primaoca bez primene dodatne sistemske imunosupresivne terapije. Takođe, pokazali smo da su antigen specifične CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelije (MLC<sup>pres</sup>) usmerene ka kontroli direktnog puta prezentacije antigena efikasnije u prevenciji akutne reakcije odbacivanja kornealnog alokalema u poređenju sa injekcijom poliklonalnih prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelija. Sto dana nakon keratoplastike IFN- $\gamma$  produkujuće memorijske ćelije nisu mogle da se detektuju u slezini životinja koje su dobile samo  $5 \times 10^5$  MLC<sup>pres</sup> ćelija.

Pokazali smo da transfer  $1 \times 10^5$  aloantigen specifičnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ćelije (MLC<sup>pres</sup>) u kombinaciji sa kratkotrajnom aplikacijom rapamicina značajno odlaže akutnu reakciju odbacivanja kornealnog alokalema (SVO:  $36.6 \pm 28.8$  dana), ali nije dovoljan za postizanje trajnog opstanka kalema. Dodatna aplikacija rapamicina značajno je snizila akumulaciju inflamatornih markera u kalemu i redukovala nivo markera maturacije dendritičih ćelija u slezini, što je moglo da utiče na dodatnu prolongaciju opstanka kornealnog alokalema.

## 7. LITERATURA

1. Zirm EK. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg.* 1989 Jul-Aug;5(4):258-61.
2. Williams KA, Esterman AJ, Bartlett C, Holland H, Hornsby NB, Coster DJ. How effective is penetrating corneal transplantation? Factors influencing long-term outcome in multivariate analysis. *Transplantation.* 2006;81:896-901.
3. Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty: long-term results. *Eye (Lond).* 1995;9 (Pt 4):422-8.
4. The collaborative corneal transplantation studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol.* 1992 Oct;110(10):1392-403.
5. Arentsen JJ. Corneal transplant allograft reaction: possible predisposing factors. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1983;81:361-402.
6. Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, Stulting RD, Sugar A, Fink NE, Schwartz A. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology.* 1994 Sep;101(9):1536-47.
7. Williams KA, Coster DJ. The role of the limbus in corneal allograft rejection. *Eye (Lond).* 1989;3 (Pt 2):158-66.
8. Williams KA, Roder D, Esterman A, Muehlberg SM, Coster DJ. Factors predictive of corneal graft survival. Report from the Australian Corneal Graft Registry. *Ophthalmology.* 1992 Mar;99(3):403-14.
9. Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF, Coster DJ. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian Corneal Graft Register. *Eye (Lond).* 1995;9 (Pt 2):219-27.
10. Chan CM, Wong TY, Yeong SM, Lim TH, Tan DT. Penetrating keratoplasty in the Singapore National Eye Centre and donor cornea acquisition in the Singapore Eye Bank. *Ann Acad Med Singapore.* 1997 Jul;26(4):395-400.
11. Ing JJ, Ing HH, Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1998 Oct;105(10):1855-65.
12. Birnbaum F, Böhringer D, Sokolovska Y, Sundmacher R, Reinhard T. Immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil after penetrating high-risk keratoplasty: a retrospective study. *Transplantation.* 2005; 79:964-968

13. Sundmacher R. [Allograft rejection reactions after keratoplasty (author's transl)]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1977 Nov;171(5):705-22.
14. Varssano D, Russ V, Linhart Y, Lazar M. Air transportation of corneal tissue: experience with local compared to transatlantic donor corneas. *Cornea.* 2005 Aug;24(6):674-7.
15. Gore SM, Vail A, Bradley BA, Rogers CA, Easty DL, Armitage WJ. HLA-DR matching in corneal transplantation. Systematic review of published evidence. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Transplantation.* 1995 Nov 15;60(9):1033-9.
16. Sanfilippo F, MacQueen JM, Vaughn WK, Foulks GN. Reduced graft rejection with good HLA-A and B matching in high-risk corneal transplantation. *N Engl J Med.* 1986 Jul 3;315(1):29-35.
17. Völker-Dieben HJ, Kok van Alphen CC. [Histocompatibility testing of donors and receivers in keratoplasty (initial attempts with adapted tissue-typed transplants in bad risk cases)]. *Ber Zusammenkunft Dtsch Ophthalmol Ges.* 1978;(75):428-31.
18. Battaglia M, Roncarolo MG. Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006 Sep;5(3):157-65. Review
19. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 1948 Feb;29(1):58-69.
20. Streilein JW, Toews GB, Bergstresser PR. Corneal allografts fail to express Ia antigens. *Nature.* 1979 Nov 15;282(5736):326-7.
21. Wang HM, Kaplan HJ, Chan WC, Johnson M. The distribution and ontogeny of MHC antigens in murine ocular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987 Aug;28(8):1383-9.
22. Abi-Hanna D, Wakefield D, Watkins S. HLA antigens in ocular tissues. I. In vivo expression in human eyes. *Transplantation.* 1988 Mar;45(3):610-3.
23. Sonoda Y, Streilein JW. Orthotopic corneal transplantation in mice—evidence that the immunogenetic rules of rejection do not apply. *Transplantation.* 1992 Oct;54(4):694-704.
24. Joo CK, Pepose JS, Stuart PM. T-cell mediated responses in a murine model of orthotopic corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Jul;36(8):1530-40.
25. Nicholls SM, Bradley BB, Easty DL. Effect of mismatches for major histocompatibility complex and minor antigens on corneal graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991 Sep;32(10):2729-34.

26. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995 Nov 17; 270(5239):1189-92.
27. Kaplan HJ, Streilein JW. Immune response to immunization via the anterior chamber of the eye. I. F. lymphocyte-induced immune deviation. *J Immunol*. 1977 Mar; 118(3): 809-14.
28. Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol*. 2003 Nov;3(11):879-89.
29. Niederkorn JY. Immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Crit Rev Immunol*. 2002;22(1):13-46.
30. Streilein JW, Niederkorn JY. Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med*. 1981 May 1;153(5):1058-67.
31. Niederkorn JY, Mayhew E, He Y. Alloantigens introduced into the anterior chamber of the eye induce systemic suppression of delayed hypersensitivity to third-party alloantigens through "linked recognition". *Transplantation*. 1995 Aug 27;60(4):348-54.
32. Faunce DE, Sonoda KH, Stein-Streilein J. MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):313-21.
33. D'Orazio TJ, Niederkorn JY. Splenic B cells are required for tolerogenic antigen presentation in the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). *Immunology*. 1998 Sep;95(1):47-55.
34. Nakamura T, Sonoda KH, Faunce DE, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S, Stein-Streilein J. CD4<sup>+</sup> NKT cells, but not conventional CD4<sup>+</sup> T cells, are required to generate efferent CD8<sup>+</sup> T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J Immunol*. 2003 Aug 1;171(3):1266-71.
35. Skelsey ME, Mayhew E, Niederkorn JY. Splenic B cells act as antigen presenting cells for the induction of anterior chamber-associated immune deviation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Dec;44(12):5242-51.
36. Skelsey ME, Mayhew E, Niederkorn JY. CD25<sup>+</sup>, interleukin-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells are required for suppressor cell production and immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunology*. 2003;110:18-29.
37. Xu Y, Kapp JA. Gammadelta T cells in anterior chamber-induced tolerance in CD8(+) CTL responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Nov;43(11):3473-9.
38. Xu Y, Kapp JA. Gammadelta T cells are critical for the induction of anterior chamber-associated immune deviation. *Immunology*. 2001 Oct;104(2):142-8.
39. Skelsey ME, Mellon J, Niederkorn JY. Gamma delta T cells are needed for ocular immune privilege and corneal graft survival. *J Immunol*. 2001;166:4327-33.



40. Sonoda Y, Streilein JW. Impaired cell-mediated immunity in mice bearing healthy orthotopic corneal allografts. *J Immunol.* 1993;150:1727–34.
41. Plskova J, Duncan L, Holan V, Filipec M, Kraal G, Forrester JV. The immune response to corneal allograft requires a site-specific draining lymph node. *Transplantation.* 2002;73:210–15.
42. Sonoda KH, Taniguchi M, Stein-Streilein J. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *J Immunol.* 2002;168:2028–34.
43. Niederkorn JY, Mellon J. Anterior chamber-associated immune deviation promotes corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2700–7.
44. Cunnusamy K, Paunicka K, Reyes N, Yang W, Chen PW, Niederkorn JY. Two different regulatory T cell populations that promote corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Dec;51(12):6566-74.
45. Camelo S, Kezic J, McMenamin PG. Anterior chamber-associated immune deviation: a review of the anatomical evidence for the afferent arm of this unusual experimental model of ocular immune responses. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2005 Aug;33(4):426-32.
46. Khodadoust AA, Silverstein AM. Transplantation and rejection of individual cell layers of the cornea. *Invest Ophthalmol.* 1969 Apr;8(2):180-95.
47. Golubović S, Radmanović BZ. Increase of corneal graft survival by use of topically immunosuppressive agents in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1988; 226(3):288-90.
48. Golubović S. Azathioprine and cytarabine applied topically prolong corneal graft survival in rabbits. *Ophthalmic Res.* 1991;23(4):213-9.
49. Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985 Jan;26(1):23-30.
50. She SC, Steahly LP, Moticka EJ. A method for performing full-thickness, orthotopic, penetrating keratoplasty in the mouse. *Ophthalmic Surg.* 1990 Nov;21(11):781-5.
51. Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 2003 Aug; 74(2):172-8.
52. Yamagami S, Hamrah P, Miyamoto K, Miyazaki D, Dekaris I, Dawson T, Lu B, Gerard C, Dana MR. CCR5 chemokine receptor mediates recruitment of MHC class II-positive Langerhans cells in the mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Apr;46(4):1201-7.
53. Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Feb;44(2):581-9.

54. Huq S, Liu Y, Benichou G, Dana MR. Relevance of the direct pathway of sensitization in corneal transplantation is dictated by the graft bed microenvironment. *J Immunol.* 2004 Oct 1;173(7):4464-9.
55. Niederkorn JY. Effect of cytokine-induced migration of Langerhans cells on corneal allograft survival. *Eye (Lond).* 1995;9 (Pt 2):215-8.
56. Simon M, Fellner P, El-Shabrawi Y, Ardjomand N. Influence of donor storage time on corneal allograft survival. *Ophthalmology.* 2004 Aug;111(8):1534-8.
57. He YG, Niederkorn JY. Depletion of donor-derived Langerhans cells promotes corneal allograft survival. *Cornea.* 1996 Jan;15(1):82-9.
58. Hori J, Wang M, Miyashita M, Tanemoto K, Takahashi H, Takemori T, Okumura K, Yagita H, Azuma M. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177(9):5928-35.
59. Thiel MA, Steiger JU, O'Connell PJ, Lehnert AM, Coster DJ, Williams KA. Local or short-term systemic costimulatory molecule blockade prolongs rat corneal allograft survival. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2005 Apr;33(2):176-80.
60. Qian Y, Hamrah P, Boisgerault F, Yamagami S, Vora S, Benichou G, Dana MR. Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD154 (CD40L) antibody in high-risk corneal transplantation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 Dec;22(12):1217-25.
61. Ayliffe W, Alam Y, Bell EB, McLeod D, Hutchinson IV. Prolongation of rat corneal graft survival by treatment with anti-CD4 monoclonal antibody. *Br J Ophthalmol.* 1992 Oct;76(10):602-6.
62. He YG, Ross J, Niederkorn JY. Promotion of murine orthotopic corneal allograft survival by systemic administration of anti-CD4 monoclonal antibody. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991 Sep;32(10):2723-8.
63. Hegde S, Beauregard C, Mayhew E, Niederkorn JY. CD4(+) T-cell-mediated mechanisms of corneal allograft rejection: role of Fas-induced apoptosis. *Transplantation.* 2005 Jan 15;79(1):23-31.
64. Yamada J, Kurimoto I, Streilein JW. Role of CD4<sup>+</sup> T cells in immunobiology of orthotopic corneal transplants in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Oct;40(11):2614-21.
65. Hattori T, Usui Y, Okunuki Y, Sonoda Y, Usui M, Takada E, Mizuguchi J, Yagita H, Okumura K, Akiba H, Takeuchi M. Blockade of the OX40 ligand prolongs corneal allograft survival *Eur J Immunol.* 2007 Dec;37(12):3597-604

66. Pepose JS, Nestor MS, Gardner KM, Foos RY, Pettit TH. Composition of cellular infiltrates in rejected human corneal allografts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1985;222(3):128-33.
67. Torres PF, De Vos AF, van der Gaag R, Martins B, Kijlstra A. Cytokine mRNA expression during experimental corneal allograft rejection. *Exp Eye Res*. 1996 Oct;63(4):453-61.
68. Zhu S, Dekaris I, Duncker G, Dana MR. Early expression of proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha after corneal transplantation. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 Jun;19(6):661-9.
69. Goldberg MF, Ferguson TA, Pepose JS. Detection of cellular adhesion molecules in inflamed human corneas. *Ophthalmology*. 1994 Jan;101(1):161-8.
70. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
71. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996 Mar;17(3):138-46. Review.
72. Cunnusamy K, Chen PW, Niederkorn JY. IL-17 promotes immune privilege of corneal allografts. *J Immunol*. 2010 Oct 15;185(8):4651-8.
73. Hargrave SL, Hay C, Mellon J, Mayhew E, Niederkorn JY. Fate of MHC-matched corneal allografts in Th1-deficient hosts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1188-93.
74. Niederkorn JY, Chen PW, Mellon J, Stevens C, Mayhew E. Allergic airway hyperreactivity increases the risk for corneal allograft rejection. *Am J Transplant*. 2009 May;9(5):1017-26.
75. Niederkorn JY, Chen PW, Mellon J, Stevens C, Mayhew E. Allergic conjunctivitis exacerbates corneal allograft rejection by activating Th1 and Th2 alloimmune responses. *J Immunol*. 2010 Jun 1;184(11):6076-83.
76. Trocmé SD, Hallberg CK, Gill KS, Gleich GJ, Tyring SK, Brysk MM. Effects of eosinophil granule proteins on human corneal epithelial cell viability and morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Mar;38(3):593-9.
77. Beauregard C, Stevens C, Mayhew E, Niederkorn JY. Cutting edge: atopy promotes Th2 responses to alloantigens and increases the incidence and tempo of corneal allograft rejection. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):6577-81.
78. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32.

79. Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17<sup>+</sup> Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 2007 Jan 22;204(1):41-7.
80. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):345-52.
81. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6210-7.
82. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med*. 2002 Nov 18;196(10):1335-46.
83. Hall BM, Pearce NW, Gurley KE, Dorsch SE. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4<sup>+</sup> suppressor cell and its mechanisms of action. *J Exp Med*. 1990 Jan 1;171(1):141-57.
84. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Caton AJ. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):301-6.
85. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Pénit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol*. 1998 Apr;10(4):371-8.
86. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.
87. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
88. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):329-41.
89. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):331-7.
90. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007 Feb 15;445(7129):771-5.

91. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol.* 2007 Apr;8(4):359-68.
92. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
93. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):199-210.
94. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1142-51.
95. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science.* 1988 May 27;240(4856):1169-76.
96. Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor *Adv. Immunol.* 1998;70:1-81.
97. Guiducci C, Valzasina B, Dislich H, Colombo MP. CD40/CD40L interaction regulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2 *Eur. J. Immunol.* 2005;35:557-67
98. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2006 Sep;80(3):458-70.
99. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000 Apr;12(4):431-40.
100. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):303-10.
101. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002 Feb;3(2):135-42.
102. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance *Transpl Immunol.* 2007 Feb;17(2):120-9.

103. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):387-96.
104. Jiang S, Lechler RI. Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am J Transplant*. 2003 May;3(5):516-24.
105. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001 Sep 3;194(5):629-44.
106. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*. 2001 Dec;2(12):1126-32.
107. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, Contag CH, Negrin RS. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):390-9
108. Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:483-510.
109. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003;35:7-14
110. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*. 2003 Sep 15;17(18):2205-32.
111. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. 2006 Jul 28;126(2):375-87.
112. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5138-43.
113. Demirkiran A, Hendriks TK, Baan CC, van der Laan LJ. Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation*. 2008 Mar 27;85(6):783-9.
114. Bensing SJ, Walsh PT, Zhang J, Carroll M, Parsons R, Rathmell JC, Thompson CB, Burchill MA, Farrar MA, Turka LA. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5287-96.
115. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):305-10.

116. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, et al. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T cells. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(9):537-45.
117. Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol.* 2001;166:3789-96.
118. Sánchez-Fueyo A, Weber M, Domenig C, Strom TB, Zheng XX. Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *J Immunol.* 2002;168:2274-81.
119. Jiang S, Lechler RI. Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am J Transplant.* 2003 May;3(5):516-24.
120. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:535-62.
121. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
122. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:207-14.
123. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suciuc-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002 Mar;3(3):237-43.
124. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000 Jul;6(7):782-9.
125. Lechler R, Chai JG, Marelli-Berg F, Lombardi G. T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 May 29;356(1409):625-37.
126. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000 Jun;30(6):1538-43.
127. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H. "Infectious" transplantation tolerance. *Science.* 1993 Feb 12;259(5097):974-7.
128. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med.* 2002 Jul 15;196(2):255-60.

129. Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:301-13.
130. Onodera K, Hancock WW, Graser E, Volk HD, Lehmann M, Chandraker A, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW. Th2-type cytokines in the "infectious" tolerance pathway. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):1290-1.
131. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med.* 2002 Jul 15;196(2):247-53. Erratum in: *J Exp Med* 2002 Aug 19;196(4):559. *J Exp Med* 2002 Sep 16;196(6):867.
132. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010 Jan;11(1):7-13. Epub 2009 Dec 17.
133. Zhang H, Chua KS, Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA, Long LM, Bernstein D, Hill BJ, Douek DC, Berzofsky JA, Carter CS, Read EJ, Helman LJ, Mackall CL. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med.* 2005 Nov;11(11):1238-43.
134. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood.* 2009 Oct 29;114(18):3727-35. Epub 2009 Jul 29. Review.
135. Spoerl S, Li XC. Regulatory T cells and the quest for transplant tolerance. *Discov Med.* 2011 Jan;11(56):25-34.
136. Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, Killeen N, Ishii N, Li XC. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2501-10.
137. You S, Leforban B, Garcia C, Bach JF, Bluestone JA, Chatenoud L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 10;104(15):6335-40. Epub 2007 Mar 26.
138. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006 Feb;24(2):179-89.
139. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9):5317-26.
140. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002 Aug;3(8):756-63.



141. Taams LS, Vukmanovic-Stejic M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ, Ebeling SB, Lombardi G, Rustin MH, Bijlsma JW, Lafeber FP, Salmon M, Akbar AN. Antigen-specific T cell suppression by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2002 Jun;32(6):1621-30.
142. Karim M, Bushell AR, Wood KJ. Regulatory T cells in transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2002 Oct;14(5):584-91.
143. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today.* 1998 Sep;19(9):395-404.
144. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1080-6.
145. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, and Waldmann H. Both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J. Immunol.* 2002; 168:5558.
146. Nagahama K, Nishimura E, Sakaguchi S. Induction of tolerance by adoptive transfer of Treg cells. *Methods Mol Biol.* 2007;380:431-42.
147. Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004 Aug;16(8):1189-201.
148. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:18-32.
149. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J. Exp. Med.* 2001;193:1311.
150. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):1945-53.
151. Nagahama K, Fehervari Z, Oida T, Yamaguchi T, Ogawa O, Sakaguchi S. Differential control of allo-antigen-specific regulatory T cells and effector T cells by anti-CD4 and other agents in establishing transplantation tolerance. *Int Immunol.* 2009 Apr;21(4):379-91.

152. Jarvinen LZ, Blazar BR, Adeyi OA, Strom TB, Noelle RJ. CD154 on the surface of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance. *Transplantation* 2003;76:1375.
153. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743.
154. Oluwole OO, DePaz HA, Adeyeri A, Jin MX, Hardy MA, Oluwole SF. Role of CD41CD251 regulatory T cells from naive host thymus in the induction of acquired transplant tolerance by immunization with allo-major histocompatibility complex peptide. *Transplantation*. 2003 Apr 27;75(8):1136-42.
155. Bushell A, Karim M, Kingsley CI, Wood KJ. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation*. 2003 Aug 15;76(3):449-55.
156. Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. Alloantigen-induced CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4<sup>+</sup> precursors in a thymus-independent process. *J Immunol*. 2004 Jan 15;172(2):923-8.
157. Xia G, He J, Zhang Z, Leventhal J. Targeting Acute Allograft Rejection by Immunotherapy With Ex Vivo-Expanded Natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells *Transplantation*; 2006;82: 1749–55.
158. Jiang S, Golshayan D, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. In vitro expanded alloantigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell treatment for the induction of donor-specific transplantation tolerance. *Int Immunopharmacol*. 2006 Dec 20;6(13-14):1879-82.
159. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):352-8.
160. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 2007;109:827–35.
161. Tsang JY, Tanriver Y, Jiang S, Leung E, Ratnasothy K, Lombardi G, Lechler R. Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. *Transpl Immunol*. 2009 Sep;21(4):203-9.
162. Pacholczyk R, Kraj P, Ignatowicz L. Peptide specificity of thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol*. 2002;168:613–20.

163. Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Immunol.* 2002;168:1644-8.
164. Blazar BR, Taylor PA, Noelle RJ, Vallera DA. CD4(+) T cells tolerized ex vivo to host alloantigen by anti-CD40 ligand (CD40L:CD154) antibody lose their graft-versus-host disease lethality capacity but retain nominal antigen responses. *J. Clin. Invest.* 1998;102:473-82.
165. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994;265:1237-40.
166. Chai JG, Bartok I, Chandler P, Vendetti S, Antoniou A, Dyson J, Lechler R. Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:686-92.
167. Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J. Immunol.* 2004;172:5900-7.
168. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1985;161:72-87.
169. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H. Induction of foxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol.* 2004;172:6003-10.
170. Zheng SG, Meng L, Wang JH, Watanabe M, Barr ML, Cramer DV, Gray JD, Horwitz DA. Transfer of regulatory T cells generated ex vivo modifies graft rejection through induction of tolerogenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the recipient. *Int Immunol.* 2006 Feb;18(2):279-89.
171. Oliveira V, Sawitzki B, Chapman S, Appelt C, Gebuhr I, Wieckiewicz J, Long E, Wood KJ. Anti-CD4-mediated selection of Treg in vitro - in vitro suppression does not predict in vivo capacity to prevent graft rejection. *Eur J Immunol.* 2008 Jun;38(6):1677-88.
172. Davis SJ, Ikemizu S, Evans EJ, Fugger L, Bakker TR, van der Merwe PA. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat. Immunol.* 2003;4:217-24.
173. Konig R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr. Opin. Immunol.* 2002;14:75-83.

174. Mannie MD, Rosser JM, White GA. Autologous rat myelin basic protein is a partial agonist that is converted into a full antagonist upon blockade of CD4. Evidence for the integration of efficacious and nonefficacious signals during T cell antigen recognition. *J. Immunol.* 1995;154:2642-54.
175. Sawitzki B, Lehmann M, Vogt K, Risch K, Brock J, Kupiec-Weglinski JW, Volk HD. Bag-1 up-regulation in anti-CD4 mAb treated allo-activated T cells confers resistance to apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 2002;32:800-9.
176. Chauhan SK, Saban DR, Lee HK, Dana R. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol.* 2009;182:148-53.
177. Hori J, Taniguchi H, Wang M, Oshima M, Azuma M. GITR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells and immune privilege of corneal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Dec;51(12):6556-65.
178. Zhang EP, Schröder S, Hoffmann F. Orthotopic corneal transplantation in the mouse-a new surgical technique with minimal endothelial cell loss. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996;234:714-9.
179. Boisjoly HM, Tourigny R, Bazin R, Laughrea PA, Dubé I, Chamberland G, Bernier J, Roy R. Risk factors of corneal graft failure. *Ophthalmology.* 1993 Nov;100(11):1728-35.
180. Völker-Dieben HJ, D'Amato J, Kok-van Alphen CC. Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1987 Feb;15(1):11-8.
181. Maumenee AE. The influence of donor-recipient sensitization on corneal grafts. *Am J Ophthalmol.* 1951 May;34(5:2):142-52.
182. Price MO, Thompson RW Jr, Price FW Jr. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Arch Ophthalmol.* 2003 Aug;121(8):1087-92.
183. Vail A, Gore SM, Bradley BA, Easty DL, Rogers CA. Corneal graft survival and visual outcome. A multicenter Study. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Ophthalmology.* 1994 Jan;101(1):120-7.
184. Reinhard T, Sundmacher R, Godehardt E, Heering P. [Preventive systemic cyclosporin A after keratoplasty at increased risk for immune reactions as the only elevated risk factor]. *Ophthalmologie.* 1997 Jul;94(7):496-500.
185. van Maurik A, Herber M, Wood KJ, Jones ND. Cutting edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8<sup>+</sup> T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5401-4.
186. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Strom TB. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol Rev.* 2003;196:75-84

187. Nomura M, Plain KM, Verma N, et al. The cellular basis of cardiac allograft rejection. IX. Ratio of naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells/ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells determines rejection or tolerance. *Transpl Immunol.* 2006;15:311.
188. Fucs R, Jesus JT, Souza PH Jr, et al. Frequency of natural regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes determines the outcome of tolerance across fully mismatched MHC barrier through linked recognition of self and allogeneic stimuli. *J Immunol.* 2006;176:2324.
189. Coster DJ, Williams KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol.* 2005;140:1112-22.
190. Price FW, Whitson WE, Marks RG. Graft survival in four common groups of patients undergoing penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1991;98:322-8.
191. Scherer MN, Banas B, Mantouvalou K, Schnitzbauer A, Obed A, Krämer BK, Schlitt HJ. Current concepts and perspectives of immunosuppression in organ transplantation. *Langenbecks Arch Surg.* 2007;392:511-23.
192. Zhang EP, Schulte F, Bulfone-Paus S, Hoffmann F. The effect of corticosteroid and cyclosporin A on murine corneal allograft rejection. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2000;238:525-30.
193. Reis A, Megahed M, Reinhard T, Braunstein C, Godehardt E, Sundmacher R. RAD, a new immunosuppressive macrolide in murine corneal transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239:689-92.
194. Thompson P, Xu D, Brunette I, Chen H. Combined effect of rapamycin and cyclosporine in prevention of rat corneal allograft rejection. *Transplant Proc.* 1998;30:1033-5.
195. Claerhout I, Beele H, Verstraete A, Van den Broecke C, Kestelyn. The effect of duration and timing of systemic cyclosporine therapy on corneal allograft survival in a rat model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239:152-7
196. Brook NR, Waller JR, Bicknell GR, Nicholson ML. Cyclosporine and rapamycin act in a synergistic and dose-dependent manner in a model of immunosuppressant-induced kidney damage. *Transplant P.* 2005;37:837-8
197. Niederkorn JY. Immune mechanisms of corneal allograft rejection. *Curr Eye Res.* 2007;32:1005-16.
198. Hargrave S, Chu Y, Mendelblatt D, Mayhew E, Niederkorn J. Preliminary findings in corneal allograft rejection in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2003;135:452-60.
199. Chong EM, Dana MR. Graft failure IV. Immunologic mechanisms of corneal transplant rejection. *Int Ophthalmol.* 2008;28:209-22.

200. Niederkorn JY, Stevens C, Mellon J, Mayhew E. Differential roles of CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>-</sup> T lymphocytes in corneal allograft rejection in 'high-risk' hosts. *Am J Transplant.* 2006;6:705-13.
201. Sonoda Y, Sano Y, Ksander B, Streilein JW. Characterization of cell-mediated immune responses elicited by orthotopic corneal allografts in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:427-34.
202. Gong N, Pleyer U, Yang J, Vogt K, Hill M, Anegon I, Volk HD, Ritter T. Influence of local and systemic CTLA4Ig gene transfer on corneal allograft survival. *J Gene Med.* 2006;8:459-67.
203. Pleyer U, Bertelmann E, Rieck P, Hartmann C, Volk HD, Ritter T. Survival of corneal allografts following adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2000;238:531-6.
204. Qu Y, Zhang B, Zhao L, Liu G, Ma H, Rao E, Zeng C, Zhao Y. The effect of immunosuppressive drug rapamycin on regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T cells in mice. *Transpl Immunol.* 2007;17:153-61.
205. Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation.* 2006; 82:1484-92.
206. Kawai M, Kitake H, Mathieu C, Waer M, Pirenne J. Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporin A on the development of regulatory T cells in vivo. *Transplantation.* 2005;79:1073-7.
207. Wang S, Jiang J, Guan Q, Lan Z, Wang H, Nguan CY, Jevnikar AM, Du C. Reduction of Foxp3-expressing regulatory T cell infiltrates during the progression of renal allograft rejection in a mouse model. *Transpl Immunol.* 2008;19:93-102.
208. Haanstra KG, Wubben JA, Korevaar SS, Kondova I, Baan CC, Jonker M. Expression patterns of regulatory T-cell markers in accepted and rejected nonhuman primate kidney allografts. *Am J Transplant.* 2007;7:2236-46.
209. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med.* 2002;195:1641-6.
210. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, Mueller TF, Halloran PF. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant.* 2008;8:1423-33.

211. Ochando JC, Yopp AC, Yang Y, Garin A, Li Y, Boros P, Llodra J, Ding Y, Lira SA, Krieger NR, Bromberg JS. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;174:6993-7005.
212. Schneider MA, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med.* 2007;204:735-45.
213. Niederkorn JY. The immune privilege of corneal allografts. *Transplantation.* 1999;67:1503-8.
214. Streilein JW. Ocular immune privilege and the Faustian dilemma. The Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:1940-50.
215. Streilein JW, Niederkorn JY. Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med.* 1981;153:1058-67.
216. Plsková J, Duncan L, Holán V, Filipec M, Kraal G, Forrester JV. The immune response to corneal allograft requires a site-specific draining lymph node. *Transplantation.* 2002;73:210-5.
217. Yamagami S, Dana MR. The critical role of lymph nodes in corneal alloimmunization and graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1293-8.
218. Wells A, Li X, Strom T, & Turka L. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2001;B 356:617-23.
219. Wood KJ, Jones N, Bushell A, Morris PJ. Alloantigen-induced specific immunological unresponsiveness. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2001;B 356:665-80.
220. Ikemoto T, Tashiro S, Yasutomo K, et al. Donor-specific tolerance induced by simultaneous allogeneic islet transplantation with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells into hepatic parenchyma in mice. *J Med Invest.* 2004;51:178.
221. Hamano K, Rawsthorne MA, Bushell AR, Morris PJ, Wood KJ. Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen in vivo in anti-CD4 treated recipients. *Transplantation.* 1996 Sep 27;62(6):856-60.
222. Karim M, Steger U, Bushell AR, Wood KJ. The role of the graft in establishing tolerance. *Front Biosci.* 2002 May 1;7:e129-54.
223. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3493-9.
224. Dai Z, Li Q, Wang Y, Gao G, Diggs LS, Tellides G, Lakkis FG. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress allograft rejection mediated by memory CD8<sup>+</sup> T cells via a CD30-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2004 Jan;113(2):310-7.

225. Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med.* 2005 Jun 20;201(12):1925-35.
226. Lee MK 4th, Moore DJ, Jarrett BP, Lian MM, Deng S, Huang X, Markmann JW, Chiaccio M, Barker CF, Caton AJ, Markmann JF. Promotion of allograft survival by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: evidence for in vivo inhibition of effector cell proliferation. *J Immunol.* 2004 Jun 1;172(11):6539-44.
227. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 2000;164:183.
228. Klein L, Khazaie K, von Boehmer H. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8886-91.
229. Hayashi Y, Tsukumo S, Shiota H, Kishihara K, Yasutomo K. Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5240-8.
230. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes. *Blood.* 2004 Jun 1;103(11):4216-21.
231. Karim M, Feng G, Wood KJ, Bushell AR. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood.* 2005 Jun 15;105(12):4871-7.
232. Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity*2001;14:407.
233. Li YX, Li C, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.* 1999;5:1298.
234. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nunez G., Tang A, Sayegh MH, Hancock WW, et al. Requirement for T cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat. Med.* 1999;5:1303.
235. Dai Z, Konieczny BT, Baddoura FK, Lakkis FG. Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice. *J. Immunol.* 1998;161:1659.



236. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J. Immunol.* 2001;166:973.
237. Lim DG, Koo SK, Park YH, Kim Y, Kim HM, Park CS, Kim SC, Han DJ. Impact of immunosuppressants on the therapeutic efficacy of in vitro-expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in allotransplantation. *Transplantation.* 2010 Apr 27;89(8):928-36.
238. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):351-8.
239. Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, Morelli AE, Logar AJ, Gessner A, Thomson AW. Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood.* 2003 Jun 1;101(11):4457-63.
240. Turnquist HR, Sumpter TL, Tsung A, Zahorchak AF, Nakao A, Nau GJ, Liew FY, Geller DA, Thomson AW. IL-1beta-driven ST2L expression promotes maturation resistance in rapamycin-conditioned dendritic cells. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):62-7.
241. Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):228-36.
242. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol.* 2007 Jun 1;178(11):7018-31.
243. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev.* 1997 Apr;156:25-37.
244. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenaabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Aït-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity.* 1998 Sep;9(3):325-36.
245. Fu S, Yopp AC, Mao X, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62<sup>+</sup> T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am J Transplant.* 2004;4:65.
246. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000 Jun;30(6):1538-43.

247. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008 May;124(1):13-22.
248. Kang J, Huddleston SJ, Fraser JM, Khoruts A. De novo induction of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo following systemic antigen administration accompanied by blockade of mTOR. *J Leukoc Biol*. 2008 May; 83(5):1230-9.
249. Basu S, Golovina T, Mikheeva T, June CH, Riley JL. Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5794-8.
250. Golshayan D, Buhler L, Lechler RI, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. *Transpl Int*. 2007 Jan;20(1):12-24.
251. Kopf H, de la Rosa GM, Howard OM, Chen X. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells. *Int Immunopharmacol*. 2007 Dec 15;7(13):1819-24.
252. Chen H, Wang W, Xie H, Xu X, Wu J, Jiang Z, Zhang M, Zhou L, Zheng S. A pathogenic role of IL-17 at the early stage of corneal allograft rejection. *Transpl Immunol*. 2009 Jul;21(3):155-61.
253. Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
254. Graca L, Le Moine A, Cobbold SP, Waldmann H. Dominant transplantation tolerance. *Opinion. Curr Opin Immunol*. 2003 Oct;15(5):499-506.
255. Graca L, Le Moine A, Lin CY, Fairchild PJ, Cobbold SP, Waldmann H. Donor-specific transplantation tolerance: the paradoxical behavior of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jul 6;101(27):10122-6.
256. Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells ex vivo. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2180-6.
257. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1467-77.
258. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes. *Nat Med*. 2008 Jan;14(1):88-92.
259. Tsang JY, Tanriver Y, Jiang S, Xue SA, Ratnasothy K, Chen D, Stauss HJ, Bucy RP, Lombardi G, Lechler R. Conferring indirect allospecificity on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3619-28.

260. Sánchez-Fueyo A, Domenig CM, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX, Strom TB. Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell function in transplantation. *Transpl Int*. 2007 Jun;20(6):534-41.
261. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat Med*. 2005 Jun;11(6):605-13.
262. Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, Taylor AW, Dana MR. Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts. *J Exp Med*. 2002 Jan 21;195(2):259-68.
263. Niimi M, Ikeda Y, Shirasugi N, Shatari T, Takami H, Kodaira S, Matsumoto K, Hamano K, Esato K, Hara M, Wood KJ. Oral delivery of alloantigen combined with non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody induces indefinite survival of cardiac allografts and generates CD4<sup>(+)</sup> regulatory T cells. *Transplant Proc*. 2000 Nov;32(7):2035.
264. Saitovitch D, Bushell A, Mabbs DW, Morris PJ, Wood KJ. Kinetics of induction of transplantation tolerance with a nondepleting anti-Cd4 monoclonal antibody and donor-specific transfusion before transplantation. A critical period of time is required for development of immunological unresponsiveness. *Transplantation*. 1996 Jun 15;61(11):1642-7.
265. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol*. 1998;10:1969.
266. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory t cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;29:10113.
267. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science*. 2008;322:271.
268. Quezada SA, Bennett K, Blazar BR, Rudensky AY, Sakaguchi S, Noelle RJ. Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J. Immunol*. 2005;175:771.
269. Murphy K, Travers P, Walport P. Antigen presentation to T lymphocytes. In: Janeway's immunology, chap. 5. Garland Science, Taylor & Francis group. New York and London, 2008;181-217.
270. Pleyer U, Weidle EG, Thiel HJ. The use of cyclosporine in high-risk keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1989 Oct 15;108(4):467-9.

271. Pepose JS, Gardner KM, Nestor MS, Foos RY, Pettit TH. Detection of HLA class I and II antigens in rejected human corneal allografts. *Ophthalmology*. 1985 Nov; 92(11):1480-4.
272. Sano Y, Ksander BR, Streilein JW. Minor H. Rather than MHC, alloantigens offer the greater barrier to successful orthotopic corneal transplantation in mice. *Transpl Immunol*. 1996 Mar;4(1):53-6.
273. Völker-Dieben HJ, Claas FH, Schreuder GM, Schipper RF, Pels E, Persijn GG, Smits J, D'Amaro J. Beneficial effect of HLA-DR matching on the survival of corneal allografts. *Transplantation*. 2000 Aug 27;70(4):640-8.
274. Reinhard T, Möller M, Sundmacher R. Penetrating keratoplasty in patients with atopic dermatitis with and without systemic cyclosporin A. *Cornea*. 1999 Nov;18(6):645-51.
275. Poon AC, Forbes JE, Dart JK, Subramaniam S, Bunce C, Madison P, Ficker LA, Tuft SJ, Gartry DS, Buckley RJ. Systemic cyclosporin A in high-risk penetrating keratoplasties: a case-control study. *Br J Ophthalmol*. 2001;85:1464-9.
276. Inoue, Kimura C, Amano S, Sato T, Fujita N, Kagaya F, Kaji Y, Tsuru T, Araie M. Long-term outcome of systemic cyclosporine treatment following penetrating keratoplasty. *Jpn J Ophthalmol*. 2001;45:378-82.
277. Rumelt S, Bersudsky V, Blum-Hareuveni T, Rehany U. Systemic cyclosporin A in high failure risk, repeated corneal transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:988-92.
278. Reinhard T, Kontopoulos T, Wernet P, Enczmann J, Sundmacher R. Long-term results of homologous penetrating limbokeratoplasty in total limbal stem cell insufficiency after chemical/thermal burns. *Ophthalmologie*. 2004 Jul;101(7):682-7.
279. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet*. 2000 Jul 15;356(9225):194-202.
280. MacDonald AS. RAPAMUNE Global Study Group. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation*. 2001 Jan 27;71(2):271-80.
281. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gómez-Alamillo C, Merino R, Benito MJ, Cacho E, Rodrigo E, Palomar R, López-Hoyos M, Arias M. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2006 Aug 27;82(4):550-7.

282. San Segundo D, Fábrega E, López-Hoyos M, Pons F. Reduced numbers of blood natural regulatory T cells in stable liver transplant recipients with high levels of calcineurin inhibitors. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2290-2.
283. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, Aiello S, Cassis L, Gotti E, Gaspari F, Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Mar;18(3):1007-18.
284. Dijke IE, Caliskan K, Korevaar SS, Balk AH, Zondervan PE, Maat AP, et al. Acute rejection is associated with high FOXP3 mRNA expression levels in the graft, but not in the peripheral blood, of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26(2):S72.
285. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hi CD4+ T cells/FoxP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation.* 2006;81(3):398-407.
286. Koshiba T, Li Y, Takemura M, Wu Y, Sakaguchi S, Minato N, et al. Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. *Transpl Immunol.* 2007;17(2):94-7.
287. Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation.* 2008;86(12):1837-1843
288. Toso C, Edgar R, Pawlick R, Emamaullee J, Merani S, Dinyari P, et al. Effect of different induction strategies on effector, regulatory and memory lymphocyte subpopulations in clinical islet transplantation. *Transpl Int.* 2009;22(2):182-91.
289. Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, Steinman RM. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunol Rev.* 2006;212:314-29.
290. Safinia N, Sagoo P, Lechler R, Lombardi G. Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010 Aug;15(4):427-34.
291. Boros P, Bromberg JS. Human FOXP3+ regulatory T cells in transplantation. *Am J Transplant.* 2009 Aug;9(8):1719-24.
292. Godfrey WR, Ge YG, Spoden DJ, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB. In vitro-expanded human CD4+CD25+ T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood.* 2004 Jul 15;104(2):453-61.

293. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3<sup>+</sup> T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 10;106(6):1903-8.
294. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):576-87.
295. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):44-56.
296. Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, Ayyoub M. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol*. 2009 May;131(2):298-307.
297. Dijke IE, Weimar W, Baan CC. Regulatory T cells after organ transplantation: where does their action take place? *Hum Immunol*. 2008 Jul;69(7):389-98.
298. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J, Hellmann A. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>regulatory cells. *Clin Immunol*. 2009 Oct;133(1):22-6.
299. Jiang S, Tsang J, Game DS, Stevenson S, Lombardi G, Lechler RI. Generation and expansion of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation*. 2006 Dec 27;82(12):1738-43.
300. Peters JH, Hilbrands LB, Koenen HJ, Joosten I. Ex vivo generation of human alloantigen-specific regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells for immunotherapy. *PLoS One*. 2008 May 21;3(5):e2233.

## ***Spisak skraćenica***

ACAID	<i>Antherior chamber associated immune deviation</i>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
CCL19,	<i>Hemokin (C-C) ligand 19</i>
CNI	<i>Calcineurin inhibitor, kalcineurinski inhibitor</i>
CsA	<i>Ciklosporin A</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
DC-LAMP	<i>Dendritic cell - lysosome-associated membrane protein</i>
DST	<i>Donor specificna transfuzija</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein</i>
GIT	<i>Gastrointestinalni trakt</i>
GITR	<i>Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor – protein</i>
GVHD	<i>Graft versus host disease</i>
HLA	<i>Humani leukocitni antigen</i>
i.p.	<i>intraperitonealno</i>
i.v.	<i>intravenski</i>
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule 1,</i>
IF- $\gamma$	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IL	<i>Interleukin</i>
IPEX	<i>Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked</i>
iTreg	<i>Indukovane T regulatorne ćelije</i>
JAK/STAT	<i>Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function associated antigen</i>
LPS	<i>Lipopolisaharid</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex, Glavni histokompatibilni kompleks</i>
MLC	<i>Mixed lymphocyte culture, mešana limfocitna kultura</i>
MMF	<i>Mikofenolat-mofetil</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
nTreg	<i>natural Treg, prirodne Treg</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline, puferovani fiziološki rastvor</i>

PI3K	<i>Fosfatidil-inozitol-3-kinaza</i>
Rapa	<i>Rapamicin</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	<i>Real time- polymerase chain reaction</i>
TCR	<i>T-ćelijski receptor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math> , transformišući faktor rasta</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math>, Faktor nrkroze tumora <math>\alpha</math></i>
Treg	<i>T regulatorne ćelije</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>



## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Svetlana Stanojlović rođena je 23. 05.1968. godine u Bijeljini.

Medicinski fakultet u Beogradu završila je 1993. godine sa srednjom ocenom 9,16.

Specijalistički ispit iz oftalmologije položila je 1999. godine sa odličnom ocenom na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Magistarski rad pod naslovom „Mogućnosti lečenja intraokularnih tumora sa sekundarnim glaukomom“ sa uspehom je odbranila 2002. godine.

Juna meseca 2003. godine položila je sa uspehom međunarodne testove iz oblasti bazične i kliničke oftalmologije: International Basic Science Assesment for Ophthalmologist i International Clinical Science Assesment for Ophthalmologist.

Kao stipendista Evropskog oftalmološkog udruženja boravila na Odeljenju za prednji segment oka, Moorfields Eye Hospital, u Londonu.

U okviru edukacije o primeni amnionske membrane u oboljenjima prednjeg segmenta oka provela mesec dana na Univerzitetkim klinikama u Kelnu i Esenu u Nemačkoj.

U periodu od 2007. do 2008. godine radi kao naučni saradnik na Očnoj klinici Charite Medicinskog Univerziteta u Berlinu u projektu čiji je nosilac Prof. Dr Uwe Pleyer (Deutsche Forschungsgemeinschaft (Pl 150/14-2)).

Zaposlena je na Klinici za očne bolesti Kliničkog centra Srbije na Odeljenju za oboljenja i hirurgiju prednjeg segmenta oka od 2000. godine.

Od aprila 2009. godine zaposlena je na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Светлана Станојловић

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање ефеката имуносупресивне и ћелијске терапије у  
експерименталној кератопластици

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.06.2012.

Светлана Станојловић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Светлана Станојловић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Испитивање ефеката имуносупресивне и ћелијске терапије у  
Наслов рада експерименталној кератопластици

Ментор Проф. Др Слободан Голубовић

Потписани \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.06.2012.

  
\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### Испитивање ефеката имуносупресивне и ћелијске терапије у експерименталној кератопластици

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.06.2012.

  
\_\_\_\_\_