

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra D. Popov Aleksandrov

**IMUNSKI MEHANIZMI INDUKCIJE I  
EKSPRESIJE REAKCIJE KONTAKTNE  
PREOSETLJIVOSTI KOD PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra D. Popov Aleksandrov

**IMMUNE MECHANISMS OF  
INDUCTION AND EXPRESSION OF  
CONTACT HYPERSENSITIVITY  
REACTION IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

## **MENTORI:**

Dr Ivana Mirkov

naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu

Dr Milena Kataranovski

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

Dr Ivana Mirkov

naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu

Dr Milena Kataranovski

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu

Dr Ljiljana Medenica

redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Dragana Vučević

redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

*Mojim dragim mami, tati, bratu Zoranu i supruhu Andriji*

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na Institutu za Biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. Dr Milene Kataranovski.

Dr Mileni Kataranovski dugujem ogromnu zahvalnost na stručnoj pomoći, velikoj podršci, poverenju, ali i konstruktivnim kritikama, koje mi je ukazivala u toku mog rada. Eksperimentalni i teorijski deo doktorske disertacije rezultat su ideje, znanja i iskustva koje mi je nesebično prenela prof. Kataranovski. Posebnu zahvalnost joj dugujem za korisne savete i podsticaj u toku pisanja disertacije.

Zahvaljujem se Dr Ivani Mirkov, koja mi je od samog početka pružala veliku pomoć u sticanju iskustva u istraživačkom radu, i koja je često rame uz rame sa mnom odgovarala izazovima eksperimentalnog dela ove teze. Posebno joj se zahvaljujem na stručnoj pomoći, korisnim sugestijama i strpljenju koje mi je pružila u toku izrade disertacije.

Dr Ljiljani Medenici i Dr Dragani Vučević zahvaljujem se na uloženom vremenu, stručnim savetima i sugestijama.

Dr Draganu Kataranovski zahvaljujem se na stručnoj pomoći i podršci u toku mog istraživačkog rada.

Jeleni Đokić i Marini Ninkov se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu i izradi disertacije, ali najviše im se zahvaljujem što svojom vedrinom, razumevanjem i iskrenošću, svakodnevnicu čine lepšom i lakšom. Takođe, zahvaljujem se Sandri Belij-Rammerstorfer i Tamari Saksidi na prijateljstvu, kao i na stručnim savetima i sugestijama kada god je to bilo potrebno. Njihova podrška u profesionalnim, ali i privatnim, usponima i padovima mi mnogo znači.

Veliku zahvalnost dugujem Dr Đorđu Miljković, koji je omogućio analizu na protočnom citofluorimetru, ali koji mi je i svojim stručnim i nesebičnim savetima pomogao mnogo puta; Mr Lidiji Zolotarevski, na patohistološkoj analizi tkiva uha; Dr Sasi Vasilijić, na tehničkoj pomoći pri testu proliferativne aktivnosti; Sandri Belij-Rammerstorfer za pomoć u pojedinim fazama eksperimentalnog rada; Veljku Blagojević za pomoć pri tehničkoj izradi disertacije, i svim ostalim kolegama koje su učestvovala u ekperimentalnom delu disertacije. Zahvaljujem se i suprugu Andriji na uloženom vremenu, velikom trudu i strpljenju u toku tehničke obrade disertacije.

*Najveću zahvalnost i poštovanje dugujem svojoj porodici i bliskim prijateljima,  
za pruženu nesebičnu ljubav, podršku i razumevanje. Bez njih bi sve bilo mnogo teže.*

## Imunski mehanizmi indukcije i ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti kod pacova

### SAŽETAK

Alergijski kontaktni dermatitis (AKD) je česta zapaljenska bolest kože kod ljudi, koja pogađa 15-20% svetske populacije. Velika zastupljenost hemijskih agenasa (haptena) koji izazivaju AKD, uz odsustvo adekvatne konvencionalne imunosupresivne terapije, čine ovu bolest velikim izazovom za javno zdravlje, i savremenu imunologiju. Razvoj životinjskog modela AKD, reakcije kontaktne preosetljivosti, omogućio je napredak u razumevanju njene patogeneze. Iako je reakcija kontaktne preosetljivosti (KP) dosta ispitivana, pretežno na mišjem modelu, mehanizmi u osnovi razvoja bolesti nisu dovoljno poznati. Takođe, mali je broj podataka o reakciji KP kod drugih eksperimentalnih životinja, osim miševa, koji bi mogli da unaprede znanje o imunobiologiji kontaktnih alergija. U svetlu toga, u ovom radu su ispitane karakteristike reakcije KP kod pacova, korišćenjem dva soja pacova, Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO), za koje je pokazano da se razlikuju u reaktivnosti na pojedine zapaljenske stimulse. Indukcija (senzibilizacija) i izazivanje (elicitacija) reakcije KP vršene su sa haptenom dinitrochlorobenzenom (DNCB), koji je primenjen u dve različite koncentracije (režim senzibilizacije/elicitacije 0.4%/0.13% i 4%/1.3% DNCB). Mehanizmi KP kod pacova ispitani su u fazi senzibilizacije i elicitacije reakcije, praćenjem dinamike promena aktivnosti ćelija drenirajućih limfnih čvorova (dLČ) u fazi senzibilizacije, i ispitivanjem produkcije inflamatornih/ anti-inflamatornih medijatora u kondicioniranom medijumu organokulture uha, i promena aktivnosti ćelija dLČ u fazi elicitacije reakcije (24 časa nakon elicitacije). Rezultati su pokazali povećanje *in vivo* (otok uha) i *ex vivo* (patohistološka analiza isečaka kože uha) parametara reakcije KP kod oba soja pacova nakon tretmana sa višom dozom haptena, ali je reakcija bila intenzivnija kod DA u odnosu AO soj. Nakon senzibilizacije dolazi do: povećanja broja ćelija u dLČ kod oba soja (izraženije kod DA jedinki), promene zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija i njihovog odnosa (povećanja odnosa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ćelija kod DA soja, zbog povećanja zastupljenosti CD4<sup>+</sup> ćelija a pada zastupljenosti CD8<sup>+</sup> ćelija, i smanjenja odnosa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> kod AO soja, zbog pada zastupljenosti CD4<sup>+</sup> ćelija a povećanja CD8<sup>+</sup> ćelija), povećanja *ex vivo* proliferacije izolovanih ćelija i povećanja spontane i specifične (nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa haptenom) produkcije inflamatornih

citokina IFN- $\gamma$  i IL-17, i Th2/anti-inflamatornog citokina IL-10 (izraženije kod DA soja). U ovoj fazi reakcije kod oba soja nije zapažena promena u produkciji i ekspresiji Th2/anti-inflamatornog citokina IL-4. U fazi ekspresije (elicitacije) reakcije pokazano je da je povećanje otoka uha praćeno povećanjem produkcije TNF- $\alpha$ , NO, MPO, IFN- $\gamma$  i IL-17 u kondicioniranom medijumu organokulture eksplanata kože uha, kao i da su razlike u ekspresiji reakcije između dva soja praćene razlikama u intenzitetu promena (veća koncentracija NO, MPO, IFN- $\gamma$ , IL-17 kod DA soja) i tipu imunskog odgovora (povećana produkcija IL-4 samo kod AO soja). U ovoj fazi reakcije pokazano je povećanje aktivnosti ćelija dLČ (spontane i specifične proliferacije, uz povećanje ekspresije inducibilnog  $\alpha$  lanca receptora za faktor rasta IL-2, kao i produkcije efektorskih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17, i ekspresije gena za p35, p40 i T-bet, koji su pokazatelji diferencijacije Th1/tip1 ćelija) kod DA soja nakon tretmana sa DNCB-om, u odnosu na kontrole. Odsustvo promena u aktivnosti efektorskih mehanizama u dLČ kod jedinki AO soja je praćeno povećanom produkcijom IL-4, i povećanim brojem CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija, koje fenotipski odgovaraju regulatornim T ćelijama (Treg). Reakcija KP na DNCB kod pacova (slično mišjem modelu) karakteriše se aktivacijom Th1/tip1 i Th17/tip imunoskog odgovora, a razlike u intenzitetu odgovora (u fazi senzibilizacije i elicitacije) ili tipu odgovora (u fazi elicitacije), mogu biti u osnovi zabeleženih međusojnih razlika u intenzitetu ekspresije reakcije. Komparativno ispitivanje kontaktne preosetljivosti kod reaktivnijeg DA soja i manje reaktivnog AO soja, može doprineti saznanjima o imunskim mehanizmima koji su u osnovi razvoja i ekspresije, kao i regulacije ove reakcije. Ovakva saznanja mogu dati dobru osnovu za razvoj novih terapijskih modaliteta u lečenju alergijskog kontaktnog dermatitisa, ali i osnovu za ispitivanje imunotoksičnog potencijala hemijskih agenasa, posebno onih koji dospevaju u organizam preko kože.

**Ključne reči:** Reakcija kontaktne preosetljivosti; DNCB; Faza senzibilizacije; Faza elicitacije reakcije; DA i AO pacovi; Drenirajući limfni čvorovi; Organokultura eksplantata kože uha.



Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

UDK broj: [599.323.45 : 57.082][616.6-002 : 57.083.32] (043.3)

## **Immune mechanisms of induction and expression of contact hypersensitivity reaction in rats**

### **ABSTRACT**

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common skin inflammatory disease in humans, affecting 15-20% of the general population. Large number of chemical agents that induce ACD (called haptens), together with lack of adequate conventional immunosuppressive therapy, make this disease a major challenge for public health and modern immunology. Pathophysiology of ACD is studied on animal models referred as contact hypersensitivity. Although the reaction of contact hypersensitivity (CHS) has been much studied, mostly in mice, the knowledge of its mechanisms is still far from complete. In addition, there is paucity of data about CHS in other experimental animals, beside mice, which might increase our understanding of the immunobiology of contact allergy. In light of this, in the present study the characteristics of CHS were analyzed in rats, using two strains, Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO), which have been shown to differ in reactivity to certain inflammatory stimuli. CHS to hapten dinitrochlorobenzene (DNCB) was induced by applying two different hapten concentrations in sensitization and elicitation phases (sensitization/elicitation regime 0.4%/0.13% and 4%/1.3% DNCB). Mechanisms of CHS were studied in induction (sensitization) and expression (elicitation) phases, by evaluating dynamics in activity changes of draining lymph node (dLN) cells in sensitization phase and by evaluating production of inflammatory/anti-inflammatory mediators in conditioned medium of ear skin organ culture and activity changes of dLN cells in elicitation phase (24 hours after elicitation). The results showed increased *in vivo* (ear thickness) and *ex vivo* (patohistology analysis of ear skin) parameters of CHS reaction, in both rat strains following the treatment with high DNCB dose, but the reaction was more intensive in DA compared to AO rats. In sensitization phase it was showed: increased dLN cell number in both strains (higher in DA rats), changes in ratio of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets (increased ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in DA rats, because of increased relative number of CD4<sup>+</sup> and decreased relative number of CD8<sup>+</sup> cells and decreased CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio in AO rats, because of decreased relative number of CD4<sup>+</sup> cells and increased CD8<sup>+</sup> cells relative number), increased *ex vivo* proliferation of dLN cells and increased spontaneous

and specific (induced by *in vitro* cell stimulation with haptens) production of inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and IL-17 and Th2/anti-inflammatory cytokine IL-10 (more pronounced in DA rats). Similarly to DA rats, no changes in production and expression of Th2/anti-inflammatory cytokine IL-4 were noted in AO rats in sensitization phase. Increased ear thickness in elicitation phase was accompanied by increased production of TNF- $\alpha$ , NO, MPO, IFN- $\gamma$  and IL-17 in conditioned medium of ear skin organ culture. Strain-dependent differences in CHS expression were related to differences in intensity (higher NO, MPO, IFN- $\gamma$ , IL-17 in DA strain) and type of immune response (increased production of IL-4 only in AO rats). In addition, in this phase of the reaction it was shown the increase in dLN activity in DNCB-treated DA rats (increased spontaneous and specific proliferation, concomitantly with increased expression of growth factor IL-2 receptor  $\alpha$  chain, as well as production of effector cytokines IFN- $\gamma$  and IL-17, and gene expression of p35, p40 and T-bet, which are indicators of differentiation of Th1/type1 cells), compared to controls. The absence of changes in the activity of effector mechanisms in dLN of AO strain is accompanied by increased production of IL-4 and increased numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells, that phenotypically correspond to regulatory T cells (Treg). CHS to DNCB in rats (similarly to mouse model) is characterized by activation of Th1/type1 and Th17/type17 immune response, and differences in response intensity (in induction and expression phase) and response type (in expression phase) could be underlying mechanism of strain-dependent difference. Comparative analysis of CHS in more reactive (DA) and less reactive (AO) strains, can contribute to the further knowledge of the immunological mechanisms underlying the development and expression, as well as regulation of this reaction. Such findings might be useful in exploring the potential of therapeutic modalities to reduce skin damage caused by contact allergy, as well as in the elucidation of immunomodulatory potential of different chemicals, particularly those that gain access to the host system via skin.

**Key words:** Contact hypersensitivity reaction; DNCB; Sensitization phase; Elicitation phase; DA and AO rats; Draining lymph nodes; Ear skin organ culture.

Research area: Biology

Major: Immunobiology

UDK number: [599.323.45 : 57.082][616.6-002 : 57.083.32] (043.3)

## Skraćenice

$\alpha$ -GalCer-  $\alpha$ -galaktozilceramid

AKD- alergijski kontaktni dermatitis

AO- Albino Oxford

APĆ- antigen-prezentujuće ćelije

ASC- adaptorski protein sa CARD domenom koji promovira apoptozu (eng. Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing CARD)

ATP- adenzin trifosfat

BN- Brown Norway

CARD- domeni aktivacije i regrutovanja kaspaze (eng. Caspase Recruitment Domain)

CCL- CC-hemokinski ligand

cDNK- komplemetarna DNK

CLA- antigen limfocita kože (eng. Cutaneous Lymphocyte Antigen)

ConA- Concanavalin A

CTLA-4- antigen citotoksičnih T-limfocita-4 (eng. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)

DA- Dark Agouti

DAMP- molekularni obrasci oštećenja (eng. Damage-Associated Molecular Patterns)

DĆ- dendritične ćelije

DETC- dendritične epidermne T ćelije (eng. Dendritic Epidermal T Cells)

dLČ- drenirajući limfni čvorovi

DNBS- 2,4-dinitrobenzen sulfonska kiselina

DNCB- dinitrochlorobenzen

DNFB- dinitrofluorobenzen

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

DNTB- dinitrotiocijanobenzen

DTR- receptor za toksin difterije

EdLČ- Drenirajući limfni čvorovi uha (aurikularni)

ELISA- imunoenzimski test na čvrstoj fazi (eng. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

EPCAM- adhezioni molekul epitelijskih ćelija (eng. Epithelial Cell Adhesion Molecule)

FcεRI- visoko afinitetni receptor za imunoglobulin (Ig) E

FITC- fluorescein izotiocijanat

Foxp3- transkripcijski faktor iz "forkhead" familije (eng. Forkhead box p3)

GM-CSF- faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (eng. Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor)

HSP- proteini toplotnog šoka (eng. Heat Shock Proteins)

ICAM-1- unutarćelijski adhezivni molekul-1 (eng. Intracellular Adhesion Molecule-1)

IFN-γ- interferon-γ

IKD- iritantni kontaktni dermatitis

IL- interleukin

iNKT- invarijantne (nepromenljive) NKT ćelije

IP-10- IFN-indukovan protein 10 (eng. Interferon induced Protein-10)

IRF3- regulatorni faktor interferona (eng. Interferon Regulatory Factor 3)

KD- kontaktni dermatitis

LČ- Langerhansove ćelije

LLNA- test lokalnog limfnog čvora (eng. Local Lymph Node Assay)

LZT- toleranca niske doze (eng. Low Zone Tolerance)

MAP kinaza- kaskada mitogenom aktiviranih protein (eng. Mitogen Activated Protein) kinaza

Mas-TRECK miševi- miševi kod kojih su mast ćelije kondicionalno i specifično uklonjene

MEST- test otoka uha u mišjem modelu (eng. Mouse Ear Swelling Test)

MHC- glavni kompleks tkivne podudarnosti (eng. Major Histocompatibility Complex)

Mig- monokin indukovano interferonom- $\gamma$  (eng. Monokine-induced by interferon- $\gamma$ )

MIP-2- inflamatorni protein makrofaga-2 (eng. Macrophage Inflammatory Protein-2)

MPO- mijeloperoksidaza

MTT - 3(4, 5 – dimetiltiazolil-2) – 2, 5- difenil tetrazolijum bromid

NAD- N-(1-Naftil etilendiamin)

NF-kB- nuklearni faktor kapa-B (eng. Nuclear Factor-kappaB)

NKT- T ćelije prirodne ubice (eng. Natural Killer T cell)

NLR- Receptori slični NOD-u (eng. NOD-Like Receptor)

NO- azot monoksid (eng. Nitric Oxide)

OXAZ- oksazon

PAMP- molekularni obrasci zajednički za različite klase mikroba (eng. Pathogen-Associated Molecular Patterns)

PARC- pulmonarno i aktivacijom-regulisan hemokin (eng. Pulmonary Activation-Regulated Chemokine)

PE- fikoeritrin (eng. Phycoerythrin)

PGD<sub>2</sub>- prostaglandin D<sub>2</sub>

PRR- receptori koji prepoznaju molekulske obrasce (eng. Pattern Recognition Receptors)

RANKL- ligand za receptor koji aktivira NFkB (eng. Receptor Activator of NF-kB Ligand)

RANTES- hemokini koji su regulisani nakon aktivacije, i produkovani od strane normalnih T ćelija (eng. Regulation upon Activation, Normal T cell-expressed and –secreted)

rIL- rekombinatni IL

RNK- ribonukleinska kiselina

ROS- reaktivne vrste kiseonika (eng. Reactive Oxygen Species)

RT-PCR- reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (eng. Real Time-Polymerase Chain Reaction)

SA- sulfonilamid

SD- Sprague Dawley

SdLČ- drenirajući limfni čvorovi u fazi senzibilizacije (skapularni i aksilarni)

SDS- natrijum dodecil sulfat (eng. Sodium Dodecyl Sulfate)

SIF- srednji intenzitet fluorescence

STAT-6- prenosnik signala i aktivator transkripcije 6 (eng. Signal Transducer and Activator of Transcription 6)

TARC- timusom i aktivacijom regulisani hemokin (eng. Thymus- and activation-regulated chemokine)

Tc ćelije- citotoksične CD8<sup>+</sup> T ćelije

TCDD- 2,3,7,8-Tetrahlrodibenzo-*p*-dioksin

TCR- T ćelijski receptor (eng. T Cell Receptor)

TGF-β- faktor transformacije rasta-β (eng. Transforming Growth Factor-β)

Th ćelije- pomoćničke (CD4<sup>+</sup>) T ćelije

TLR- Receptori slični Toll proteinu (eng. Toll-Like Receptor)

TMA- trimetil amin

TNCB- trinitrofluorobenzen

TNF-α- faktor nekroze tumora- α (eng. Tumor necrosis factor-α)

TNP- trinitrofenol

Treg- regulatorne (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) T ćelije

Tr1- Tip 1 regulatorne T ćelije



VCAM-1- adhezivni molekul vaskularnih ćelija (eng. Vascular Cell Adhesion  
Molecule-1)

VEGF- faktor rasta za endotelne ćelije (engl. Vascular Endothelial Growth Factor)

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
1.1. Alergijski kontaktni dermatitis	2
1.2. Hapteni	4
1.3. Istorijski aspekt kontaktne preosetljivosti	5
1.4. Alergijski kontaktni dermatitis: mehanizmi indukcije i ekspresije reakcije	7
1.4.1. Faza senzibilizacije	9
1.4.1.1. Mehanizmi urođene imunosti u fazi senzibilizacije	9
1.4.1.2. Čelijski odgovor na haptene u koži	12
1.4.1.2.1. Keratinociti	13
1.4.1.2.2. Dendritične ćelije	14
1.4.1.2.3. Mast ćelije	16
1.4.1.2.4. T ćelije u koži	17
1.4.1.2.4.1. $\gamma\delta$ T ćelije	18
1.4.1.2.4.2. Invarijantne NKT ćelije	19
1.4.1.3. Adaptivna imunost u fazi senzibilizacije: aktivacija haptenspecifičnog imunskog odgovora	19
1.4.1.3.1. Nastanak efektorskih i memorijskih T ćelija	22
1.4.2. Faza elicitanje	22
1.4.2.1. Dinamična interakcija ćelija urođene i adaptivne imunosti u fazi elicitanje	23
1.4.2.2. Produkcija medijatora inflamacije u koži nakon elicitanje	24
1.4.2.3. Efektorski mehanizmi u elicitanji reakcije KP kod pacova	27
1.4.2.3.1. Uloga Th1/tip1 i Th17/tip17 ćelija	27
1.4.2.3.2. Uloga Th2 imunskog odgovora	28
1.4.2.3.3. Druge ćelije uključene u efektorsku fazu reakcije	30
1.4.3. Regulacija reakcije KP	30
1.4.3.1. Regulatorni putevi u koži	31
1.4.3.2. Toleranca i regulatorne T ćelije u reakciji KP	31
1.5. Pacov kao eksperimentalni model za ispitivanje reakcije KP	34
1.5.1. Dosadašnja istraživanja reakcije KP na pacovu	35
<b>2. Ciljevi rada</b>	38
<b>3. Materijal i metode</b>	40
3.1. Hemikalije	41
3.2. Ekperimentalne životinje	42

3.3. Reakcija kontaktne preosetljivosti	42
3.4. Histologija	43
3.5. Ispitivanje karakteristika imunskog odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima	44
3.5.1. Priprema ćelija drenirajućih limfnih čvorova	44
3.5.2. Testovi proliferacije ćelija drenirajućeg limfnog čvora	44
3.5.3. Određivanje metaboličke vijabilnosti ćelija drenirajućeg limfnog čvora pomoću MTT testa	45
3.5.4. Analiza zastupljenosti ćelijskih populacija na protočnom citofluorimetru	46
3.5.5. Produkcija citokina od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora	47
3.5.6. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu	47
3.6. Ispitivanje produkcije medijatora inflamacije u kondicioniranom medijumu organokulture uha	49
3.6.1. Organokultura eksplanata kože	49
3.6.2. Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO test) unutar ćelija iz organokulture eksplanata kože uha	50
3.6.3. Određivanje nivoa nitrita Griessovom metodom	50
3.7. Imunoenzimski test na čvrstoj fazi (eng. ELISA, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	51
3.8. Statistika	51
<b>4. Rezultati</b>	52
4.1. Promene u uhu 24 časa nakon elicitanje reakcije kontaktne preosetljivosti kod senzibilisanih pacova	54
4.1.1. Otok uha kao in vivo mera ekspresije reakcije KP	54
4.1.2. Histološke promene u uhu nakon elicitanje senzibilisanih životinja	55
4.2. Mehanizmi indukcije reakcije KP kod pacova	57
4.2.1. Doprinos faze senzibilizacije povećanju otoka uha nakon elicitanje	57
4.2.2. Osnovni parametri aktivnosti ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi senzibilizacije pacova	59
4.2.2.1. Promena broja ćelija i njihove proliferativne aktivnosti u drenirajućem limfnom čvoru u fazi senzibilizacije	59
4.2.2.2. Zastupljenost CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru trećeg i petog dana senzibilizacije	63
4.2.3. Citokinski odgovor ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi senzibilizacije kod pacova	64
4.2.3.1. Produkcija i ekspresija IFN- $\gamma$ od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije	65
4.2.3.2. Produkcija i ekspresija IL-17 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije	67
4.2.3.3. Produkcija i ekspresija IL-4 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije	69
4.2.3.4. Produkcija i ekspresija IL-10 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije	70

4.3. Mehanizmi ekspresije reakcije KP kod pacova	72
4.3.1. Infiltracija ćelija u uho nakon elicitacije reakcije KP	72
4.3.2. Produkcija (pro)inflamatornih medijatora u kondicioniranom medijumu organokulture uha	73
4.3.2.1. Ispitivanje markera inflamacije (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO i unutarćelijski MPO) u kondicioniranom medijumu organokulture uha	73
4.3.2.2. Produkcija IFN- $\gamma$ i IL-17 u kondicioniranom medijumu organokulture uha	75
4.3.2.3. Produkcija Th2/antiinflamatornih citokina u kondicioniranom medijumu organokulture uha	76
4.3.3. Aktivnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora nakon elicitacije senzibilisanih pacova	77
4.3.3.1. Promena broja ćelija i njihove proliferativne aktivnosti u drenirajućem limfnom čvoru u fazi senzibilizacije	77
4.3.3.2. Metabolička vijabilnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitacije	79
4.3.3.3. Produkcija IL-6 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitacije	80
4.3.3.4. Zastupljenost CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u fazi elicitacije	81
4.3.3.5. Citokinski odgovor ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitacije	82
4.3.3.5.1. Produkcija i ekspresija IFN- $\gamma$	82
4.3.3.5.2. Ekspresija gena za p35, p40 i T-bet	84
4.3.3.5.3. Produkcija i ekspresija IL-17	85
4.3.3.5.4. Produkcija i ekspresija IL-4	86
4.3.3.5.5. Produkcija i ekspresija IL-10	87
4.3.3.6. Zastupljenost CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u fazi elicitacije	88
<b>5. Diskusija</b>	89
<b>6. Zaključci</b>	110
<b>7. Literatura</b>	113

# 1. UVOD

U svakodnevnom životu organizam je u kontaktu sa raznim stranim prirodnim i sintetičkim hemijskim agensima, koji se nazivaju ksenobiotici. Udisanje, oralno unošenje ili kontakt kože sa ovim agensima najčešće je bez posledica, međutim pojedine hemikalije mogu imati imunotoksičan efekat, tj. mogu dovesti do prekomerne ili neadekvatne aktivacije, ili supresije funkcije imunskog sistema. Kontaktni dermatitis (KD) je jedna od najzastupljenijih manifestacija imunotoksičnosti ksenobiotika kod ljudi. To je česta zapaljenska bolest kože, koja se javlja na mestu kontakta kože sa ne-proteinskim hemikalijama (Nosbaum i drugi, 2009). KD se može klasifikovati na iritantni (IKD) i alergijski kontaktni dermatitis (AKD) koji se, iako imaju sličnu kliničku i histološku manifestaciju, mogu razlikovati na osnovu prisustva (AKD) ili odsustva (IKD) antigen-specifičnih T ćelija u kožnim ekcematoznim lezijama (Nosbaum i drugi, 2009). IKD je nespecifična zapaljenska dermatoza, koju izazivaju hemijski agensi toksični za ćelije kože, kao što su kiseline, bazni agensi i lekovi, sposobni da aktiviraju mehanizme (nespecifičnog) urođenog imunskog sistema. AKD je sa druge strane reakcija preosetljivosti tipa IV (kasni tip preosetljivosti), koja je posredovana T ćelijama i zavisi od njihove aktivnosti. Do sada je identifikovano više hiljada različitih supstanci, prisutnih u prirodi, koje mogu da izazovu AKD. Neke od njih su metali (nikl, hrom, kobalt, zlato, platina, berilijum), topikalni antibiotici (npr neomicin), konzervansi (formaldehid, paraben), jedinjenja koja se koriste u proizvodnji lateks rukavica, jedinjenja iz biljaka (hrizantema, tulipani, otrovni bršljen) (Chipinda i drugi, 2011; Saint-Mezard i drugi, 2004a).

### **1.1. Alergijski kontaktni dermatitis**

Za razvoj AKD neophodne su dve faze: senzibilizacija (aferentna faza ili faza indukcije) i elicitacija (eferentna faza ili faza ekspresije). Do indukcije bolesti dolazi nakon kontakta kože sa količinom alergena dovoljnom da izazove senzibilizaciju. Ako se koža senzibilisane osobe ponovo izloži delovanju istog alergena dolazi do razvoja zapaljenske reakcije koju karakterišu eritem (crvenilo) i edem (otok), praćeni pojavom papula, vezikula, kraste i svraba, na mestu kontakta kože sa kontaktnim alergenom (Kimber i drugi, 2002; Petkovic, 2011) (Slika 1.).



**Slika 1. Klinički aspekt alergijskog kontaktnog dermatitisa**

Ovo kompleksno oboljenje kože predstavlja veliki izazov za javno zdravlje i imunologe. Procenjeno je da 15-20% svetske populacije pati od kontaktnih alergija, sa prevalencom koja raste širom sveta. Procenjuje se da u Evropi 20% populacije pati od kontaktnih alergija na najmanje jedan alergen, sa niklom, parfemima i konzervansima kao najčešćim uzročnicima. Bolest se javlja dva puta češće kod žena nego kod muškaraca, i češće se javlja u ranijem životnom dobu, sa prevalencom od 15% kod dece starosti između 12-16 godina (Peiser i drugi, 2013). Faktori rizika kod kontaktnih alergija su: inherentni senzibilišući potencijal haptena, visoka koncentracija haptena tj. doza po jedinici površine, visoka frekvencija izloženosti, okluzija, dug period izloženosti haptenu, promenjena funkcija kožne barijere (Peiser i drugi, 2013). Iako pojedina istraživanja ukazuju na značaj genetike u razvoju AKD, ne postoji jasan stav o ulozi ovih endogenih faktora individualne osetljivosti kod AKD (Schnuch i Carlsen, 2011). Jedina dostupna etiološka terapija AKD podrazumeva izbegavanje kontaktnog alergena. Kod akutnog AKD koriste se topikalni steroidi, koji se po oporavku kože zamenjuju melemima i hladnim kremama. Kod težeg oblika bolesti kratkotrajno se primenjuju sistemski kortikosteroidi. Konvencionalna imunosupresivna terapija nije adekvatna u lečenju AKD, i perspektivu čine nove klase imunosupresora koji ciljano deluju na uzročnike bolesti, i uključuju inhibitore adhezivnih molekula, kontrolisanu aplikaciju regulatornih citokina, neutralizaciju proinflamatornih citokina (Saint-Mezard i drugi, 2004a). Iako je AKD dosta ispitivana, nisu poznati svi mehanizmi u osnovi razvoja bolesti, pa su u tom smislu gledano, neophodna što detaljnija ispitivanja patogeneze ove bolesti koja bi pomogla razvoj novih terapija.

## 1.2. Hapteni

Alergeni koji izazivaju AKD su hemikalije različitog porekla i prirode čija je molekulska masa najčešće manja od 500 daltona (hapteni), ali sa zajedničkom karakteristikom: samostalno nisu imunogeni, već nakon vezivanja za proteine formiraju antigenske determinante koje aktiviraju imunski sistem. Hapten se, nakon prolaska u epiderm i derm, vezuje za vanćelijske i ćelijske proteine. Delove ovog kompleksa preuzimaju dendritične ćelije, i nakon obrade, ekspimiraju ih na svojoj površini vezane sa molekulima glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (eng. MHC, Major Histocompatibility Complex). Ovako ekspimiran, hapten može da aktivira T-ćelijski imunski odgovor (Benezra, 1990).

Više od 80 godina je poznato da je reaktivnost haptena sa proteinima značajna za njihovu sposobnost da izazovu alergijsku senzibilizaciju. Hapteni su najčešće elektrofilne hemikalije koje mogu da reaguju sa nukleofilnim centrom proteina formirajući kovalentne veze. Izuzetak su soli metala, koji sa proteinima grade koordinatne veze. Veza sa velikom energijom, kao što je kovalentna, omogućava hapten-protein kompleksu da preživi unutarćelijsku obradu proteina do peptida, nakon čega će biti prezentovan vezan za MHC molekule (Chipinda i drugi, 2011). Neke od elektrofilnih hemikalija su aldehidi, ketoni, amidi, halogene supstance, metalni katjoni. Pojedini hapteni nisu normalno elektrofilni (prohapteni), ali se oksidacijom ili metaboličkom transformacijom, zahvaljujući aktivnosti keratinocita i/ili dendritičnih ćelija, prevode u hemikalije sposobne da reaguju sa proteinom (Divković i drugi, 2005). Faktori koji mogu uticati na senzibilišuću aktivnost haptena su i lipofilnost, trodimenzionalna struktura, i afinitet vezivanja za proteine.

Iako su proteini za koje se vezuju hapteni većinom nepoznati, postignut je napredak u njihovoj identifikaciji. Pokazano je da modifikacija proteina od strane haptena nije neselektivna, tj. ograničena grupa proteina, i njihovih aminokiselinskih ostataka, mogu biti potencijalne mete, kao što je npr. keratin 5 u koži ljudi (Martin, 2012).



### 1.3. Istorijski aspekt kontaktne preosetljivosti

Kontaktni dermatitis je kao pojava verovatno prepoznat još u starom veku, sudeći po zapisima iz tog perioda, kada je primećeno da pojedine osobe nakon sečenja drveta bora trpe jak svrab. U sedamnaestom, osamnaestom i devetnaestom veku javljaju se i prvi pokušaji izazivanja reakcije kontaktnog dermatitisa nakon nanošenja hemikalija na zdravu kožu kod ljudi. U devetnaestom veku je prvi put detaljno opisan test ispitivanja kontaktnog dermatitisa, stvaranjem lezija na koži kod ljudi nakon kontakta sa indijskim orahom (Lachapelle, 2009). Josef Jadassohn, dermatolog koji je 1895. opisao kontaktnu alergiju na živu, primetivši da se kod pojedinih osoba razvija ekcematozna reakcija na koži nakon ponovljenog kontakta sa hemikalijom, a koja nije posledica iritantnog efekta hemikalije (Jadassohn, 1985), danas se smatra 'ocem' kontaktnog dermatitisa i kožnog testa sa krpicama (eng. 'patch' test). U dvadesetom veku raste svest o značaju identifikacije hemikalija koje mogu biti uzročnici kontaktnog dermatitisa, što rezultira razvojem brojnih kožnih testova sa tom svrhom. Prvobitna istraživanja kontaktnog dermatitisa vršena su na ljudima, međutim kako ispitivanje potencijala slabih senzibilizujućih agenasa zahteva veliki broj ispitanika, a kontakt ispitanika sa hemikalijom može izazvati trajan zdravstveni problem, javlja se potreba za uvođenjem životinjskih modela bolesti. Do 1930. razvijen je model kontaktne preosetljivosti kod zamorčića, koji se zasniva na prvom kontaktu kože sa haptenom usled njegovog intrakutanog ili epikutanog nanošenja (senzibilizacija), i drugog kontakta (elicitacije reakcije) usled nanošenja hemikalije od petog do devetog dana nakon senzibilizacije na bilo koju površinu kože, osim na prvobitno tretirano mesto, nakon čega dolazi do ekspresije reakcije, sa pikom 24-48h nakon elicitacije (Landsteiner i Jacobs, 1935; Schild, 1962).

Istorijski, zamorčići su prvi prihvaćeni kao vrsta od izbora za ispitivanje senzibilizujuće aktivnosti hemikalije na koži. Najviše korišćeni i najbolje okarakterisani testovi na zamorčićima su zatvoreni 'patch' test (Buehler, 1965) i test maksimizacije (Magnusson i Kligman, 1969), koji se zasnivaju na sposobnosti hemikalije da izazove kožni eritem i edem. Više od dvadeset godina zamorčići su korišćeni kao najbolji model za ispitivanje senzibilizujućeg potencijala hemikalija, sve do razvoja testova na mišjem

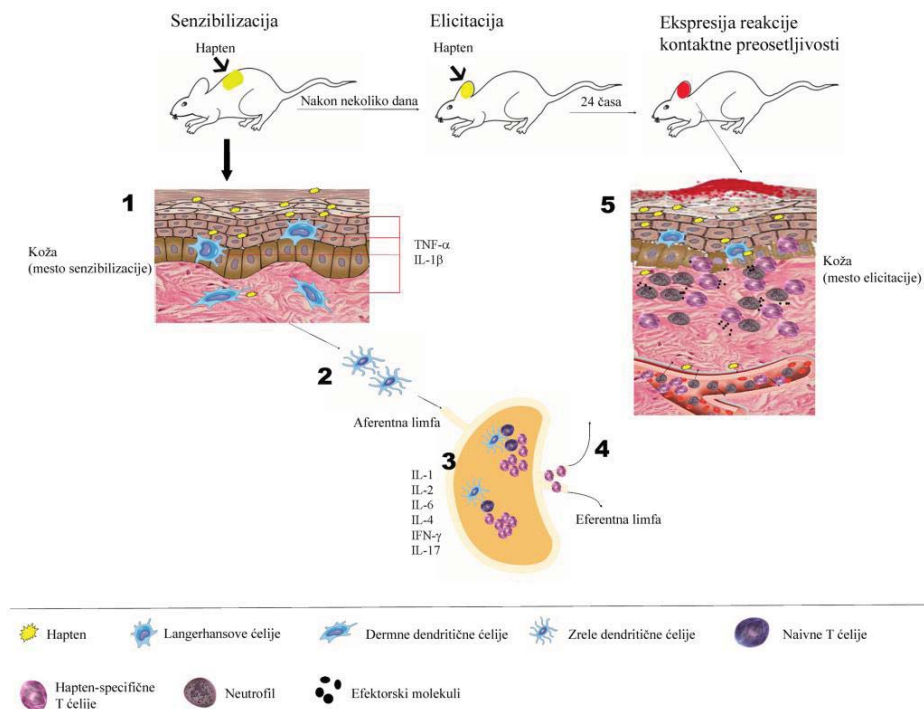
modelu- test otoka uha (eng. MEST, Mouse Ear Swelling Test) (Gad, 1994) i test lokalnog limfnog čvora (eng. LLNA, Local Lymph Node Assay) (Kimber i Dearman, 1994), za koje je pokazano da su podjednako efikasni kao testovi na zamorčićima. Ovi testovi se zasnivaju na sposobnosti hemikalije da izazove otok uha (MEST), ili proliferaciju ćelija limfnog čvora koji drenira regiju na koju je nanesa hemikalija (LLNA). LLNA se izdvojio kao danas najčešće korišćeni životinjski test sistem za procenu potencijala hemijskog agensa da izazove senzibilizaciju, sa visokim stepenom reproducibilnosti u inter- i intra-laboratorijskim testiranjima (Fowler i Fisher, 2008). Sa razvojem životinjskog modela AKD, reakcije kontaktne preosetljivosti (KP), napreduju i istraživanja imunobioloških procesa koji su u osnovi indukcije, ekspresije i regulacije reakcije. Ovakva istraživanja značajna su za razvoj pouzdanijih testova i u proceni rizika u odnosu na izloženost hemijskim agensima, ali i za razvoj novih dijagnostičkih metoda i terapijskih modaliteta u lečenju AKD. Iako su ova istraživanja rađena i na krupnijim životinjama kao što su psi, majmuni, ovce, uzimajući u obzir etnički i tehnički aspekt, danas u istraživanjima dominiraju glodarski modeli, u prvom redu miševi (Zollner i drugi, 2005). Pokazano je da u KP kod miševa i pacova preovladava infiltrat limfocita i monocita u zahvaćenoj koži, kao i kod ljudi (Haley, 2003), kao i da njihov odgovor na eksperimentalnu terapiju u velikoj meri reflektuje terapijski učinak kod ljudi (Zollner i drugi, 2005).

Protokoli za izazivanje eksperimentalne KP kod miševa se danas razlikuju u režimima indukcije i elicitanje reakcije. Senzibilizacija se izaziva jednostrukim (Hope i drugi, 1994; Dearman i drugi, 2005; Igyarto i drugi, 2009) ili ponovljenim (Nagai i drugi, 2000; Kish i drugi, 2009; Kish i drugi, 2011) nanošenjem haptena na dorzalnu ili ventralnu površinu kože, dok se elicitanje izaziva nanošenjem istog haptena na površinu uha, tri dana nakon senzibilizacije (Weigmann i drugi, 1997; Gautam i drugi, 1992), ako je višekratna aplikacija haptena u elicitanji, ili pet dana (Hope i drugi, 2000; Salerno i drugi, 1995; Traidl i drugi, 1999), ili kasnije (Scott i drugi, 2002; Hartmann i drugi, 2006), ako je jednokratna aplikacija haptena. Na pacovskom modelu bolesti, reakcija se indukuje nanošenjem haptena na dorzalnu površinu kože dva (Skoglund i Scheynius, 1990) ili tri dana (Arts i drugi, 1996) zaredom, dok se elicitanje vrši nanošenjem haptena na uho najčešće petog dana nakon senzibilizacije (Skoglund i Scheynius, 1990; Arts i drugi, 1996). Ekspresija reakcije prati se najčešće 24 časa nakon

elicitacije, kada se zapaža njen maksimum. Najčešće korišćeni hapteni u izazivanju KP su nitrohalogeni derivati benzena kao što su dinitrohlorobenzen (DNCB), dinitrofluorobenzen (DNFB), trinitrofluorobenzen (TNFB), kao i oksazon (OXAZ) i pikrinska kiselina. Ovi jaki hapteni nazivaju se i eksperimentalnim, jer se ne nalaze u prirodi.

#### **1.4. Alergijski kontaktni dermatitis: mehanizmi indukcije i ekspresije reakcije**

Reakcija KP, kao životinjski model AKD, dala je veliki doprinos razumumevanju efektorskih i regulatornih mehanizama ove bolesti. Kao i AKD, KP je reakcija posredovana T ćelijama specifičnim za haptenu, i za njenu optimalnu ekspresiju su neophodne dve vremenski i prostorno odvojene faze: faza senzibilizacije i elicitacije. Faza senzibilizacije započinje nakon prvog kontakta kože sa eksperimentalnim haptenom, i završava se aktivacijom T ćelija specifičnih za haptenu u drenirajućim limfnim čvorovima (dLČ) regije na koju je nanesen haptenu. Nakon aktivacije, specifične T ćelije napuštaju limfne čvorove, ulaze u krvotok i započinju recirkulaciju između limfoidnih organa i kože. Ova faza traje 10-15 dana kod ljudi i 5-7 dana kod miševa, i karakteriše je odsustvo kliničke manifestacije bolesti (Vocanson i drugi, 2009). U nekim slučajevima može se javiti primarni alergijski kontaktni dermatitis, zapaljenska reakcija u koži specifična za haptenu, 5-15 dana nakon prvog kontakta sa haptenom (Vocanson i drugi, 2009). Ponovni kontakt senzibilisanih životinja sa haptenom vodi razvoju zapaljenske reakcije sa karakterističnim znacima kliničke manifestacije bolesti AKD. Maksimum reakcije javlja se nakon 24-48 časova kod miševa i 72 časa kod čoveka. Zapaljenska reakcija se održava nekoliko dana nakon čega opada usled delovanja regulatornih mehanizama (Vocanson i drugi, 2009) (Slika 2.).



**Slika 2. Šema reakcije kontaktne preosetljivosti.** Faza senzibilizacije započinje topikalnom aplikacijom haptena na površinu kože životinja. Prisustvo haptena u koži dovodi do produkcije proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) i hemokina (1), što izaziva aktivaciju i migraciju epidermalnih i dermalnih dendritičnih ćelija, koje prezentuju hapten, preko aferentne limfe do drenirajućih limfnih čvorova (2). U drenirajućim limfnim čvorovima, prezentovanje haptena dovodi do proliferacije, aktivacije i diferencijacije T ćelija specifičnih za hapten (3). Produkcija citokina u drenirajućim limfnim čvorovima u toku faze senzibilizacije stimuliše i kontroliše efikasnu aktivaciju i proliferaciju (IL-1, IL-2, IL-6), kao i diferencijaciju (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4) T ćelija. Na kraju ove faze, senzibilisane specifične T ćelije napuštaju limfni čvor, i aferentnom limfom ulaze u krv, gde započinju recirkulaciju (4). U fazi elicitacije reakcije, nakon ponovne aplikacije istog haptena na najčešće površinu uha, hapten preuzimaju ćelije u koži (Langerhansove ćelije, keratinociti, endotelne ćelije) i prezentuju ga hapten-specifičnim T ćelijama iz krvi. Ovo izaziva produkciju inflamatornih citokina i hemokina na mestu elicitacije, dovodeći do infiltracije neutrofila u kožu. Dinamična interakcija ćelija adaptivne i urođene imunosti, koje ispoljavaju svoje efektorske aktivnosti, dovodi do razvoja karakterističnih kožnih lezija (5).

### **1.4.1. Faza senzibilizacije**

Sposobnost haptena da izazove senzibilizaciju zavisi od njegove proinflamatorne aktivnosti, tj. sposobnosti aktivacije ćelija urođene imunosti, kao i od antigenske aktivnosti koju stiće nakon vezivanja za proteine u koži (Vocanson i drugi, 2009).

#### **1.4.1.1. Mehanizmi urođene imunosti u fazi senzibilizacije**

Klinička zapažanja da iritantni efekat haptena (tj. sposobnost agensa da izazove vidljivu zapaljensku reakciju u koži nakon prvog nanošenja) korelira sa njegovim potencijalom senzibilizacije, ukazala su na značaj aktivacije urođene imunosti od strane haptena za izazivanje AKD (Kaplan i drugi, 2012). U prilog ovoj tvrdnji idu podaci McLelland i Shuster, koji su pokazali da primena iritanasa na mestu aplikacije nikel-sulfata kod senzibilisane osobe izaziva intenzivniju reakciju (McLelland i Shuster, 1990).

Urođena imunost predstavlja prvu liniju odbrane organizma tako što detektuje prisustvo i prirodu ne samo infekcije, već bilo kojeg fizički ili hemijski izazvanog oštećenja ćelija ili tkiva, i kontroliše razvoj adaptivnog imunskog odgovora. Ćelije urođene imunosti prepoznaju konzervisane molekulske obrasce zajedničke za različite klase mikroba (eng. PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns), a koje se ne eksprimiraju na ćelijama domaćina. PAMP obuhvataju nukleinske kiseline, proteine, šećere, i lipide, karakteristične za mikrobe. Ćelije imunskog sistema prepoznaju ove molekulske obrasce preko nekoliko tipova ćelijskih receptora, različito lokalizovanih u ili na ćeliji, nazvanih receptori za molekulske obrasce (eng. PRR, Pattern Recognition Receptors) (Zhang i Mosser, 2008). Iako su PRR prvobitno identifikovani kao receptori za molekulske obrasce mikroorganizama, veliki broj istraživanja je pokazao da kod određenih patoloških stanja i endogeni molekuli mogu biti ligandi za ove receptore, obaveštavajući imunski sistem o prisustvu tkivnog oštećenja, a sa ciljem aktivacije mehanizama kojima se to oštećenje može popraviti. Ovi endogeni molekuli, poreklom od oštećenih ili umirućih ćelija, označeni su kao molekulske obrasci oštećenja (eng. DAMP, Damage-Associated Molecular Patterns) (Gallucci i Matzinger, 2001). Primeri

molekula koji mogu delovati kao DAMP su: proteini toplotnog šoka (eng. HSP, Heat Shock Proteins), HMGB1 (eng. High Mobility Group protein Box1), RNK (ribonukleinska kiselina), DNK (dezoksiribonukleinska kiselina), hijaluronan, i heparan sulfat (Kaplan i drugi, 2012).

Nedavna istraživanja pokazala su da PRR mogu biti aktivirani od strane kontaktnih alergena, što, kod osoba sklonih alergijama, vodi ekspresiji imunskog odgovora tj. AKD (Kaplan i drugi, 2012).

**Receptori slični Toll proteinu** (eng. TLR, Toll-Like Receptor), članovi porodice interleukin (IL)-1 receptora, su najbolje okarakterisani PRR. Do sada je identifikovano 13 TLR kod miševa i 11 kod ljudi, koji mogu prepoznati različite PAMP i DAMP ligande (Tsan i Gao, 2004; Zhang i Mosser, 2008). Nakon vezivanja odgovarajućeg liganda, pojedinačni TLR intereaguju sa različitom kombinacijom adaptorskih proteina, aktivirajući transkripcione faktore kao što su NF- $\kappa$ B (eng. Nuclear Factor-kappaB), MAP (eng. Mitogen Activated Protein) kinaze, IRF3 (eng. Interferon Regulatory Factor 3), što započinje specifičan imunski odgovor (Akira i drugi, 2006).

Istraživanja koja su pokazala da kontaktni alergeni aktiviraju NF- $\kappa$ B i MAP kinaze (Takanami-Ohnishi i drugi, 2002; Aiba i drugi, 2003) navela su na ispitivanje uloge TLR u indukciji reakcije KP. Martin i drugi su prvi sugerisali značajnu ulogu TLR2 i TLR4 u reakciji KP kod miševa na TNCB, OXAZ, i fluorescein isotiocijanat (FITC) (Martin i drugi, 2002). Njihova istraživanja su ukazala na postojanje dva moguća mehanizma senzibilizacije od strane kontaktnih alergena: mehanizam koji zavisi od IL-12, kod koga je aktivacija samo TLR2 ili TLR4 dovoljna da izazove KP; i mehanizam koji je nezavisan od IL-12, za koji je potrebno prisustvo TLR4, često dovoljno ako je samo na dendritičnim ćelijama. Takođe, oni su ukazali na to da su, u slučaju reakcije KP na TNCB, ligandi za TLR2 i TLR4 endogene prirode, a ne komponente komensalne flore kože (Martin i drugi, 2002). Jedan od predloženih endogenih aktivatora TLR2/TLR4 u KP je degradovana hijaluronska kiselina. Pokazano je da kontaktni alergeni, kao što je TNCB, mogu da dovedu do produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (eng. ROS, Reactive Oxygen Species) *in vitro*, od strane ćelijskih linija mišjih keratinocita i fibroblasta, i *in vivo*, nakon nanošenja haptena na uho miša (Esser i drugi, 2012). Pretpostavlja se da produkcija ROS, izazvana prisustvom haptena, dovodi

do oksidativne degradacije hijaluronske kiseline (Martin i drugi, 2011). Osim ovih mehanizama, nedavna istraživanja su sugerisala da se nikl može direktno vezati za TLR4 kod ljudi, izazivajući proinflamatornu reakciju neophodnu za razvoj AKD (Schmidt i drugi, 2010).

**Receptori slični NOD-u** (eng. NLR, NOD-Like Receptor) su najveća familija unutarćelijskih receptora, koji prepoznaju PAMP i DAMP još uvek nedovoljno objašnjenim mehanizmom. Aktivacija ovih receptora, kao što je NLRP3, dovodi do formiranja kompleksa velike molekulske mase, nazvanog inflamazom (Martinon i drugi, 2009). Inflamazom čine oligomeri receptora i adaptorski molekul ASC (eng. Apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD) za koji se vezuje prokaspaze-1. Vezivanje prokaspaze-1 za kompleks inflamazoma dovodi do njene aktivacije. Glavna funkcija kaspaze-1 je u aktivaciji neaktivnih formi citokina IL-1 $\beta$  i IL-18, čije oslobađanje doprinosi razvoju inflamacije (Martinon i drugi, 2009).

Značaj inflamazoma u odgovoru na haptenu pokazan je na miševima sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za ASC i NLRP3 (*Asc*<sup>-/-</sup> i *Nlrp3*<sup>-/-</sup> miševi), kod kojih je ekspresija reakcije KP na TNCB i DNFB smanjena. Pretpostavlja se da aktivacija inflamazoma obezbeđuje proinflamatorni signal bitan za senzibilizaciju T ćelija (Watanabe i drugi, 2007). Predloženi model delovanja inflamazoma u aktivaciji T ćelija podrazumeva aktivaciju ovog kompleksa od strane haptena, kao što je DNFB, što dovodi do produkcije IL-1 $\beta$ . Ovaj citokin dalje podstiče ekspresiju IL-6 i IL-12 u dLČ, stvarajući sredinu koja favorizuje Th1/tip1 imunski odgovor i inhibira aktivnost regulatornih T ćelija (Treg). Ova istraživanja pokazala su da je za indukciju senzibilizacije, pored antigenog svojstva haptena, neophodan i tzv. signal opasnosti (koji obezbeđuju molekuli patogena, ili molekuli oslobođeni iz tkiva oštećenog usled infekcije ili sterilne inflamacije), koji aktivira inflamazom uz posledičnu produkciju IL-1 $\beta$ . Za razliku od DNFB-a koji obezbeđuje i jedan i drugi signal i s toga može da dovede do indukcije reakcije KP, dinitrotiocijanobenzen (DNTB) koji normalo obezbeđuje samo antigenost (nedostaje signal opasnosti koji bi aktivirao inflamazom i IL-1 $\beta$ ) indukuje tolerancu pre nego senzibilizaciju (Watanabe i drugi, 2008). Obezbeđivanjem signala opasnosti (tretman sa dodecil sulfatom) koji dovodi do aktivacije inflamazoma, omogućava se senzibilizacija sa inače tolerogenim DNTB-om,



dok ukidanje signala opasnosti, tj. mogućnost aktivacije inflamazoma, vodi razvoju tolerancije na inače jak senzibilišući DNFB (Watanabe i drugi, 2008). Ovaj model je u saglasnosti sa zapažanjima da ljudi koji nisu skloni alergijama, nakon izlaganja niklu, slabom haptenu koji inače ne aktivira inflamazom (Watanabe i drugi 2008), razvijaju nikl-specifične CD25<sup>+</sup> Treg ćelije sa supresorskom aktivnošću, za razliku od osoba koje boluju od AKD, kod kojih je supresorska aktivnost ovih ćelija ograničena ili odsutna (Cavani i drugi, 2003).

Topikalno nanošenje haptena TNCB-a i OXAZ-a kod miševa, dovodi do oslobađanja veće količine vanćelijskog adenzin trifosfata (ATP) u koži, koji deluje kao DAMP (vezujući se za purinergički receptor P2X7), što dalje dovodi do aktivacije inflamazoma i produkcije IL-1 $\beta$ , koji su neophodni za indukciju KP (Weber i drugi, 2010).

#### **1.4.1.2. Ćelijski odgovor na haptene u koži**

Nakon nanošenja, hapteni intereaguju sa ćelijama kože, dovodeći do produkcije brojnih citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN-indukovan protein 10/IP-10, makrofagni inflamatorni protein 2/MIP-2) neophodnih za indukciju reakcije KP (Enk i Katz, 1992).

Kožu grade dva sloja, epiderm i derm, međusobno povezana bazalnom laminom. Pored najbrojnijih keratinocita (>90%) u epidermu se nalaze melanociti, Merkelove ćelije, Langerhansove ćelije i epidermni T limfociti (Mestas i Hughes, 2004; Nestle i drugi, 2009). Derm je anatomski komplikovaniji, sa većom ćelijskom raznovršnošću. U njemu se nalaze najbrojniji fibroblasti, zatim dendritične ćelije, CD4<sup>+</sup> T ćelije,  $\gamma\delta$  ćelije, T ćelije prirodne ubice (eng. NKT, Natural Killer T cell), mast ćelije, makrofagi (Nestle i drugi, 2009).



#### 1.4.1.2.1. Keratinociti

*Keratinociti*, kao najbrojnije ćelije epiderma, čine fizičku barijeru prodiranju hemikalija kroz kožu. Pokazano je da poremećaj ove barijere povećava osetljivost na senzibilizaciju sa niklom kod ljudi (Novak i drugi, 2008) i OXAZ-om kod miševa (Scharschmidt i drugi, 2009). Međutim, keratinociti se ne smeju posmatrati samo kao deo pasivne barijere, već i kao ćelije sa bitnom imunološkom funkcijom, od važnosti za tkivnu homeostazu ali i u različitim patološkim stanjima. Pokazano je da keratinociti eksprimiraju većinu TLR, i da odgovaraju na prisustvo pojedinih haptena (DNFB, nikl) aktivacijom TLR4, što može dovesti do aktivacije inflamazoma i produkcije IL-1 $\beta$  i IL-18 (Kaplan i drugi, 2012). Pored IL-1 $\beta$  i IL-18, keratinociti produkuju i mnoge druge proinflamatorne citokine i hemokine (Corsini i Galli, 2000). Jedan od citokina koji je bitan za senzibilizaciju a koga produkuju keratinociti u odgovoru na haptenu je faktor nekroze tumora-  $\alpha$  (eng. TNF- $\alpha$ - Tumor necrosis factor- $\alpha$ ). Nakon nanošenja kontaktnog alergena na kožu miševa (OXAZ, FITC) i ljudi (difenilciklopropenon) pokazano je da TNF- $\alpha$ , zajedno sa IL-1 $\beta$  i IL-18, podstiče migraciju i sazrevanje Langerhansovih ćelija iz kože u dLČ (Cumberbatch i Kimber, 1995; Griffiths i drugi, 2001). Pored proinflamatorne aktivnosti, keratinociti mogu da utiču i na prirodu adaptivnog imunskog odgovora. Pokazano je da ćelijske linije keratinocita čoveka nakon tretmana sa haptenuima, ali ne i iritantima, eksprimiraju p40 subjedinicu IL-12 koji vodi polarizaciji Th1 imunskog odgovora (Banarjee i drugi, 2004), kao i da nakon tretmana sa niklom produkuju IL-23 bitan za proliferaciju Th17 ćelija (Larsen i drugi, 2009). Što se tiče održavanja tkivne homeostaze i kontrole imunskog odgovora, pokazano je da ove ćelije u odgovoru na inflamaciju eksprimiraju RANKL (eng. Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), koji povećava broj Treg ćelija (Loser i drugi, 2006), što može dovesti do supresije reakcije KP kod miševa (Ghoreishi i drugi, 2009) odnosno AKD kod ljudi (Hanneman i drugi, 2006). Pored toga, keratinociti produkuju katelicidine, peptide sa antibiotskim dejstvom, koji inhibiraju produkciju citokina indukovanu hijaluronskom kiselinom, ali produkuju i imunosupresivne citokine, kao što su IL-10 i transformišući faktor rasta (eng. TGF- Transforming Growth Factor)- $\beta$  (Ferguson i drugi, 1994).

#### 1.4.1.2.2. Dendritične ćelije

Ključan događaj u inicijaciji AKD je aktivacija  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T ćelija specifičnih za haptenu u dLČ, njihova proliferacija i diferencijacija u efektorske T ćelije (Nestle i drugi, 2009). Iako hapteni mogu stići do dLČ limfnim tokom, aktivacija imunskog odgovora u dLČ zahteva njihov transport i prezentaciju posredstvom migratornih dendritičnih ćelija (Itano i drugi, 2003).

*Dendritične ćelije* (DĆ) se u odnosu na lokalizaciju u koži dele na epidermne i dermne DĆ. U epidermu se nalaze langerin<sup>+</sup> DĆ (Langerhansove ćelije), koje se kod miševa razlikuju od dermnih langerin<sup>+</sup> DĆ po ekspresiji EPCAM (eng. Epithelial Cell Adhesion Molecule). Pod uticajem proinflammatoryh medijatora produkovanih u koži nakon kontakta sa haptenom, ali i nakon direktnog prepoznavanja haptena (Kaplan i drugi, 2012), Langerhansove DĆ (LĆ) preuzimaju haptenu vezan za tkivne proteine, obrađuju ovaj kompleks i prikazuju ga na svojoj površini vezanog za MHC molekule klase I (MHC I) i klase II (MHC II), što dovodi do njihove aktivacije (Watanabe i drugi, 2002). Aktivisane LĆ povećavaju ekspresiju kostimulatornih molekula, kao što su CD54, CD80, i CD86, i produkciju proinflammatoryh citokina (IL-1, TNF- $\alpha$  i IL12) (Aiba i Tagami, 1999). Nakon aktivacije, sledi migracija ovih ćelija iz kože u dLČ, i njihovo sazrevanje. Za ove procese su neophodni IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , produkovani od strane keratinocita i samih LĆ (Watanabe i drugi, 2002). Ovi citokini dovode do promene u ekspresiji adhezivnih molekula, pre svega do gubitka ekspresije molekula CD324 (E-kadherin), što omogućava migraciju LĆ iz epiderma. Generalno, IL-1 $\beta$  produkovan od strane LĆ autokrinno aktivira LĆ preko IL-1 receptora, i stimuliše keratinocite da produkuju TNF- $\alpha$  koji parakrinno utiče na LĆ i doprinosi njihovoj migraciji (Cumberbatch i drugi, 1999). U poređo sa ovom aktivnošću povećana je i produkcija enzima koji razgrađuju bazalnu membranu, kao što su matriksne metaloproteinaze, od strane aktivisanih LĆ (Kobayashi, 1997).

Iako davno identifikovane kao antigen-prezentujuće ćelije (APĆ) u koži, *in vivo* uloga LĆ je ostala kontroverzna (Nestle i drugi, 2009). One su dugo smatrane ćelijama odgovornim za indukciju imunskog odgovora na antigene, kao što su hapteni (Ptak i drugi, 1980; Vocanson i drugi, 2009), međutim danas prevladava mišljenje da ove ćelije imaju pre tolerogenu nego senzibilisuću aktivnost. Na mišjem modelu bolesti

pokazano je da odsustvo Langerhansovih ćelija, izazvano topikalnom primenom kortikosteroida, uklanjanje slojeva epiderma pomoću lepljivih traka ('stripovanje') (Grabbe i drugi, 1995), ili uvođenjem receptora za toksin difterije (DTR) u gen za humani langerin (Kaplan i drugi, 2005; Bobr i drugi, 2010), povećava intenzitet reakcije KP. Pretpostavlja se da Langerhansove ćelije, nakon migriranja u dLČ 3-4 dana nakon nanošenja haptena, intereaguju sa  $CD4^+$  T ćelijama, što dovodi do povećane produkcije IL-10, citokina koji inhibira  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T ćelije specifične za haptenu (Igyarto i drugi, 2009). Eksperimenti u kojima su Langerhansove ćelije uklonjene u različitim fazama reakcije KP, pokazali su da ove ćelije imaju supresivnu ulogu prvenstveno u toku senzibilizacije, a ne i elicitarne reakcije (Kaplan i drugi, 2005). Dobijeni su i suprotni rezultati, koji su pokazali da kod miševa sa odsustvom Langerhansovih ćelija, izazvanim preko sistema DTR/DT, reakcija KP je ili nepromenjena ili smanjena (Bennett i drugi, 2005). Neusaglašeni rezultati verovatno su posledica korišćenja različitih genetski modifikovanih sojeva miševa, različitih haptena i procedura u izazivanju KP, kao i činjenice da langerin poseduju i druge ćelije pored Langerhansovih (Vocanson i drugi, 2009).

Novija istraživanja na miševima identifikovala su dermne DČ kao prve ćelije koje migriraju u dLČ nakon nanošenja haptena, gde izazivaju T-ćelijsku proliferaciju bitnu za indukciju KP (Fukunaga i drugi, 2008). Kod ljudi se u dermu nalazi nekoliko populacija DČ, koje se od mišjih razlikuju po ekspresiji površinskih markera, kao i po poreklu (Burke i Anandasabapathy, 2011). DČ derma kod ljudi karakteriše konstitutivna ekspresija receptora DC-SIGN (CD209) (Toebak i drugi, 2009), lektina tipa C bitnog u aktivaciji i migraciji DČ, kao i u aktivaciji T ćelija (Soilleux i drugi, 2002), a kod miševa ekspresija CD11c molekula i odsustvo makrofagnog markera kao što je F4/80 (Valladeau i Sealand, 2005). I kod ljudi i kod miševa u dermu su prisutne langerin<sup>+</sup> DČ, koje se razlikuju od epidermalnih Langerhansovih ćelija (Valladeau i Sealand, 2005). Pokazano je da se KP može izazvati nakon adoptivnog transfera dermalnih DČ izolovanih iz miševa senzibilisanih sa FITC-om, ali ne i Langerhansovih ćelija (Kumamoto i drugi, 2009). Sugerisano je da su upravo langerin<sup>+</sup> dermne DČ bitne za indukciju KP kod miševa (Bursh i drugi, 2007). Nasuprot tome, kod miševa sa delimičnim ili potpunim odsustvom ekspresije gena za transkripcioni faktor Batf, značajan za razvoj DČ, a koji pokazuju konstitutivno odsustvo  $CD103^+$  langerin<sup>+</sup> dermalnih DČ, reakcija KP se razvija

neometano, ukazujući da ove ćelije nisu neophodne za razvoj KP (Edelson i drugi, 2010). Velike razlike u podacima koje se dovode u vezu sa različitim eksperimentalnim uslovima, ukazuju na neophodnost razvoja novih modela koji će sa većom preciznošću utvrditi ulogu epidermalnih i dermalnih DC u razvoju KP.

#### 1.4.1.2.3. Mast ćelije

Ćelije veoma bitne za razvoj urođene i adaptivne imunosti u raznim organima su *mast ćelije*. One su najbrojnije na mestima kontakta organizma sa spoljašnjom sredinom, kao što su derm kože i mukoza gastrointestinalnog i respiratornog trakta, gde su lokalizovane oko krvnih i limfnih sudova, i nervnih završetaka. One su važne za gotovo svaki aspekt imunskog odgovora u zdravom ili bolesnom tkivu, uključujući inicijaciju, modulaciju i regulaciju (Matsue i drugi, 2009). Mast ćelije iskazuju visoko afinitetni receptor za imunoglobulin (Ig) E (FcεRI), i nakon aktivacije preko ovog receptora, one odgovaraju produkcijom raznih imunološki aktivnih supstanci, kao što su histamin, proteaze, proteoglikani i TNF-α, koji dovode do reakcije rane preosetljivosti (Kaplan i drugi, 2009). Ove ćelije mogu da se aktiviraju i putem nezavisnim od IgE, pomoću produkata komplementne kaskade i citokina (Navi i drugi, 2007). Same mast ćelije proizvode mnoge proinflamatorne medijatore kao što su citokini IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-13, TNF-α i hemokini CC-hemokinski ligand 2 (CCL2), CCL3, CCL4 (Kaplan i drugi, 2009).

Mast ćelije imaju različit efekat na funkciju DC. Kod ljudi ove ćelije mogu da podstaknu sazrevanje DC *in vitro* (Kitawaki i drugi, 2006), kod miševa *in vivo* podstiču migraciju DC zahvaljujući oslobađanju histamina (Jawdat i drugi, 2004) ili TNF-α (Suto i drugi, 2006), ili inhibiraju migraciju Langerhansovih ćelija kod miševa produkcijom prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (Angeli i drugi, 2001). Ove ćelije mogu da utiču na migraciju leukocita na mesto zapaljenske reakcije, kao i na Th1/Th2 polarizaciju (Navi i drugi, 2007).

Iako je poznato da mast ćelije učestvuju u reakciji KP, njihova uloga je kontroverzna. Korišćenjem BALB/c i C3H/HeN miševa, pokazano je da su mast ćelije bitne za indukciju KP na DNFB: nakon aktivacije mast ćelija u koži, usled nanošenja

haptena, one migriraju u dLČ gde putem produkcije CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), podstiču infiltraciju T ćelija u čvorove (Wang i drugi, 1998). Ispitivanja na miševima sa mutacijom u *c-kit* proto-onkogenu (*Kit*<sup>W/W-v</sup> soj) koji kodira receptor sa tirozin-kinazom aktivnošću (eksprimiranom u intersticijalnim ćelijama Cajala, u ćelijama hematopoeze, melanocitima i mastocitima), a kod kojih su mast ćelije kongenitalno (urođeno) odsutne, pokazala su da ova mutacija smanjuje ili ne utiče na intenzitet reakcije KP (Galli i Hammel, 1984). Sa druge strane, korišćenjem *Kit*<sup>W/W-v</sup> miševa sugerisana je i imunosupresivna uloga mast ćelija, u kasnoj fazi reakcije KP na alergene iz urušiola, biljnog soka otrovnog bršljena, posredstvom produkcije IL-10 (Grimbaldeston i drugi, 2007). Kontradiktorni rezultati dobijeni korišćenjem *Kit*<sup>W/W-v</sup> miševa mogu biti posledica urođenog odsustva i drugih ćelijskih tipova usled mutacije u *c-kit* genu, ali i postojanja kompenzatornih mehanizama koji bi mogli da modulišu funkciju imunskog sistema. Pa tako, korišćenjem miševa kod kojih su mast ćelije kondicionalno i specifično uklonjene (Mas-TRECK miševi), pokazan je značaj ovih ćelija u indukciji reakcije, usled njihove interakcije sa DČ, tj. stimulacije migracije i sazrevanja DČ (Otsuka i drugi, 2011).

Retki su radovi koji ispituju ulogu mast ćelija u alergijskom kontaktnom dermatitisu kod ljudi. Dvorak i saradnici su pokazali da kod ljudi, nanošenje DNCB-a i urušiola rezultira izraženim promenama u dermalnoj mikrovaskulaturi i mast ćelijama (Dvorak i drugi, 1976).

#### **1.4.1.2.4. T ćelije u koži**

Normalna, zdrava koža, sadrži više od dvostrukog broja T ćelija prisutnih u krvi (Nestle i drugi, 2009). U normalnom epidermu nalazi se heterogena populacija T ćelija, od kojih su najzastupljenije memorijske CD8<sup>+</sup> ćelije sa  $\alpha\beta$  T ćelijskim receptorom (eng. TCR, T Cell Receptor). U dermu je prisutan podjednak broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija, koje su većinom memorijske ćelije koje eksprimiraju CLA (eng. Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) (Nestle i drugi, 2009). Nedavna istraživanja su sugerisala da glavnu ulogu u imunskoj homeostazi i patološkim procesima kože imaju upravo rezidentne T ćelije, a ne migratorne T ćelije. Rezidentne memorijske T ćelije predstavljaju prvu liniju

odbrane nakon ponovnog kontakta kože sa antigenom i otuda se smatraju bitnim efektorskim ćelijama u tkivnoj patologiji (Nestle i drugi, 2009).

U koži se nalaze i takozvane nekonvencionalne T ćelije urođene imunosti, od kojih su najbrojnije  $\gamma\delta$  T ćelije i NKT ćelije.

#### 1.4.1.2.4.1. $\gamma\delta$ T ćelije

Kod ljudi  $\gamma\delta$  T ćelije čine samo mali deo dermni i epidermni T ćelija, dok kod miševa  $\gamma\delta$  ( $V\gamma 5^+$ ) dendritične epidermne T ćelije (eng. DETC, Dendritic Epidermal T Cells) čine više od 90% epidermni T ćelija (Nestle i drugi, 2009). Smatra se da DETC lokalno suprimiraju zapaljensku reakciju na alergene i patogene u kojoj učestvuju konvencionalne  $\alpha\beta$  T ćelije (Girardi i drugi, 2006).

Istraživanja na miševima sa odsustvom  $\gamma\delta$  T ćelija sugerisala su regulatornu ulogu ovih ćelija u senzibilizaciji reakcije KP na DNFB i OXAZ, putem direktne inhibicije haptenspecifičnih  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T ćelija (Guan i drugi, 2002). Međutim, pokazano je da delecija gena za  $\delta$  lanac TCR ( $\delta^{-/-}$  miševi), koja je u osnovi odsustva  $\gamma\delta$  T ćelija, ima različit efekat kod pojedinih sojeva miševa. Kod C57BL/6 miševa, ova mutacija ne utiče na intenzitet reakcije KP, za razliku od mutacije toga gena na FVB ili NOD genetičkoj pozadini, koja vodi razvoju spontanog dermatitisa i intenzivnijoj reakciji KP. Adoptivnim transferom sugerisano je da su DETC neophodne i dovoljne za supresiju spontanog dermatitisa kod FVB  $\delta^{-/-}$  miševa (Girardi i drugi, 2002). Mehanizam kojim bi DETC suprimirale KP još uvek nije potpuno razjašnjen. O  $\gamma\delta$  T ćelijama u koži ljudi se manje zna, ali se smatra da bi mogle biti funkcionalno ekvivalentne invarijantnim epidermnim  $\gamma\delta$  T ćelijama kod glodara (Kaplan i drugi, 2012).

#### 1.4.1.2.4.2. Invarijantne NKT ćelije

*Invarijantne (nepromenljive) NKT (iNKT) ćelije* čine populaciju T ćelija koje iskazuju  $\alpha\beta$  TCR ograničenog repertoara (invarijantni), a prepoznaju lipidne antigene prezentovane u kompleksu sa CD1d molekulom, koji je sličan MHC molekulu klase I (Balato i drugi, 2009).

Na mišjem modelu KP ispitivano je učešće NKT ćelija u ovoj reakciji, najviše u fazi senzibilizacije (Askenaze i drugi, 2001; Campos i drugi, 2003; Nieuwenhuis i drugi, 2005). Sugerisano je da aplikacija haptena izaziva lokalno oslobađanje endogenih glikolipida, nekoliko minuta nakon senzibilizacije (Askenaze i drugi, 2001). Ovi glikolipidi vezuju se za CD1d molekul na površini APC, što vodi aktivaciji iNKT ćelija, koje u jetri produkcijom IL-4 podstiču aktivaciju B1-ćelija (B ćelije urođene imunosti). Aktivisane B1-ćelije migriraju u slezinu gde produkuju haptenspecifična IgM antitela, koja su neophodna za fazu elicitanje (Campos i drugi, 2006a, 2006b). Nedavno je pokazano da davanje  $\alpha$ -galaktozilceramida ( $\alpha$ -GalCer), potentnog aktivatora NKT ćelija, u toku senzibilizacije miševa sa DNFB-om, povećava intenzitet i dužinu trajanja reakcije KP nakon elicitanje (Gorbachev i Fairchild, 2006). Naime NKT ćelije stimulišu migraciju dendritičnih ćelija kože u dLČ, što rezultira povećanom aktivacijom CD8<sup>+</sup> T ćelija specifičnih za haptens (Gorbachev i Fairchild, 2006). Pretpostavlja se da je interakcija DC i iNKT ćelija uključena u sazrevanje (i migraciju) DC kože, u fazi senzibilizacije i elicitanje, i da ova interakcija dovodi do produkcije citokina od strane iNKT ćelija bitnih za aktivaciju drugih ćelija uključenih u razvoj reakcije (Nieuwenhuis i drugi, 2005). Grupa istraživača je pokazala da su NKT ćelije česte u T ćelijskom infiltratu u koži u fazi elicitanje AKD kod ljudi, gde produkuju IL-4 i IFN- $\gamma$  (Gober i Gaspari, 2008).

#### 1.4.1.3. Adaptivna imunost u fazi senzibilizacije: aktivacija haptenspecifičnog imunskog odgovora

AKD zavisi od aktivacije T ćelija specifičnih za haptens u toku faze senzibilizacije. Adoptivni transfer T ćelija iz senzibilisanih u naivne miševe omogućava prenos senzibilizacije, dok uklanjanje T ćelija kod senzibilisanih miševa inhibira



reakciju KP (Vocanson i drugi, 2009). T-ćelijska aktivacija zavisi od kombinacije tri različita signala. Prvi signal podrazumeva interakciju TCR sa kompleksom haptena i MHC molekula na površini DĆ, drugi signal obezbeđuju kostimulatorni molekuli, a treći produkovani citokini (Vocanson i drugi, 2009). Odsustvo poslednja dva signala dovodi do apoptoze T ćelija ili anergije, uprkos prisustvu antigena.

U reakciji KP, nakon migracije DĆ u dLČ, kompleks haptena i peptida vezan za MHC molekule klase I i II na površini DĆ prepoznaju haptenspecifične CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T ćelije, redom. *In vitro* istraživanja sa trinitrofenolom (TNP) kao haptenom, pokazala su da i CD8<sup>+</sup> (Martin i drugi, 1992) i CD4<sup>+</sup> (Kohler i drugi, 1997) T ćelije svojim TCR prepoznaju haptenski epitop, nezavisno od amino-kiselinske sekvence bočnog lanca proteina za koji je haptenski vezan, i nezavisno od MHC haplotipa.

Za efikasnu aktivaciju T ćelija neophodna je interakcija kostimulatornih molekula na površini DĆ, članova B7 familije CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2), kao i CD40, sa odgovorajućim molekulima na površini T ćelija. DĆ nakon sazrevanja ekspimiraju CD80 i CD86, koji mogu da se vežu za CD28 molekul ekspimiran konstitutivno na T ćelijama, a koji je neophodan za razvoj KP kod miševa (Kondo i drugi, 1996). Kod miševa je pokazano da je ekspresija B7-2 na Langerhansovim ćelijama bitna za aktivaciju efektorskih T ćelija u fazi senzibilizacije, dok je B7-1 odgovoran za ograničenje razvoja CD4<sup>+</sup> Th2 regulatorne komponente, čime se omogućava efikasan imunski odgovor nakon elicitanje (Xu i drugi, 1997a). Iako je prvobitno pokazano da aktivacija specifičnih CD8<sup>+</sup> T ćelija u fazi senzibilizacije ne zavisi od CD40-CD40L interakcije (Gorbachev i drugi, 2001a), kasnije istraživanje je sugerisalo da angažovanje CD40 molekula na površini Langerhansovih ćelija u ovoj fazi stimuliše aktivaciju efektorskih T ćelija (Gorbachev i Fairchild, 2004). Interakcija T ćelija sa DĆ može imati za posledicu i inhibitorni efekat sa ciljem ograničavanja preterane T ćelijske aktivacije, sa CTLA-4/CD80 ili CTLA-4/CD86 interakcijom kao glavnim inhibitornim putevima (Vocanson i drugi, 2009). Pokazano je da je aktivacija CTLA-4 na T ćelijama bitna za toleranciju izazvanu UV-zračenjem kod senzibilisanih miševa (Schwarz i drugi, 2000). Značaj CTLA-4 aktivacije u regulaciji alergijskog kontaktnog dermatitisa pokazan je i kod ljudi (Levings i drugi, 2002).



Interakcija TCR sa kompleksom haptenu/peptid i MHC molekul, i obezbeđivanje kostimulatornog signala, započinje aktivacionu kaskadu koja dovodi do proliferacije i diferencijacije T ćelija specifičnih za haptenu (Rustemeyer i drugi, 2012). Kao što je već pomenuto, produkcija citokina, od kojih mnoge proizvode DC, takođe je neophodna za T-ćelijsku aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju (Vocanson i drugi, 2009). Ubrzo nakon nanošenja haptenu u fazi senzibilizacije KP, ćelije dLČ započinju proliferaciju (Saint-Mezard i drugi, 2004a), zavisnu od produkcije IL-1, IL-2 i IL-6 (Hope i drugi, 2000; Nakae i drugi, 2001), mada pojedini istraživači dovode u pitanje povezanost produkcije IL-6 i limfoproliferativne aktivnosti u dLČ nakon senzibilizacije pojedinih sojeva miševa (Lappin i drugi, 1998). Klinička i eksperimentalna istraživanja sugerisala su značaj i  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T ćelija za razvoj AKD (Kalish i Johanson, 1990; Kalish i drugi, 1994; Gocinski i Tigelaar, 1990). Tip citokina koji se proizvodi u toku interakcije T ćelije i DC određuje diferencijaciju aktivisanih  $CD8^+$  i  $CD4^+$  T ćelija. IL-12, IL-4 ili kombinacija IL-6/IL-21/IL-23 sa ili bez TGF- $\beta$ , podstiču diferencijaciju naivnih T ćelija u Th1/tip1 ćelije (koje proizvode IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$ ), Th2/tip2 ćelije (proviđuju IL-4, IL-10, IL-13 i IL-5) ili Th17/tip17 ćelije (proviđuju IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22), redom (Vocanson i drugi, 2009). Istraživanja na miševima pokazala su da je polarizacija T ćelija tipa 1 neophodna za optimalan razvoj AKD (Vocanson i drugi, 2009). Xu i drugi su pokazali da nakon senzibilizacije miševa sa DNFB-om i OXAZ-om, u dLČ dolazi do polarizacije dve funkcionalno različite populacije T ćelija: efektorskih  $CD8^+$  T ćelija (Tc1) koje proizvode IFN- $\gamma$ , i  $CD4^+$  T ćelija (Th2) sa negativnom regulatornom ulogom, koje proizvode IL-4/IL-10 (Xu i drugi, 1996). Ova grupa je sugerisala da je diferencijacija  $CD4^+$  T ćelija ka Th2 profilu verovatno posledica odsustva ili niske produkcije IL-12 u toku senzibilizacije specifičnih T ćelija, s obzirom da razvoj Th1 ćelija uglavnom zavisi od prisustva ovog citokina. Aktivacija protektivnog Th2 imunskog odgovora u fazi senzibilizacije ima za ulogu ograničenje imunске aktivnosti koja može dovesti do imunopatologije. U vezi sa tim, pokazano je da tretman životinja sa anti-IL-4-antitelima u toku senzibilizacije intenzivira ekspresiju KP (Xu i drugi, 1996; Gorbachev i drugi, 2001b). Nasuprot ovim istraživanjima, postoje podaci i o značaju IL-4 za indukciju i razvoj KP kod miševa (Yokozeki i drugi, 2000), kao i podaci da uloga IL-4 u indukciji KP zavisi od genetičke pozadine korišćenih miševa (Nagai i drugi, 2000). Nedavno, produkcija IL-17 u fazi

senzibilizacije je zabeležena kod miševa (He i drugi, 2006) i ljudi (Larsen i drugi, 2008), i sugerisan je značaj Th17 ćelija za razvoj efektorskih T ćelija u ovoj fazi KP (He i drugi, 2009).

#### **1.4.1.3.1. Nastanak efektorskih i memorijskih T ćelija**

Nakon aktivacije T ćelija specifičnih za haptenu u fazi senzibilizacije, one napuštaju dLČ usled promene u ekspresiji hemokinskih receptora, i ulaze u cirkulaciju (Vocanson i drugi, 2009). Specifične T ćelije kod kojih se smanjuje ekspresija CCR7, gube sposobnost recirkulacije i migracije u LČ. CCR7<sup>-</sup> T ćelije čine efektorske i efektorske memorijske T ćelije (ćelije periferne memorije) koje migriraju u periferna tkiva, pre svega kožu. Ove ćelije ekspimiraju CCR4 i/ili CCR10,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin i CLA, koji su neophodni za njihovu migraciju u kožu (Vocanson i drugi, 2009). CCR7<sup>+</sup> specifične T ćelije čine drugu populaciju memorijskih ćelija, takozvane centralne memorijske ćelije, i one zadržavaju sposobnost recirkulacije između krvi i LČ, ali ne migriraju u periferna tkiva. Efektorske i efektorske memorijske T ćelije obezbeđuju brz i efikasan imunski odgovor nakon ponovnog kontakta kože sa haptenom, dok centralne memorijske ćelije imaju ulogu u očuvanju relativno visoke zastupljenosti T ćelija specifičnih za haptenu (Sallusto i drugi, 1999; Vocanson i drugi, 2009).

#### **1.4.2. Faza elicitacije**

Ponovni kontakt kože sa haptenom kod senzibilisanih životinja aktivira ćelije urođene imunosti kože, usled proinflamatorne aktivnosti samog haptena, što dovodi do aktivacije i migracije senzibilisanih haptenu-specifičnih T ćelija u derm i epiderm tretirane kože. Zapaljenska reakcija nastala usled ispoljavanja efektorskih aktivnosti ćelija urođene imunosti i T ćelija specifičnih za haptenu dovodi do razvoja karakterističnih kožnih lezija.

#### **1.4.2.1. Dinamična interakcija ćelija urođene i adaptivne imunosti u fazi elicitanije**

Ekspresija i intenzitet reakcije KP zavise od događaja u fazi senzibilizacije, sa aktivacijom B ćelijske imunosti kao važnim faktorom. Nakon elicitanije miševa, haptenspecifična IgM antitela, produkovana od strane B1 ćelija u fazi senzibilizacije, stvaraju kompleks sa haptenom, koji aktivira komplement klasičnim putem i vodi lokalnom nastanku C5a (Szczepanik i drugi, 2003). Vezivanjem za svoj receptor na površini mast ćelija i trombocita, C5a stimuliše ove ćelije da oslobađaju vazoaktivni serotonin i TNF- $\alpha$ , što dovodi do povećanja lokalne mikrovaskularne propustljivosti i aktivacije endotelnih ćelija (Szczepanik i drugi, 2003). Povećana ekspresija adhezivnih molekula E- i P-selektina i njihovih liganada VCAM-1 (eng. Vascular Cell Adhesion Molecule 1) i ICAM-1 (eng. Intercellular Adhesion Molecule 1) na površini endotelnih ćelija, stimuliše migraciju senzibilisanih CD8<sup>+</sup> T ćelija specifičnih za haptenspecifičnu reakciju. Endotelne ćelije preuzimaju haptenspecifičnu reakciju i prezentuju ga pristiglim senzibilisanim CD8<sup>+</sup> T ćelijama iz krvi, što dovodi do njihove aktivacije i produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17 (Kish i drugi, 2011). Ovi citokini dalje stimulišu endotelne ćelije da produkuju hemokine CXCL1 i CXCL2, koji su odgovorni za infiltraciju neutrofila u kožu. Pretpostavlja se da CD8<sup>+</sup> T ćelije ne migriraju u tkivo bez prethodne infiltracije neutrofila, kao i da je produkcija T-ćelijskih hemoaktraktanata i metaloproteinaza od strane neutrofila neophodna za kasniju infiltraciju efektorskih T ćelija u kožu (Kish i drugi, 2009). U vezi sa tim, pokazano je da intenzitet migracije neutrofila na mesto elicitanije reakcije kontroliše infiltraciju T ćelija specifičnih za haptenspecifičnu reakciju (Engeman i drugi, 2004). Rezultati koji pokazuju da uklanjanje neutrofila odgovarajućim antitelima inhibira KP, potvrđuju značaj ovih ćelija za ekspresiju reakcije KP (Dilulio i drugi, 1999). Infiltracija neutrofila na mesto elicitanije pod kontrolom je dva medijatora, TNF- $\alpha$  i MIP-2, za koje je pokazano da ih produkuju mast ćelije (Biedermann i drugi, 2000).

#### 1.4.2.2. Produkcija medijatora inflamacije u koži nakon elicitacije

Kompleksna produkcija citokina i hemokina nakon prvog talasa migracije T ćelija na mesto elicitacije odgovorna je za drugi talas infiltracije ćelija u kožu, koji uključuje neutrofilne leukocite, T ćelije i inflamatorne monocite (Vocanson i drugi, 2009). *In situ* imunohistohemijska analiza isečaka obolele kože pacijenata sa AKD, pokazala je povećanu zastupljenost ćelija koje proizvode IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (Hoefakker i drugi, 1992; Ulfgren i drugi, 2000). U koži miša nakon elicitacije zabeleženo je povećanje ekspresije gena za IL- $\beta$ , IL-10, IL-6 i GM-CSF (eng. Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor) (Kondo i drugi, 1994).

TNF- $\alpha$  je značajan za ekspresiju KP na šta ukazuju podaci o smanjenju otoka uha nakon elicitacije reakcije kod miševa čija je koža tretirana sa anti-TNF- $\alpha$  antitelima neposredno pre elicitacije (Piguet i drugi, 1991). Pored toga, histološka analiza isečaka kože uha nakon elicitacije miševa sa delimičnim ili potpunim odsustvom ekspresije gena za TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha^{-/-}$ ) pokazala je smanjenu vaskularnu propustljivost i smanjen broj inflamatornih ćelija u dermu (neutrofila, mononukleara i eozinofila), u odnosu na miševu kod kojih je ovaj gen ekspimiran (wild type) (Shibata i drugi, 2005). *In situ* hibridizacija pokazala je da su izvor ovog citokina pretežno bazalni keratinociti, ali da ga proizvode i ćelije dermalnog infiltrata (Piguet et al., 1991).

Inhibicija KP kod miševa sa delimičnim ili potpunim odsustvom ekspresije gena za IL-1 (IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$ ) u fazi elicitacije se prevazilazi dodavanjem TNF- $\alpha$ . Pretpostavlja se da IL-1 podstiče ekspresiju TNF- $\alpha$  u fazi elicitacije, koji dalje, posredstvom IP-10, podstiče migraciju inflamatornih ćelija u kožu. Takođe, TNF- $\alpha$  podstiče ekspresiju iRNK za IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , što sugeriše da ovi citokini amplifikuju međusobnu ekspresiju (Nakae i drugi, 2003).

Iako je produkcija IL-2 povećana u uhu nakon elicitacije miševa, nezavisno od korišćenog haptena (Ulrich i drugi, 2001), kao i u koži pacijenata nakon izlaganja kontaktnom alergenu (Ulfgren i drugi, 2000), eksperimentalna istraživanja ukazuju na to da ovaj citokin nije neophodan za ekspresiju reakcije KP. Naime, korišćenje miševa sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za IL-2 (IL-2 $^{-/-}$ ) (Hope i drugi,

2000), ili tretman miševa sa anti-IL-2R antitelima pre elicitacije (Piguet i drugi, 1991), nisu uticali na intenzitet reakcije KP.

Hope i drugi su pokazali da, iako **IL-6** doprinosi proliferaciji T ćelija nakon senzibilizacije miševa, uloga ovog citokina nije kritična za indukciju efektorskih ćelija, već za razvoj zapaljenske reakcije na mestu elicitacije reakcije, verovatno podsticanjem infiltracije leukocita (Hope i drugi, 2000). Povećanje produkcije IL-6, zajedno sa povećanjem nivoa akutno-faznih proteina, zabeleženo je i u plazmi životinja nakon elicitacije. Korelacija koncentracije cirkulišućeg IL-6 sa otokom uha, ukazuje na značaj ovog citokina u ekspresiji reakcije (Kimber i drugi, 1990), moguće efektom na oslobađanje granulocita iz koštane srži ili marginalnog pula u cirkulaciju (Ulrich i drugi, 1989).

**Azot monoksid (NO)** je biološki medijator koji je u malim koncentracijama važan za procese kao što su vazodilatacija i neurotransmisija, dok u većim koncentracijama ima značajnu ulogu u odbrani organizma od različitih parazita i tumorskih ćelija (Ross i drugi, 1998). Fiziološka uloga NO značajna je u održavanju homeostaze u koži, ali ovaj medijator može doprineti i razvoju kožnih bolesti (Weller, 2003). Ross i drugi su pokazali da elicitacija miševa povećava ekspresiju gena za iNOS (eng. inducible Nitric Oxide Synthase), jednog od tri izoenzima neophodnih za produkciju NO, u keratinocitima i Langerhansovim ćelijama, sugerišući ulogu ovog medijatora u ekspresiji reakcije KP (Ross i drugi, 1998). iNOS reaktivnost zabeležena je i u oboleloj koži pacijenata sa AKD (Ford i drugi, 1997).

Migracija leukocita je obeležje imunskog odgovora, a **hemokini** su faktori važni u njenoj regulaciji, kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima. Analiza isečaka kože (hibridizacijom *in situ*) senzibilisanih osoba nakon nanošenja alergena pokazala je kompleksnu ekspresiju različitih citokina sa hemoatraktantnim svojstvima, koji vremenski i prostorno kontrolišu migraciju leukocita na mesto elicitacije (Goebeler i drugi, 2001) (nazivi hemokina koji učestvuju u ekspresiji kontaktne preosetljivosti i njihovi receptori predstavljeni su u Tabeli 1). Najranije produkovani hemokin je **CCL2**, prisutan u bazalnom epidermu već šestog časa nakon kontakta kože sa haptenom, kao posledica proinflamatornog efekta samog haptena. Početna infiltracija limfocita u derm kože stimulisana je produkcijom hemokina **CCL5, CCL2, CCL17, CCL18** i/ili **CCL22**

u dermu. Dalje (nakon 48h), povećana ekspresija **CXCL9** i **CXCL10** u epidermu obezbeđuje hemoatraktantni signal za T limfocite koji eksprimiraju receptor CXCR3 (Goebeler i drugi, 2001), i koji čine 70% T limfocita koji su migrirali u obolelu kožu kod pacijenata sa AKD (Sebastiani i drugi, 2002). Komparativna analiza zastupljenosti hemokinskih receptora na površini CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija specifičnih za nikl, pokazala je povećanu ekspresiju CXCR3 na CD8<sup>+</sup> i CCR4 na CD4<sup>+</sup> T ćelijama, ukazujući da obrazac migracije ove dve populacije ćelija može biti pod kontrolom produkovanih hemokina (Sebastiani i drugi, 2002). U KP kod miševa takođe je pokazano učešće hemokina CXCL10 (Nakae i drugi, 2003; Gautam i drugi, 1994) i CCL2 (Gautam i drugi, 1994) u ekspresiji reakcije, posredstvom stimulacije migracije T ćelija specifičnih za hapten u kožu. Za migraciju neutrofila u obolelu kožu su odgovorni hemokini **CXCL1** i **CXCL8** kod ljudi (Sebastiani i drugi, 2002; Dilulio i drugi, 1999), tj. **CXCL2** (funkcionalni analog humanog IL-8) kod miševa (Biedermann i drugi, 2000). U rezoluciji kontaktne preosetljivosti hemokini **CCL1** i **CCL20** mogu imati značajnu ulogu, putem stimulacije migracije CCR8<sup>+</sup> regulatornih T ćelija koje proizvode IL-10 (Tr ćelije) i CCR8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatornih T ćelija, redom, u kožu (Sebastiani i drugi, 2002; Varona i drugi, 2001).

**Tabela 1. Nazivi hemokina i odgovarajućih receptora uključenih u ekspresiju kontaktne preosetljivosti**

Strukturni naziv	Drugi naziv	Čovek	Miš	Receptor
CXCL1	<b>Gro-α</b> (eng. Growth-Related Oncogene-α)	+	+	CXCR1, CXCR2
CXCL2	<b>MIP-2</b> (eng. Macrophage Inflammatory Protein-2)		+	CXCR2
CXCL8	<b>IL-8</b>	+		CXCR1, CXCR2
CXCL9	<b>Mig</b> (eng. Monokine-induced by interferon-γ)	+	+	CXCR3
CXCL10	<b>IP-10</b> (eng. Interferon induced Protein-10)	+	+	CXCR3
CCL1	<b>I-309</b>	+	+	CCR8
CCL2	<b>MCP-1</b> (eng. Monocyte Chemotactic Protein-1)	+	+	CCR2
CCL5	<b>RANTES</b> (eng. Regulation and Activated Normal T cell-expressed and –secreted)	+	+	CCR1, CCR3, CCR5

Strukturni naziv	Drugi naziv	Čovek	Miš	Receptor
CCL17	<b>TARC</b> (eng. Thymus- and activation-regulated chemokine)	+	+	CCR4
CCL18	<b>PARC</b> (eng. Pulmonary and activation-regulated chemokine)	+		PITPNM3
CCL20	<b>MIP-3<math>\alpha</math></b>	+	+	CCR6
CCL22	<b>MDC</b> (eng. Macrophage-Derived Cytokine)	+	+	CCR4

### 1.4.2.3. Efektorski mehanizmi u elicitaciji reakcije KP kod pacova

#### 1.4.2.3.1. Uloga Th1/tip1 i Th17/tip17 ćelija

Iako su prvobitna istraživanja kod ljudi sugerisala da je alergijski kontaktni dermatitis posredovan CD4<sup>+</sup> T ćelijama (Vocanson i drugi, 2009), na mišjem modelu bolesti je pokazano da su zapravo CD8<sup>+</sup> T ćelije specifične za haptenu, koje proizvode IFN- $\gamma$ , glavne efektorske ćelije (Vocanson i drugi, 2009). Kasnija istraživanja kontaktne preosetljivosti na nikl kod ljudi potvrdila su značaj CD8<sup>+</sup> efektorskih T ćelija (Cavani i drugi, 2001). Detekcija IL-17 u kožnim lezijama pacijenata sa AKD, kao i izolacija CD4<sup>+</sup> T ćelija specifičnih za nikl koje proizvode IL-17 iz periferne krvi i kožnih lezija pacijenata ukazala su na značaj ovog citokina u ekspresiji bolesti (Cavani i drugi, 2000). Sugerisano je da IL-17, zajedno sa IFN- $\gamma$  i IL-4, stimuliše aktivaciju keratinocita nakon elicitacije, i samim tim ekspresiju adhezivnih molekula i produkciju citokina i hemokina od strane ovih ćelija (Albanesi i drugi, 2000). Kod miševa je pokazano da su CD8<sup>+</sup> T ćelije koje proizvode IL-17 (tip 17 ćelije), zajedno sa citotoksičnim CD8<sup>+</sup> T ćelijama (Tc1) koje proizvode IFN- $\gamma$ , glavne efektorske T ćelije u elicitaciji KP (He i drugi, 2006), kao i da oba citokina doprinose elicitaciji reakcije različitim, još uvek nedovoljno objašnjenim, mehanizmima (He i drugi, 2009). Sugerisano je da IL-17 doprinosi ekspresiji reakcije stimulisanjem migracije leukocita na mesto elicitacije, dok IFN- $\gamma$  stimuliše produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (He i drugi, 2009). Sa druge strane, na miševima sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za receptor za IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) pokazano je da ovaj citokin nije neophodan za ekspresiju KP (Saulnier i drugi, 1995).

Nezavisno od uloge IL-17 i IFN- $\gamma$  u elicitaciji reakcije KP, pokazano je da je citotoksičnost CD8<sup>+</sup> T ćelija zapravo ključna za patogenezu KP, sa keratinocitima kao glavnim metama citotoksične aktivnosti T ćelija (Traidl i drugi, 2000), putem koji uključuje interakciju površnog receptora ćelijske smrti Fas i njegovog liganda FasL, kao i angažovanjem molekula perforina. Pokazano je da kod miševa sa homozigotnim mutacijama koje uslovljavaju odsustvo oba citotoksična puta tj. kod kojih izostaje razvoj citotoksičnih T ćelija (P<sup>0/0</sup> *gld* miševi), ekspresija KP je inhibirana uprkos prisustvu CD8<sup>+</sup> T ćelija koje proizvode IFN- $\gamma$ , na mestu elicitacije reakcije (Kehren i drugi, 1999). Nije poznato da li tip 1 i tip 17 T ćelije iskazuju citotoksičnu aktivnost u različitom stepenu.

Iako su CD8<sup>+</sup> T ćelije identifikovane kao glavne efektorske ćelije, pokazano je učešće i drugih ćelija u efektorskoj fazi odgovora. Premda se smatra da CD4<sup>+</sup> T ćelije imaju prvenstveno regulatornu ulogu, pokazano je da hapten-specifične CD4<sup>+</sup> T ćelije mogu da doprinesu inflamaciji, zajedno sa specifičnim CD8<sup>+</sup> T ćelijama. U *in vitro* uslovima, zapaženo je da klon Th1 ćelija izolovan iz kože i krvi pacijenata obolelih od AKD na nikel, ima sposobnost ubijanja humanih keratinocita, ali samo nakon ekspresije MHC II molekula od strane keratinocita, a pod uticajem IFN- $\gamma$  (Traidl i drugi, 2000). Dakle, za razliku od CD8<sup>+</sup> T ćelija koje imaju direktan citotoksičan efekat na keratinocite i doprinose početnoj apoptozi keratinocita, CD4<sup>+</sup> T ćelije u saradnji sa CD8<sup>+</sup> T ćelijama doprinose tkivnom oštećenju u kasnijoj fazi elicitacije (Traidl i drugi, 2000). Kod miševa, pokazano je da u odsustvu CD8<sup>+</sup> T ćelija, CD4<sup>+</sup> T ćelije mogu imati efektorsku ulogu u KP na DNFB (Gocinski i Tigelaar, 1990), a zapažena je i niža produkcija IFN- $\gamma$  od strane CD8<sup>+</sup> T ćelija, u odnosu na CD4<sup>+</sup> T ćelije, u KP na DNCB (Moussavi i drugi, 1998).

#### **1.4.2.3.2. Uloga Th2 imunskog odgovora**

Priroda, odnosno tip, imunskog odgovora u reakciji KP nije jasno definisana. Kao što je već pomenuto, u humanom AKD i na mišjem modelu bolesti pokazano je da su Tc1/Th1 ćelije glavne efektorske ćelije (Cavani i drugi, 2001; Vocanson i drugi, 2009), dok je na mišjem modelu sugerisana regulatorna uloga Th2/Tc2 ćelija (Xu i drugi,



1996). Pojedini autori, međutim, ukazuju na mogućnost da i Th1 i Th2 ćelije, i njihovi ključni citokini, mogu doprinosti progresiji reakcije KP.

Pokazano je da intravenski tretman miševa sa IL-4 ne utiče na KP kada se primenjuje u vreme senzibilizacije miševa sa TNCB-om, ali da značajno redukuje ekspresiju reakcije kada se primeni u vreme elicitanje životinja, sugerišući da IL-4 utiče na eferentnu, ali ne na aferentnu fazu reakcije (Gautam i drugi, 1992). Slično ovim rezultatima, Asada i drugi su pokazali da se IL-4 produkuje u koži nakon elicitanje miševa sa TNCB-om, i da ima regulatornu ulogu, jer tretman životinja sa anti-IL-4 antitelima jedan čas pre elicitanje značajno povećava otok uha, i ekspresiju IFN- $\gamma$ , IL-2, p40 subjedinice IL-12 i IL-1 $\beta$  u tretiranom uhu (Asada i drugi, 1997). Nasuprot ovim rezultatima, kod BALB/C miševa sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>), kod kojih je intenzitet i dužina trajanja KP smanjena, sugerisan je proinflamatorni karakter ovog citokina, značajan za ekspresiju reakcije KP na DNCB, ali ne i OXAZ (Traidl i drugi, 1999). Kod C57BL/6 miševa sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za IL-4, takođe je pokazan proinflamatorni karakter ovog citokina, značajan za kasniju fazu elicitanje KP na DNFB (Weigmann i drugi, 1997). STAT-6 (eng. Signal Transducer and Activator of Transcription 6), transkripcioni faktor važan za diferencijaciju Th2 ćelija, ključan je u indukciji reakcije KP na TNCB, DNFB i OXAZ, zahvaljujući stimulaciji sinteze IgE (za koji je IL-4 faktor preuključivanja) i infiltraciji eozinofila i neutrofila na mesto elicitanje reakcije (Yokozeki i drugi, 2000). Kod osoba sa AKD na nikl, koje nemaju atopijsku konstituciju, zapaženo je da CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T ćelije specifične za nikl, izolovane iz periferne krvi ili kožnih lezija tih osoba, produkuju IL-4 (samostalno ili u kombinaciji sa IFN- $\gamma$ ) (Werfel i drugi, 1997). Moguće objašnjenje kontradiktornih rezultata o značaju IL-4 u KP ili AKD je dvostruka uloga IL-4, regulatorna ili efektorska, u zavisnosti od količine produkovanog citokina. Nije isključen ni različit doprinos IL-4 u aferentnoj i eferentnoj fazi reakcije KP. Drugi Th2 citokin, IL-10, smatra se prirodnim regulatorom ekspresije KP, s obzirom da neutralizacija ovog citokina produžava trajanje reakcije KP, dok tretman sa rekombinantnim IL-10 (rIL-10) pre elicitanje sprečava ekspresiju reakcije (Ferguson i drugi, 1994). Takođe, kod miševa sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) i IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>), pokazano je da IL-10, ali ne i IL-4, suprimira KP

na OXAZ (Berg i drugi, 1995), što je u saglasnosti sa kasnijim rezultatima koji su pokazali odsustvo efekta IL-4 u reakciji KP na OXAZ (Traidl i drugi, 1999).

Jedan od faktora koji može uticati na ravnotežu između Th1 i Th2 imunskog odgovora u KP je priroda haptena. Pokazano je da je imunski odgovor na haptene kao što su DNCB, TNCB i DNFB pretežno Th1, dok je odgovor na FITC pretežno Th2 tipa (Tang i drugi, 1996; Dearman i Kimber, 2000). Soj miševa takođe može uticati na razvoj dominantnog tipa CD4<sup>+</sup> (Th) ili CD8<sup>+</sup> (Tc) ćelija (Honda i drugi, 2013). Istraživanja su pokazala da ponovljeno nanošenje TNCB može pomeriti odnos sa Th1 ka Th2 tipu imunskog odgovora (Kitagaki i drugi, 1997).

#### **1.4.2.3.3. Druge ćelije uključene u efektorsku fazu reakcije**

$\gamma\delta$  T ćelije mogu da pomažu  $\alpha\beta$  T ćelijama kao što je pokazano u elicitaciji KP na parafenilendiamin (Yokozeki i drugi, 2001). Takođe, pokazano je da je u odsustvu T i B ćelija kod miševa (Rag<sup>-/-</sup> miševi), memorija NK ćelija specifična za haptenu dovoljna za razvoj KP na DNFB, OXAZ i pikril hlorid (O'Leary i drugi, 2006).

#### **1.4.3. Regulacija reakcije KP**

Imunski sistem kože, organa koji je često izložen patogenima i agensima iz spoljašnje sredine, mora biti strogo kontrolisan sa ciljem ograničenja inflamacije izazvane bezopasnim antigenima, a uz održavanje sposobnosti eliminacije patogena. U toku evolucije, nekoliko regulatornih mehanizama se razvilo sa ciljem sprečavanja preteranog oštećenja kože usled prisustva trajnog antigenskog signala, kao i ograničenja hiperplazije limfnih čvorova. Podaci koji ukazuju na to da haptenu može ostati u koži mesecima, pa i godinama, sugerise neophodnost angažovanja ovih regulatornih mehanizama koji će sprečiti preterano tkivno oštećenje u AKD (Vocanson i drugi, 2009).

#### **1.4.3.1. Regulatorni putevi u koži**

Efikasna zaštita kože zavisi od interakcije keratinocita sa ostalim rezidentnim ćelijama kože i ćelijama koje migriraju u kožu. Ova interakcija je posredovana citokinima, održava homeostazu, a njen poremećaj može dovesti do inflamacije (Bernard i drugi, 2012).

Pokazano je da keratinociti konstitutivno eksprimiraju imunosupresivni citokin IL-10, što može biti važno za kontrolu lokalnog imunskog odgovora, kao i da produkcija ovog citokina od strane keratinocita raste već 4 časa nakon nanošenja haptena (Ferguson i drugi, 1994; Enk i drugi, 1992). Ferguson i drugi su pokazali da je produkcija IL-10, pretežno od strane keratinocita, povećana u koži nakon elicitacije miševa, i da tretman životinja sa rIL-10 pre elicitacije inhibira reakciju KP, ukazujući na značaj ovog citokina u regulaciji KP. Pokazano je da inhibitorni efekat UV zračenja na kožu može biti posredovan povećanom produkcijom IL-10 od strane keratinocita (Rivas i Ulrich, 1992). Imunosupresivan efekat IL-10 ogleda se u inhibiciji produkcije proinflamatornih citokina (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ), modulaciji sazrevanja DČ, i inhibiciji aktivnosti efektorskih T ćelija (O'Gara i Vieira, 2004). Sugerisano je i da IL-10 prevodi Langerhansove ćelije iz imunogenog u tolerogeno stanje tako što suprimira ekspresiju B7 (Ding i drugi, 1992; Enk i drugi, 1993b), izazivajući na taj način anergiju T ćelija u dLČ. Pored keratinocita, mast ćelije takođe mogu biti značajan izvor IL-10 u fazi elicitacije kod miševa, i njegova produkcija može suprimirati zapaljensku reakciju u KP regulisanjem broja leukocita u tretiranoj koži (Grimbaldeston i drugi, 2007).

#### **1.4.3.2. Toleranca i regulatorne T ćelije u reakciji KP**

U prisustvu haptena specifičnog signala (kompleksa haptena i MHC molekula) i odgovarajućeg kostimulatornog signala (CD80/CD86) iskazanog na površini APC, naivne T ćelije se aktiviraju i razvijaju u efektorske T ćelije što rezultira senzibilizacijom. Odsustvo kostimulatornog signala, međutim, vodi razvoju imunološke tolerance. U zavisnosti od gustine antigen/MHC kompleksa na površini APC, mogu se izazvati najmanje tri nivoa T ćelijske tolerance: aktivna supresija, anergija ili delecija (Rustemeyer i drugi, 2012).

Visoke koncentracije IFN- $\gamma$ , oslobođene u toku inflamacije, mogu povećati ekspresiju MHC II molekula na površini keratinocita, stimulišući njihovu antigenprezentujuću funkciju CD4<sup>+</sup> T ćelijama (Albanesi i drugi, 1998). Kako keratinociti minimalno ekspimiraju kostimulatorne molekule CD80 i CD86, prezentacija haptena CD4<sup>+</sup> T ćelijama u koži izaziva anergiju (stanje funkcionalne inaktivacije) ili apoptozu T ćelija, čime se intenzitet i dužina trajanja reakcije KP ograničava (Gober i Gaspari, 2008).

Regulacija AKD je aktivni imunološki fenomen, posredovan supresorskim/regulatornim T ćelijama, na šta ukazuju podaci da se u eksperimentalnom modelu bolesti supresija može izazvati adoptivnim transferom limfoidnih ćelija, iz tolerantne u "naivnu" (nesenzibilisanu) životinju (Vocanson i drugi, 2009; Rustemeyer i drugi, 2012). Pretpostavlja se da razvoj bolesti zapravo zavisi od ravnoteže između efektorskih i regulatornih mehanizama. Regulacija AKD može biti podeljena na centralnu fazu, koja kontroliše proliferaciju i diferenciju efektorskih T ćelija u dLČ, i perifernu fazu, koja ograničava inflamatorni proces u koži (Gorbachev, 2001). Regulatorne CD4<sup>+</sup> T ćelije (Treg) koje konstitutivno i u velikoj gustini ekspimiraju  $\alpha$  lanac IL-2 receptora (CD25), CTLA-4 i transkripcioni faktor Foxp3 (eng. Forkhead box p3), smatraju se prvom linijom kontrole imunskog odgovora u AKD (Vocanson i drugi, 2009). Njihovo *in vivo* uklanjanje nakon tretmana miševa sa odgovarajućim antitelima u vreme senzibilizacije, vodi povećanoj proliferaciji CD8<sup>+</sup> T ćelija i intenzivnijoj inflamatornoj reakciji u koži nakon elicitacije reakcije KP (Dubois i drugi, 2003). Kod ljudi, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelije izolovane iz periferne krvi pacijenata alergičnih na nikl pokazuju ograničenu sposobnost da suprimiraju aktivnost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija specifičnih za nikl, za razliku od Treg ćelija izolovanih iz zdravih osoba. Ovi rezultati su sugerisali da se AKD može razviti kao posledica poremećene funkcije Treg ćelija (Cavani i drugi, 2003). Jedan od predloženih mehanizama delovanja Treg je međućelijska interakcija posredstvom CTLA-4 inhibitorynog receptora koji ima visok afinitet vezivanja za CD80/CD86, i inhibira produkciju IL-2 bitnu za proliferaciju efektorskih T ćelija (Gober i Gaspari, 2008). Treg ćelije mogu ekspimirati CLA nakon interakcije sa DC u dLČ, što im omogućava migraciju u kožu (Colantonio i drugi, 2002). U vezi sa tim, Ring i drugi su ukazali na to da Treg suprimiraju reakciju KP blokiranjem migracije efektorskih T ćelija u tretiranu kožu miša. Međutim ova grupa

autora je sugerisala da je produkcija imunosupresivnih citokina, pre svega IL-10, a ne međucelijska interakcija, odgovorna za ovu supresivnu aktivnost Treg (Ring i drugi, 2006). Iako je jasno pokazana uloga ovih ćelija u kontroli imunskog odgovora na mnoge antigene, Treg su ćelije koje još uvek iza sebe ostavljaju više pitanja nego odgovora (Shevach, 2002; Vocanson i drugi, 2009).

Druga populacija Treg ćelija, uključena u kontrolu imunskog odgovora kod ljudi i glodara, su regulatorne ćelije tipa 1 (Tr1) koje se karakterišu po specifičnom citokinskom profilu, tj. po produkciji visoke koncentracije IL-10. Za razliku od prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, koje potiču iz timusa, ove ćelije mogu nastati *in vivo* i *in vitro* nakon antigenske stimulacije u tolerogenim uslovima, tj. u prisustvu IL-10 (Roncarolo i drugi, 2006). U AKD na nikl kod ljudi, Tr1 ćelije specifične za nikl su izolovane iz periferne krvi i kožnih lezija alergičnih osoba, ali u većem broju iz periferne krvi zdravih osoba (Cavani i drugi, 2000). *In vitro*, ove ćelije inhibiraju specifičan Th1 i Tc1 imunski odgovor blokiranjem antigen-prezentujuće funkcije DC i monocita, putem zavisnim od IL-10, i pretpostavka je da na ovaj način ograničavaju preterano tkivno oštećenje kod alergičnih osoba, tj. razvoj bolesti kod osoba koje nisu sklone alergijama (Cavani drugi, 2000). Sugerisano je da Treg ćelije zapravo stimulišu IL-10 produkciju od strane Tr1, i na taj način zajedno funkcionišu sa ciljem ograničenja i suprimiranja imunskog odgovora na haptene (Gober i Gaspari, 2008).

Ponavljano nanošenje suboptimalne doze jakih haptena, kao što su DNFB i OXAZ, izaziva tolerancu koja onemogućava senzibilizaciju efektorskih ćelija i razvoj KP, čak ni nakon primene optimalne doze haptena. Ovaj fenomen označen je kao toleranca niske doze (eng. LZT, Low Zone Tolerance), i ona je posredovana CD8<sup>+</sup> T ćelijama koje produkuju IL-4/IL-10 (Maurer i drugi, 2003). LZT se smatra najzastupljenijim mehanizmom tolerance na haptene kod ljudi (Vocanson i drugi, 2009).

## 1.5. Pacov kao eksperimentalni model za ispitivanje reakcije KP

Iako dosta ispitivana, postoje mnoge kontroverze vezane za reakciju KP. Korišćenje različitih eksperimentalnih procedura, kao i sojeva životinja, pre svega miševa, mogu biti u osnovi oprečnih rezultata dobijenih za pojedine aspekte ove reakcije. Takođe, zbog ekonomskog i tehničkog aspekta (jednostavnost korišćenja, dostupnost velikog broja reagenasa, razvoj velikog broja genetski modifikovanih sojeva) reakcija KP je najviše ispitivana na miševima. Ispitivanje mehanizama ove reakcije i na drugim eksperimentalnim životinjama može dati jasniju sliku patofiziologije bolesti, što može biti bitno u translacionim studijama. U vezi sa tim, pacovi su pre više od dvadeset godina predloženi kao dobar eksperimentalni model za ispitivanje kontaktnih alergija (Scheynius i drugi, 1988), posebno sistemskih manifestacija reakcije, pre svega na perifernu krv i udaljene organe imunskog sistema (Koller i Exon, 1985). Uprkos tome, od tada manji broj podataka je dobijen na pacovskom modelu bolesti, ostavljajući ga u senci mišjeg modela.

Reakcija KP se koristi i kao model za ispitivanje imunosupresivnog i anti-inflamatornog karaktera potencijalnih terapijskih agenasa, kao i za ispitivanje imunotoksičnosti različitih hemikalija (Duprat, 1989). Kao reakcija koja započinje, i ispoljava se u koži, KP je dobar model za ispitivanje imunomodulatornog efekta ksenobiotika koji deluju preko kože, uključujući i fizičke faktore, kao što su zračenje i termičke povrede (Simon i drugi, 1994; Cetinkale i drugi, 1999). Pored mišjeg modela, pacovski model KP koristi se u ove svrhe. Kako je pacov najčešće korišćena vrsta za ispitivanje imunskih funkcija nakon izazivanja termalnih povreda, pacovski model KP se pokazao korisnim za ispitivanje efekta agenasa koji se koriste u tretmanu kod ovih povreda (Cetinkale i drugi, 1999). Pokazano je da je pacovski model KP pogodan za ispitivanje imunomodulatornog efekta fotohemoterapije (Van Iperen i Beijersbergen, 1993; 1997). TCDD (2,3,7,8-Tetrahlrodibenzo-*p*-dioxin), morfin, hormon stresa, samo su neki od agenasa čiji efekat na ćelijsku imunost je ispitivan na modelu KP kod pacova (Walker i drugi, 2004; Nelson i drugi, 1999; Dhabar i McEwen, 1999). Generalno, pacov je najčešće korišćena vrsta u imunotoksikološkim istraživanjima, pre svega zbog svoje veličine i mogućnosti korišćenja različitih organa za analizu, što pacovsku KP čini dobrim modelom za ispitivanje lokalnog i sistemskog imunomodulatornog efekta

raličitih fizičkih i hemijskih agenasa, ali i terapijskih modaliteta u lečenju AKD. U svetlu toga, neophodna je bolja karakterizacija reakcije KP kod pacova.

### **1.5.1. Dosadašnja istraživanja reakcije KP na pacovu**

Mali je broj podataka o mehanizmima reakcije KP kod pacova, pretežno sa akcentom na eferentnoj fazi reakcije. Prop i drugi su prvi optimizovali uslove za senzibilizaciju i elicitaciju KP kod pacova, korišćenjem TNCB-a i DNFB-a (Prop i drugi, 1986). Ova grupa istraživača je pokazala da intravensko ubrizgavanje haptena kod Dark Agouti (DA) pacova izaziva specifičnu supresiju reakcije, posredovanu supresorskim OX8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) T ćelijama, koja deluje na nivou faze indukcije, ali ne i ekspresije reakcije (Prop i drugi, 1986). Kasnije, druga grupa istraživača po prvi put je sugerisala delovanje odvojenog supresorskog mehanizma na nivou eferentne faze reakcije na TNCB kod DA pacova, posredovanog CD8<sup>+</sup> T ćelijama i makrofagima iz slezine i peritonealne šupljine (Nanishi i Battisto, 1990). Rani radovi na DA pacovima pokazali su stimulatorni uticaj IFN- $\gamma$  na ekspresiju MHC II molekula na površini keratinocita, i povećanje ćelijskog infiltrata u dermu (Scheynius i drugi, 1986), stanje karakteristično za kasnu fazu AKD kod ljudi (Scheynius i Tjernlund, 1984). Nasuprot ovim rezultatima, uloga IFN- $\gamma$  u ekspresiji reakcije KP pacova se pokazala kontraverznom, s obzirom da je neutralizacija ovog citokina dovela do smanjenja ekspresije MHC II molekula na keratinocitima, uz povećanje ekspresije reakcije na DNFB kod Lewis (Lew) pacova (Skoglund i drugi, 1988). Takođe, tretman Lew pacova sa rekombinantnim IFN- $\gamma$  pre i u toku elicitacije potvrdio je regulatornu ulogu ovog citokina u ekspresiji reakcije, verovatno u kontekstu samoregulacije (Skoglund i Scheynius, 1990). Dozno-zavisno povećanje produkcije TNF- $\alpha$  i NO u kondicioniranom medijumu organokulture uha kod DA i Albino Oxford (AO) pacova nakon elicitacije sa DNCB-om, ukazalo je na značaj ovih medijatora u ekspresiji reakcije KP kod pacova (Kataranovski i drugi, 2002a; 2002b). Sniženje NO produkcije u kondicioniranom medijumu, zabeleženo je u prisustvu aminoguanidina (Kataranovski i drugi, 2002a), inhibitora NO sa specifičnošću za iNOS kod pacova (Nakane i drugi, 1995). U vezi sa tim, povećanje ekspresije mRNA za iNOS zabeleženo je u koži uha Crl: CD (SD) pacova nakon elicitacije sa DNFB-om (Hartmann i drugi, 2006). Korišćenjem inbrednih



(DA, AO, BN, Lew) i outbrednih (Wistar, SD) sojeva pacova koji razvijaju različit profil imunskog odgovora (Th1/Th2) na iste stimuluse, sugerisan je značaj genetičke pozadine u ispitivanjima reakcije KP. Komparativno ispitivanje KP kod Lew pacova, koji preferencijalno razvijaju Th1 imunski odgovor, i Brown Norway (BN) pacova, sklonih Th2-imunskom odgovoru, pokazalo je intenzivniji otok uha nakon elicitacije Lew pacova, sugerišući značajnu ulogu Th1 ćelija u razvoju eksperimentalne kontaktne alergije kod pacova (Peszkowski i drugi, 1994). Sojne razlike u senzibilizaciji na DNCB pokazane su i kod Wistar (Wi) i BN pacova, s obzirom da senzibilisani BN pacovi pokazuju manje izražene mikroskopske i makroskopske promene u uhu nakon elicitacije, u odnosu na Wi pacove (Kuper i drugi, 2008). Supresivni efekat cirkulišućeg IL-10 na ekspresiju KP kod pacova pokazan je nakon unošenja ekspresionog vektora za humani IL-10 u keratinocite dorzalne kože senzibilisanih pacova, koji razvijaju slabiji otok uha nakon elicitacije (Meng i drugi, 1998). Iako su istraživanja ekspresije reakcije KP na pacovima pretežno vršena na nivou promena u uhu, pojedinačni radovi ispitivali su ovu fazu reakcije na nivou dLČ. Nakon elicitacije BN pacova sa DNCB-om zabeleženo je povećanje produkcije IFN- $\gamma$  i IL-12 u dLČ, uz nižu produkciju IL-10 i odsustvo produkcije ostalih Th2 citokina (IL-4 i IL-13), sugerišući efektorsku ulogu Th1 ćelija (Dearman i drugi, 2002). Hartmann i drugi, koji su ispitali profil genske ekspresije u koži i dLČ kod pacova nakon elicitacije sa DNFB-om, potvrdili su aktivaciju IFN- $\gamma$ -puta u dLČ i koži. Međutim, ovi autori su sugerisali da KP kod pacova nije čisto Th1 polarizovana, već uključuje i Th2 i citotoksične ćelije, kao i mast ćelije i B ćelije. Naime, oni su pokazali različitu dinamiku ekspresije gena za citokine karakteristične za Th1- i Th2-ćelije, sa pikom Th1 odgovora 24 časa, i Th2 odgovora 8 časova nakon elicitacije (Hartmann i drugi, 2006). Komparativno ispitivanje reakcije KP kod sojeva koji se razlikuju u Th1/Th2 ravnoteži u imunskim reakcijama, mogu biti značajni za ispitivanje prirode imunskog odgovora u reakciji KP, kao jedne od aktuelnih kontroverzi, ali i za ispitivanje mehanizama koji su u osnovi veće ili manje osetljivosti pojedinih sojeva na razvoj KP.

LLNA kod miševa je prihvaćen kao najprecizniji i najčešće korišćeni test za ispitivanje senzibilišućeg potencijala različitih hemikalija. Komparativno ispitivanje LLNA na dva alergena, DNCB i TMA (trimetil amin), kod miševa i pacova, pokazala su da je pacov takođe dobra test životinja za LLNA, sugerišući da je ova vrsta dobar



eksperimentalni model za ispitivanje faze senzibilizacije (Arts i drugi, 1996). Osim težine dLČ i broja proliferišućih ćelija nakon senzibilizacije pacova sa kontaktnim alergenima (Arts i drugi, 1996), ostali parametri aktivnosti, kao što su citokinski profil ili T-ćelijski sastav dLČ, koji mogu dati jasniju sliku o mehanizmima ove faze reakcije, nisu dovoljno ispitani kod pacova.

## **2. Ciljevi rada**

Reakcija KP dala je uvid u osnovne mehanizme AKD, korišćenjem najčešće mišjeg modela bolesti. Iako dosta ispitivana, brojni kontradiktorni rezultati vezani za pojedine aspekte reakcije KP nameću neophodnost boljeg poznavanja patogeneze bolesti, sa ciljem razvoja novih terapijskih modaliteta. Korišćenje drugih eksperimentalnih životinja, osim miševa, može unaprediti znanje o imunobiologiji kontaktnih alergija. Pacov je jedna od najčešćih eksperimentalnih vrsta u svim oblastima biomedicinskih istraživanja, čije korišćenje je omogućilo značajan napredak u bazičnim i primenjenim saznanjima. Iako je pre više od dvadeset godina ova vrsta predložena kao dobar eksperimentalni model za ispitivanje kontaktnih alergija (Scheynius i drugi, 1988), mehanizmi reakcije KP kod pacova ostali su nedovoljno istraženi. Karakterizacija reakcije KP kod pacova može doprineti boljem razumevanju patofiziologije bolesti, i, s obzirom da je pacov najčešće korišćena vrsta u toksikološkim i farmakološkim studijama, može biti značajna za ispitivanje imunomodulatornog efekta fizičkih i hemijskih agenasa, kao i efikasnosti agenasa u terapiji AKD.

Ciljevi ovog rada su (1) ispitivanje mehanizama indukcije reakcije KP kod pacova, kroz analizu dinamike promena aktivnosti ćelija dLČ (aksilarni i skapularni LČ) u toku faze senzibilizacije, kao i (2) ispitivanje efektorskih mehanizama reakcije, pomoću analize produkcije inflamatornih medijatora u kondicioniranom medijumu organokulture uha, i pomoću analize promena aktivnosti ćelija dLČ (aurikularni LČ), nakon elicitanje senzibilisanih životinja.

Iako su prethodna istraživanja reakcije KP sugerisala da odabir genetičke podloge, tj. soja miša (Fachet i Ando, 1977) ili pacova (Kuper i drugi, 2008; Arts i drugi, 1996; Peszkowski i drugi., 1994), može uticati na pojedine aspekte reakcije, ćelijski i molekularni mehanizmi u osnovi ovih razlika nisu dovoljno ispitani. U svetlu toga, u radu će se koristiti dva soja pacova, Dark Agouti i Albino Oxford, za koje je pokazano da u drugim zapaljenskim reakcijama razvijaju kvalitativno i/ili kvantitativno različit tip imunskog odgovora (Th1 ili Th2) na isti stimulus. U okviru ciljeva ovog rada ispitaće se doprinos Th1 i Th2 citokina u fazi senzibilizacije i elicitanje, kao jednoj od postojećih kontroverzi ove reakcije, kao i učešće citokina IL-17 u reakciji KP kod ove vrste. Za senzibilizaciju i elicitanje životinja koristile bi se dve doze haptena, s obzirom da je u studijama AKD kod ljudi pokazano da intenzitet reakcije zavisi od doze haptena (Friedman i drugi, 1983; Friedman, 2007).

## **3. Materijal i metode**

### 3.1. Hemikalije

RPMI-1640 tečna podloga (PAA laboratories, Austrija) dopunjavana sa 25mM HEPES, 2mM glutaminom, 20 µg/ml gentamicinom (Galenika a.d., Srbija), 5 % (v/v) inaktivisanim fetalnim telećim serumom (engl. Fetal Calf Serum, PAA laboratories, Austrija) i 5 µg/ml antifungalnim agensom vorikonazolom (Pfizer PGM, Francuska), korišćena je za kulturu ćelija (kompletni medijum).

Kao rastvarač za 1-hloro-2,4-dinitrobenzen (DNCB; BDH Chemicals Ltd., Poole, UK) korišćen je aceton i maslinovo ulje u odnosu 4:1; 2,4-dinitrobenzen sulfonska kiselina (DNBS) (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI), analog DNCB-u rastvorljiv u vodi, rastvarana je u medijumu za kulturu ćelija.

<sup>3</sup>H-Timidin (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) rastvaran je u medijumu za kulturu ćelija, i dodavan u kulturu u finalnoj koncentraciji 5 µCi/ml.

Rekombinantni humani IL-2 (rIL-2, R&D Systems, Minneapolis, SAD) rastvoran u medijumu za kulturu ćelija, korišćen je u koncentraciji 50 internacionalnih jedinica/ml kulture.

Concanavalin A (ConA) rastvaran je u medijumu za kulturu ćelija, u finalnoj koncentraciji 1 µg/ml kulture.

Tetrazolijumova so 3(4, 5 – dimetiltiazolil-2) – 2, 5- difenil tetrazolijum bromid, MTT (ICN Biomedicals Inc, Aurora, SAD) rastvarana je u apirogenom fiziološkom rastvoru u koncentraciji 5 mg/ml, i dodavana u kulturu u finalnoj koncentraciji 500 µg/ml.

U eksperimentima su korišćena FITC (fluorescein izotiocijanat) obeležena mišja antitela za pacovski CD4 (IgG2a), PE (fikoeritrin) obeležena mišja antitela za pacovski CD8α (IgG1) i CD25 (IgG1), i PE-Cy5 pacovska antitela za mišji/pacovski Foxp3 (IgG2a, kappa) (eBioscience Inc, San Diego, CA, USA).

Produkcija citokina određivana je pomoću imunoenzimskog testa na čvrstoj fazi (eng. ELISA, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Korišćeni su komercijalno dostupni ELISA setovi za: pacovski IFN-γ, IL-4, IL-10 i IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, SAD), mišji IL-17 (reaktivan sa pacovskim IL-17; eBioscience Inc, San Diego, Ca, SAD), i pacovski TNF-α (eBioscience).

Supstrat za određivanje sadržaja mijeloperoksidaze pripreman je tako što je u 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 6,0) dodavan o-dianizidin dihidrohlorid (Sigma,

Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD) u koncentraciji 0,167 mg/ml i 0.0005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Griessov reagens pravljjen je od jednakih zapremina 0.1% rastvora naftiletildiamin-dihidrohlorida (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD) (u destilovanoj vodi) i 1 % rastvora sulfanilamida (u 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD).

Sve hemikalije koje su korišćene za rad sa ćelijama sterilisane su pomoću filtera sa porama veličine 0,2µm (Filterpour, Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Nemačka). Matični rastvori čuvani su na -20 °C ili -70 °C do upotrebe.

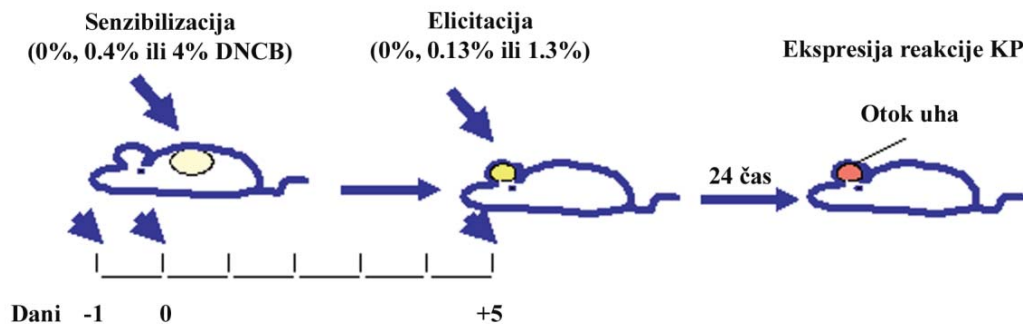
### **3.2. Ekperimentalne životinje**

U eksperimentima su korišćeni mužjaci DA i AO soja pacova, starosti deset do dvanaest nedelja. Jedinke pacova dobijane su iz odgajališta životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, gde su odgajane pod standardnim uslovima (temperatura 21/24 °C, 60% relativna vlažnost vazduha, režim svetlo-mrak 12 h, hrana i voda *ad libitum*). Za eksperimente je dobijena saglasnost Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” (rešenje broj 01-1564).

### **3.3. Reakcija kontaktne preosetljivosti**

Životinje su senzibilisane tako što im je na dorzalnu površinu prethodno očišane kože nanošen DNCB rastvoren u aceton/maslinovo ulje (rastvarač), tokom dva uzastopna dana. 100 µl 0.4% ili 4% (w/v) DNCB-a pažljivo je razmazivano na površinu kože (otprilike 16 cm<sup>2</sup>) nastavkom pipete. Pet dana nakon druge aplikacije haptena reakcija kontaktne preosetljivosti (KP) je izazivana ponovnim nanošenjem 50 µl tri puta manje koncentracije DNCB-a (0.13% ili 1.3%) na dorzalnu i ventralnu površinu desnog uha (elicitacija) (režimi senzibilizacije/elicitacije 0.4%/0.13% i 4%/1.3%). Kontrolnim (nesenzibilisanim) životinjama je nanošen samo rastvarač u fazi senzibilizacije i elicitacije (DNCB doza senzibilizacije/elicitacije 0%/0%) (Slika 1.). Jednoj grupi nesenzibilisanih životinja je nanošen DNCB (0.13% ili 1.3%) u fazi elicitacije (režim

senzibilizacije/elicitacije 0%/0.13% i 0%/1.3%). Za ispitivanje efekta doze senzibilizacije na intenzitet reakcije KP, životinje su senzibilisane sa 0.4% ili 4% DNCB, nakon čega je reakcija izazvana sa 0.13% DNCB (režim senzibilizacije/elicitacije 0.4%/0.13% i 4%/0.13%). Intenzitet reakcije KP je ispitivan 24 časa nakon elicitacije, merenjem promene debljine desnog uha, kao *in vivo* mere ekspresije reakcije KP. Debljina uha je merena mikrometrom (šublerom) neposredno pre elicitacije reakcije i 24 časa nakon elicitacije (najmanje šest merenja za svako uho), i promena u debljini uha je definisana kao razlika debljine posle i debljine pre elicitacije. Površina isečenog uha (mm<sup>2</sup>) određivana je pomoću programa ImageJ, nakon čega su izračunavane vrednosti mase uha po jedinici površine. Nakon tretmana, životinje su držane u zasebnim kavezima.



**Slika 1. Indukcija i elicitacija reakcije kontaktne preosetljivosti**

### 3.4. Histologija

Isečki kože uha uzeti 24 časa nakon elicitacije fiksirani su u 4% formalinu (pH 6.9), nakon čega su sukcesivno sprovedeni kroz seriju etanola rastuće koncentracije (70%, 86%, 96% i 100%), ksilol i zatim su kalupljeni u parafin. Pravljeni su preseci tkiva debljine 5 µm i bojani hematoksilinom i eozinom. Histološki preparati su zatim analizirani pomoću digitalnog svetlosnog mikroskopa (Coolscope, Nikon Co, Japan). Kvantitativna analiza vršena je brojanjem mononuklearnih ćelija na najmanje 30 vidnih polja uvećanja 100x koja su zahvatala čitavu površinu preseka, i pod imerzionim uljem,

nakon čega je računata srednja vrednost broja ćelija na polje (po uzorku). Kvantitativna analiza broja mast ćelija vršena je na isečcima bojenim sa Gimsom (Giemsa).

### **3.5. Ispitivanje karakteristika imunskog odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima**

#### **3.5.1. Priprema ćelija drenirajućih limfnih čvorova**

U fazi senzibilizacije, prvog, trećeg i petog dana nakon druge aplikacije DNCB-a ili rastvarača izolovani su čvorovi koji dreniraju dorzalnu površinu kože (aksilarni i skapularni), dok su 24 časa nakon elicitacije reakcije izolovani čvorovi koji dreniraju uho na koje je nanesen haptan (aurikularni čvorovi). S obzirom na malu veličinu, aurikularni limfni čvorovi su vizuelizovani ubrizgavanjem boje Patent plavo V (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD) u bazu uha.

Suspenzija ćelija drenirajućih limfnih čvorova (dLČ) pripravljena je pod aseptičnim uslovima mehaničkim istiskivanjem ćelija kroz najlon mrežice sa dijametrom pora 20  $\mu\text{m}$  (Cell strainer, BD Falcon, BD Bioscience, Bedford, SAD). Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u medijumu. Ukupan broj ćelija i vijabilnost su određivani brojanjem ćelija razblaženih u 0.1% Tripan plavo, pomoću Neubauer hemocitometra. Vijabilnost je određivana pomoću formule broj živih/broj mrtvih  $\times 100\%$ , i uvek je prelazila 95 %. Koncentracija ćelija je podešavana na  $6 \times 10^6/\text{ml}$ .

U svim ispitivanim testovima ćelije su kultivisane u inkubatoru za gajenje ćelija (Flow Laboratories CO<sub>2</sub> incubator 1500, ICN Flow, SAD), pod standardnim uslovima (vlažna atmosfera, temperatura 37<sup>0</sup>C, koncentracija CO<sub>2</sub> 5%).

#### **3.5.2. Testovi proliferacije ćelija drenirajućeg limfnog čvora**

Za određivanje *ex vivo* (0h) proliferativne aktivnosti, 200  $\mu\text{l}$  pripremljene suspenzije ćelija ( $1.2 \times 10^6$  ćelija/ bunariću) postavljano je u duplikatu u ploče sa 96 mesta (Spektar, Čačak, Srbija). [<sup>3</sup>H]-timidin (0.5 $\mu\text{Ci}$ /bunariću) je dodavan na početku kulture, nakon čega su ploče inkubirane u trajanju od 16 do 18 časova.



Za određivanje proliferativnog odgovora nakon *in vitro* stimulacije sa rIL-2 (50 ij/ml), 100 µl suspenzije ( $0.6 \times 10^6$  ćelija/ bunariću) sa 20 µl medijuma ili 20 µl rIL-2 postavljano je u duplikatu, i kultivacija je vršena 24 časa. Nakon 16 časova kulture dodat je [<sup>3</sup>H]-timidin. Proliferativni odgovor ćelija na *in vitro* stimulaciju sa IL-2 je izražen kao razlika između proliferacije zabeležene kod IL-2-stimuliranih i nestimuliranih ćelija.

Za određivanje proliferativnog odgovora nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa haptenom, 200 µl ćelijske suspenzije ( $1.2 \times 10^6$  ćelija/ bunariću) sa 40 µl medijuma ili 40 µl DNBS-a (10 µg/ml kulture), koji je analog DNCB-u rastvorljiv u vodi, postavljano je u triplicatu i kultivirano tokom 96 časova. Poslednjih 16-18 časova kulture dodat je [<sup>3</sup>H]-timidin. Proliferativni odgovor ćelija na *in vitro* hapten je izražen kao razlika između proliferacije zabeležene kod hapten-stimuliranih i nestimuliranih ćelija.

Skidanje kultura vršeno je pomoću automatskog skidača kultura (Titertec Cell Harvester, ICN Flow, SAD). Proliferativna aktivnost određivana je na osnovu ugradnje radioaktivno obeleženog timidina u ćelijsku DNK, mereno β-scintilacionim brojačem (LKB-1219, Rackbeta, Finska). Proliferacija je izražena kao broj otkucaja na minut (b.o.m.) duplikata kultura.

### **3.5.3. Određivanje metaboličke vijabilnosti ćelija drenirajućeg limfnog čvora pomoću MTT testa**

Metabolička vijabilnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitanje određivana je pomoću kvantitativnog kolorimetrijskog testa koji se zasniva na metaboličkoj redukciji tetrazolijumove soli MTT, od strane enzima endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija, do krajnjeg obojenog produkta formazana (Oez i drugi, 1990). MTT redukcije nema u odsustvu ćelija, a povećava se sa povećanom aktivnošću i proliferacijom ćelija (Mossman, 1983).

MTT test je sproveden zasejavanjem ćelija drenirajućeg limfnog čvora ( $0,1 \times 10^6$  u 100µl) u bunariće ploče za mikrokulturu sa 96 mesta sa ravnim dnom, u triplicatu. Sveže izolovanim ćelijama i ćelijama koje su gajene u kulturi 24 h dodavan je MTT u koncentraciji od 500 µg/ml kulture i inkubacija je nastavljena još tri sata. Nastali

formazan ekstrahovan je preko noći pomoću zakišljenog natrijum dodecil sulfata (eng. SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) (10% SDS / 0,01N HCl). Absorbanca je merena pomoću ELISA čitača (GRD, Rim, Italija) na talasnoj dužini od 540 nm, a korekcija je rađena natalasnoj dužini od 670 nm. MTT indeks je izražen kao odnos između MTT redukcije zabeležene od strane ćelija koje su gajene 24 h i MTT redukcije zabeležene od strane sveže izolovanih ćelija.

#### **3.5.4. Analiza zastupljenosti ćelijskih populacija na protočnom citofluorimetru**

U drenirajućim limfnim čvorovima izolovanim trećeg i petog dana senzibilizacije, i 24 časa nakon elicitacije, ispitivana je zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8α<sup>+</sup> ćelija. Zastupljenost CD25<sup>+</sup> ćelija ispitivana je u drenirajućim limfnim čvorovima izolovanim prvog dana senzibilizacije, i 24 časa nakon elicitacije. Membranska ekspresija CD4, CD8α, i CD25 molekula određivana je nakon inkubacije ćelija sa direktno obeleženim antitelima- CD4 antitelom obeleženim sa FITC-om i CD8α i CD25 antitelima obeleženim sa PE-om. 1x10<sup>6</sup> ćelija inkubirano je sa antitelima u finalnoj zapremini od 100 μl, 45 minuta na +4<sup>0</sup>C. Nakon toga ćelije su ispirane dva puta u PBS/0.1% natrijum azid, i zatim fiksirane dodavanjem 400 μl 1% paraformaldehida. Svi koraci su rađeni na +4<sup>0</sup>C. Analiza je vršena na FACScalibur protočnom citofluorimetru (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), i analizirano je minimum 10000 događaja po uzorku. Rezultati su izraženi kao srednji procenat zastupljenosti pozitivnih ćelija u ćelijskoj populaciji uzoraka pojedinačnih životinja, dok je za CD25 molekul određivana i gustina ekspresije merenjem srednjeg intenziteta fluorescence. Ukupni broj pozitivnih ćelija je izračunavan množenjem procenta pozitivnih ćelija sa ukupnim brojem ćelija, za svaku pojedinačnu životinju.

Zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija određivana je u drenirajućim limfnim čvorovima izolovanim 24 časa nakon elicitacije. Suspenzija (1x10<sup>6</sup> ćelija) je inkubirana sa direktno obeleženim antitelima za CD4 (FITC) i CD25 (PE) 45 minuta na +4<sup>0</sup>C. Posle dva ispiranja u PBS/0.1% natrijum azid, izvršena je permeabilizacija ćelijske membrane, inkubacijom ćelija sa 1 ml komercijalnog rastvora za fiksaciju i permeabilizaciju (eBioscience Inc, San Diego, Ca, SAD) na +4<sup>0</sup>C, 60 minuta. Nakon permeabilizacije ćelije su ispirane u permeabilizacionom puferu, i izvršeno je

unutarćelijsko bojenje dodavanjem Foxp3 antitela konjugovanih sa PE-Cy5, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Procenat Foxp3 pozitivnih ćelija analiziran je unutar CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> populacije ćelija, nakon čega je preračunavana zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> pozitivnih ćelija u ukupnoj populaciji ćelija dLČ, na uzorcima pojedinačnih životinja.

U svim analizama, nivo autofluorescence određivan je na kontrolnim uzorcima kojima nisu dodata antitela, i ona je bila manja od 0.5 % pozitivnih ćelija.

### **3.5.5. Produkcija citokina od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora**

Za određivanje produkcije citokina od strane ćelija drenirajućih limfnih čvorova, zasejavano je  $5 \times 10^6$  ćelija/ml kulture u finalnoj zapremini od 240  $\mu$ l, u pločama sa 96 mesta. Ćelije su gajene tokom 72 časa u prisustvu medijuma (spontana *ex vivo* produkcija) ili DNBS-a (produkcija *in vitro* stimulisana sa haptenom). Za ispitivanje produkcije IL-4, ista koncentracija ćelija je *in vitro* stimulisana sa ConA (1  $\mu$ g/ml kulture), i vršena je kultivacija tokom 48 časova. Produkcija citokina određivana je pomoću imunoenzimskog testa na čvrstoj fazi (eng. ELISA, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), u supernatantu (kondicioniranom medijumu ćelijskih kultura) koji je sakupljan centrifugiranjem 10 minuta na 1200 obrtaja na minut. Specifična produkcija je izražena kao razlika između citokinske produkcije zabeležene od strane *in vitro* stimulisanih ćelija i nestimulisanih ćelija.

### **3.5.6. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu**

Nivo ekspresije gena za citokine određivan je u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova izolovanih petog dana senzibilizacije i 24 časa nakon elicitacije, korišćenjem reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR, engl. Real Time-Polymerase Chain Reaction). Totalna RNK izolovana je iz  $5 \times 10^6$  ćelija dLČ pojedinačnih životinja, pomoću mi-Total RNA Isolation Kit (Metabion, Martinsried, Nemačka) prema uputstvima proizvođača. Nakon izolacije RNK, vršena je reverzna transkripcija 1  $\mu$ g RNK pomoću enzima reverzne transkriptaze poreklom iz Moloney

leukemija virusa (Applied Biosystems, Foster City, CA) i upotrebom nasumičnih heksamera kao oligonukleotida (prajmera) (Applied Biosystems). Reakcija reverzne transkripcije sastojala se iz sledećih koraka: inkubacije RNK sa prajmerima na visokoj temperaturi (70 °C, 5 minuta) radi denaturacije sekundarne strukture RNK, a potom brzog hlađenja na ledu radi vezivanja prajmera za RNK; dodavanja ostalih komponenti za reakciju (dNTP, RNase inhibitor, reverzna transkriptaza i pufer za reverznu transkriptazu); temperiranja reverzne transkriptaze (15 minuta na 25 °C) i transkripcije (1 h na 42 °C).

Real-time PCR (Higuchi i drugi, 1993) služi za detekciju produkata PCR amplifikacije u toku eksponencijalne faze, u kojoj se, u toku svakog ciklusa, količina DNK duplo uvećava. U eksponencijalnoj fazi postoji kvantitativni odnos između početne količine uzorka i količine PCR produkta koji nastaje u određenom ciklusu. Detekcija je vršena pomoću fluorescentne probe SYBRGreen koja se nespecifično vezuje za lanac DNK.

Amplifikacija 4 µl 10 puta razblažene cDNK, u 20 µl reakcione smeše za PCR, rađena je u Real-Time PCR aparatu (Applied Biosystems, Foster City, CA) upotrebom SYBRGreen PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reakcija se sastojala iz sledećih ciklusa: aktivacije dUTP (10 minuta na 50 °C), inicijalne denaturacije cDNK (10 minuta na 95 °C), nakon čega je sledilo 40 ciklusa amplifikacije cDNK. Svaki ciklus sastojao se iz denaturacije (15 s na 95 °C), i vezivanja prajmera za lanac cDNK (aniling) i sinteze novog lanca cDNK (ekstenzija/elongacija) (1 min na 60 °C). Određivan je nivo ekspresije gena za IL-17, IFN-γ, IL-4, IL-10, p35, p40, T-bet, TGF-β. Parovi prajmera korišćeni u reakciji su prikazani u Tabeli 1. Ekspresija gena izračunavana je prema formuli  $2^{-(\Delta Ct)}$ , gde je  $\Delta Ct$  razlika između broja ciklusa na komese pojavljuje fluorescentni signal za ispitivani gen i broja ciklusa za gen za β-actin (tzv. house-keeping gen) prema kome se normalizuje ekspresija ispitivanog gena. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti preračunati u odnosu na kontrolnu grupu.

**Tabela 1. Sekvence korišćenih oligonukleotida (prajmera)**

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>
5'-AACAGTAAAGCAAAAAGGATGCA-3'      3'-TGTGCTGGATCTGTGGGTTGT-5'
<b>IL-17</b>
5'-CTACCTCAACCGTTCCACTTCAC-3'      3'-CCTCCCAGATCACAGAAGGATATC-5'
<b>IL-4</b>
5'-CGGTGAACTGAGGAACTCTGTAG-3'      3'-TCAGTGTGTGAGCGTGGACTC-5'
<b>IL-10</b>
5'-GAAGACCCTCTGGATACAGCTGC-3'      3'-TGCTCCACTGCCTTGCTTTT-5'
<b>p35</b>
5'-CCGGTCCAGCATGTGTCA-3'      3'-GCCGAAGTGAGGTGGTTTAGG-5'
<b>p40</b>
5'-ACGGACTTGAAGTTTAACATCAAGAG-3'      3'-AGAGATGCTCGTCCACATGTCA-5'
<b>T-bet</b>
5'-CCAACAATGTGACCCAGATGAT-3'      3'-CTGGCTCACCGTCATTCA-5'
<b>TGF-<math>\beta</math></b>
5'-CCCTGCCCTACATTTGGA-3'      3'-ACGGTGATGCGGAAGCAC-5'
<b><math>\beta</math> aktin</b>
5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3'      3'-GAGCCACCAATCCACACAGA-5'

### **3.6. Ispitivanje produkcije medijatora inflamacije u kondicioniranom medijumu organokulture uha**

#### **3.6.1. Organokultura eksplanata kože uha**

Nakon uzorkovanja, cele uši na koje je nanesen rastvarač ili DNCB su ispirane prvo u fiziološkom rastvoru a zatim u medijumu sa gentamicinom. Nakon ispiranja, pincetom je lagano odvojena ventralna od dorzalne površine uha, i tako dobijene polovine ušiju su postavljane u ploče sa 24 mesta (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

ispunjene sa 1.2 ml medijuma. Kultivacija je vršena pod standardnim uslovima (vlažna atmosfera na 37<sup>0</sup>C i 5% CO<sub>2</sub>) tokom 48 časova, i nakon centrifugiranja 10 minuta na 1400 obrtaja/minut sakupljen je supernatant (kondicionirani medijum u kojem su gajeni uzorci kože uha). U sakupljenom kondicioniranom medijumu određivana je koncentracija nitrita, pomoću Griessove reakcije, i citokina, pomoću ELISA.

### **3.6.2 Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO test) unutar ćelija iz organokulture eksplanata kože uha**

Nakon centrifugiranja i sakupljanja supernatanta u kome su odgajani uzorci kože uha (eksplanti), ćelije spuštene na dno ploče su prikupljane laganim resuspendovanjem u svežem medijumu. Ukupan broj ćelija i vijabilnost su određivani brojanjem ćelija razblaženih u Tripan plavo (0.1%), pomoću Neubauer hemocitometra.

Aktivnost mijeloperoksidaze u ćelijama određivana je na osnovu oksidacije supstrata O-dianizidin dihidrohlorida u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bozeman i drugi, 1990). Test je vršen dodavanjem 33 µl lizata (4 x 10<sup>5</sup>) ćelija u 966 µl rastvora supstrata. Apsorbanca je očitavana nakon 10 minuta na talasnoj dužini od 450 nm. Aktivnost mijeloperoksidaze u ćelijama preračunavana je pomoću standardne krive konstruisane sa standardom mijeloperoksidaze (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD), a rezultat izražavan kao jedinice MPO na 10<sup>6</sup> ćelija.

### **3.6.3. Određivanje nivoa nitrita Griessovom metodom**

Griessova reakcija prvi put je opisana 1879. godine (Griess, 1879), i od tada je najčešće korišćena metoda za određivanje nivoa nitrita (NO<sub>2</sub>-), kao mere oslobađanja azot-oksida, u različitim biološkim tečnostima. Griessov reagens čine sulfonilamid (SA) i N-(1-Naftil etilendiamin) (NAD) u odnosu 1:1. U ovoj metodi, nitriti u prisustvu SA, u uslovima kisele sredine, formiraju prelaznu diazonijum so, koja zatim reaguje sa NAD i formira stabilno azo jedinjenje ljubičaste boje (Sun i drugi, 2003). 50 µl supernatanta organokulture uzoraka kože uha je pomešano sa 50 µl Griessovog reagensa, i inkubirano

10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena pomoću ELISA čitača, na talasnoj dužini 570 nm, a korekcija je vršena na 650 nm. Kvantifikacija nitrita je određivana pomoću standardne krive konstruisane korišćenjem poznatih koncentracija natrijum-nitrita ( $\text{NaNO}_2$ ).

### **3.7. Imunoenzimski test na čvrstoj fazi (eng. ELISA, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)**

Produkcija citokina u kondicioniranom medijumu kulture ćelija dLČ i organokulture isečaka kože uha, određivana je korišćenjem komercijalno dostupnih ELISA setova, prema uputstvu proizvođača. Absorbanca je merena na ELISA čitaču (GRD, Rim, Italija) na talasnoj dužini od 450 nm (referentna vrednost 570 nm). Koncentracija citokina je preračunavana na osnovu standardne krive konstruisane korišćenjem poznatih koncentracija odgovarajućih rekombinativnih citokina, i izražavana je u pg/ml.

### **3.8. Statistika**

Svaka serija eksperimenata rađena je najmanje dva puta, a rezultati dobijeni iz svih eksperimenata izraženi su kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom. Za statističku analizu korišćen je neparametarski Mann-Whitney U test, a za ispitivanje korelacija između parametara imunskog odgovora korišćena je linearna regresija. Program za obradu podataka je Statsoft STATISTIKA v7.0.61.0. (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Statistički značajnim smatrane su  $p$  vrednosti manje od 0,05.

## **4. Rezultati**



DNCB je jedan od najčešće korišćenih haptena u ispitivanju reakcije kontaktne preosetljivosti (KP). Najčešće korišćena doza DNCB-a za senzibilizaciju miševa (Dearman i drugi, 2002; Plitnick i drugi, 2002; Dearman i drugi, 2005) i pacova (Kuper i drugi, 2008) je 1%, mada se koriste i niže doze, počevši od 0.5% (Kuper i drugi, 2008; Cumberbatch i drugi, 1993; Urlich i drugi, 2001), kao i više doze ovog haptena kao što su 2.5% (Jórnundsson i drugi, 1999; Xu i drugi, 1997) ili 5% (Traidl i drugi, 1999). U ovom radu korišćene su dve DNCB doze senzibilizacije, 0.4% i 4%, s obzirom da su naša preliminarna ispitivanja pokazala da elicitacija reakcije KP kod pacova senzibilisanih sa dozama 0.4% ili 4% dovodi do najizraženije razlike u intenzitetu reakcije: za razliku od doze 0.4% koja dovodi do reakcije slabog intenziteta, viša doza (4%) dovodi do značajno većeg intenziteta reakcije praćenog izraženim mikroskopskim promenama u tretiranom uhu.

Životinje su senzibilisane nanošenjem DNCB-a u koncentraciji 0.4% ili 4% (w/v), rastvorenog u smeši acetona i maslinovog ulja (rastvarač) na prethodno očištanu površinu leđa, dva dana zaredom. Pet dana nakon druge aplikacije DNCB-a reakcija je izazvana nanošenjem tri puta manje koncentracije haptena (0.13% ili 1.3%) na površinu uha (elicitacija reakcije). Kontrolne životinje tretirane su samo rastvaračem i u fazi senzibilizacije i elicitacije. Eksperimentalne grupe prikazane su u Tabeli 1.

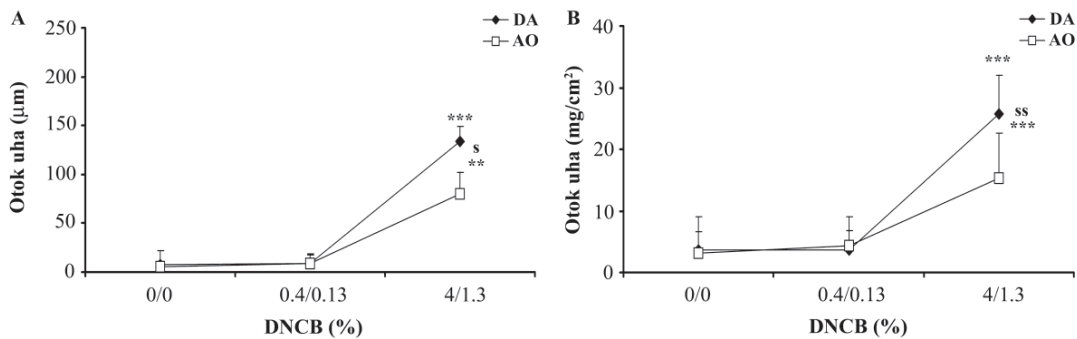
**Tabela 1. Doze DNCB-a korišćene u fazi senzibilizacije i elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti**

Doza DNCB-a korišćena za senzibilizaciju	Doza DNCB-a korišćena za elicitaciju	Tretman (Doza senzibilizacije/doza elicitacije)
0%	0%	0% / 0%
0%	0.13%	0% / 0.13%
0%	1.3%	0% / 1.3%
0.4%	0.13%	0.4% / 0.13%
4%	0.13%	4% / 0.13%
4%	1.3%	4% / 1.3%

## 4.1. Promene u uhu 24 časa nakon elicitanje reakcije kontaktne preosetljivosti kod senzibilisanih pacova

### 4.1.1. Otok uha kao *in vivo* mera ekspresije reakcije KP

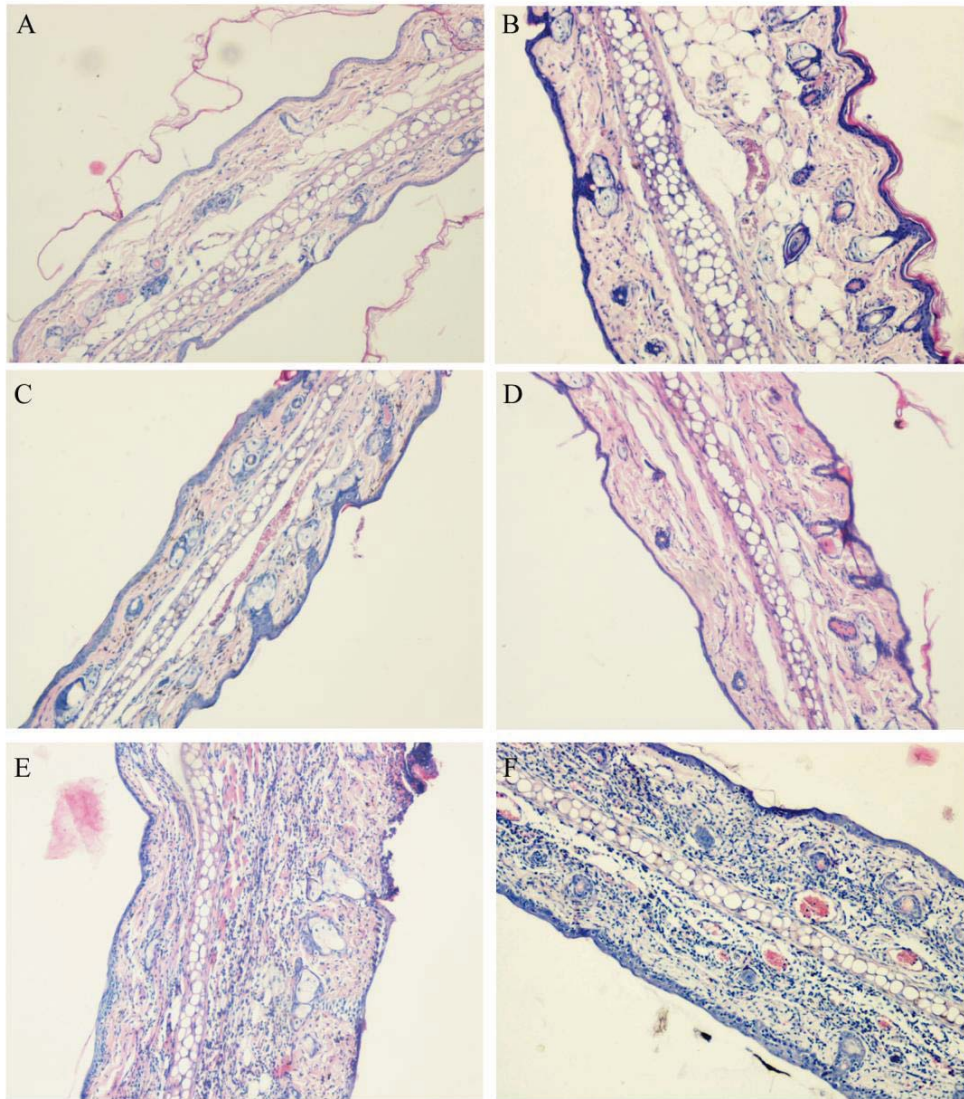
Nakon elicitanje reakcije KP zabeleženo je povećanje otoka uha, izraženo kao promena u debljini uha, kod jedinki oba soja tretiranih samo sa višom dozom haptena (tretman 4%/1.3%), u odnosu na kontrolne životinje (tretman 0%/0%). Zabeleženo povećanje otoka uha je značajno niže kod AO u odnosu na DA jedinke (Slika 1A). Merenje promene mase uha po jedinici njegove površine potvrdilo je povećanje otoka uha nakon primene samo više doze kod oba soja, značajno niže kod AO u odnosu na DA soj (Slika 1B).



**Slika 1. Otok uha kao *in vivo* mera ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti kod pacova.** Pet dana nakon senzibilizacije životinja sa dozama DNCB-a 0.4% ili 4% reakcija kontaktne preosetljivosti je izazvana nanošenjem tri puta manje koncentracije haptena na površinu uha (režim doza senzibilizacije/doza elicitanje 0.4%/0.13% i 4%/1.3%). Kontrolnim životinjama je nanošen rastvarač i u fazi senzibilizacije i elicitanje (režim doza senzibilizacije/doza elicitanje 0%/0%). Otok uha predstavljen je kao razlika u debljini uha izmerena 24 časa nakon elicitanje reakcije i neposredno pre elicitanje (A), i kao promena mase uha po jedinici njegove površine (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost otoka uha iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± SD. Statistički značajne razlike: \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 u odnosu na kontrolne jedinke odgovarajućeg soja; s p < 0.05, ss p < 0.01 u odnosu na jedinke DA soja.

#### 4.1.2. Histološke promene u uhu nakon elicitanje senzibilisanih životinja

Na histološkim presecima uha nakon elicitanje reakcije kod senzibilisanih pacova oba soja primetna je inflamacija, sa karakterističnim edemom i infiltracijom leukocita (Slika 2C, D, E, F), dok su nalazi kod kontrola bez promena (Slika 2A, B). Kod pojedinih jedinki DA soja nakon primene niže doze DNCB-a (tretman 0.4%/0.13%) (Slika 2C) uočeni su edem derma, uz prisustvo povećanog broja limfocita i fibroblasta u dermu, kao i kongestija kapilara. Kod jedne životinje uočena je superficijalna mikropustula sa neutrofilnom spongiozom, kao i spongioza i egzocitoza limfocita u epiderm. Kod dve od devet životinja nisu zapažene promene. Nakon primene više doze DNCB-a kod ovog soja (tretman 4%/1.3%) (Slika 2E), kod svih analiziranih jedinki izražen je inflamatorni proces, sa karakterističnim edemom, praćen gustim infiltratom limfocita u dermu, kao i povećanim brojem neutrofila, pretežno u lumenu kapilara. Kod pojedinih jedinki primećena je ulceracija i vezikulopustula, uz izraženu spongiozu i egzocitozu limfocita u epiderm. Najčešći nalaz kod jedinki AO soja tretiranih nižom dozom DNCB-a (Slika 2D) je kongestija kapilara u dermu i subepidermalno, uz ređu homogenizaciju kolagenih vlakana derma, kao i lako povećanje broja fibroblasta u dermu. Nakon primene više DNCB doze kod AO soja (Slika 2F), zapažen je povećan infiltrat limfocita u dermu kod većine ispitivanih jedinki, uz izraženu spongiozu i egzocitozu limfocita u epiderm kod pojedinih jedinki. Kod ove doze zapažena je izražena promena na kapilarima (kongestija, dilatacija ili komprimovanje), kao i lako povećanje broja fibroblasta i mastocita u dermu.



**Slika 2. Patohistološke promene na presecima kože uha u fazi elicitanje reakcije kontaktne preosetljivosti.** Kontrolne životinje DA (A) i AO (B) soja, kojima je nanošen rastvarač. Tretman 0.4%/0.13% kod DA (C) i AO soja (D): kongestija krvnih sudova. Tretman 4%/1.3% kao DA soja (E): ulceracija, izrazit edem derma, gust infiltrat u dermu; kod AO soja (F): edem derma, gust mononuklearni infiltrat u dermu (hematoksilin i eozin, uvećanje 10x).

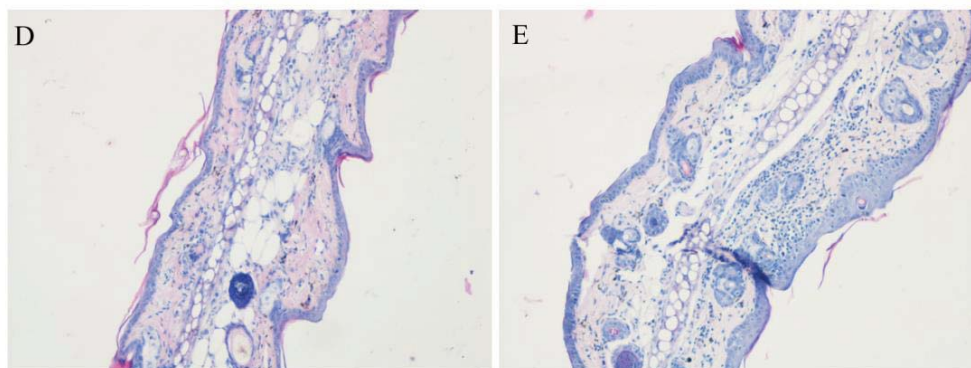
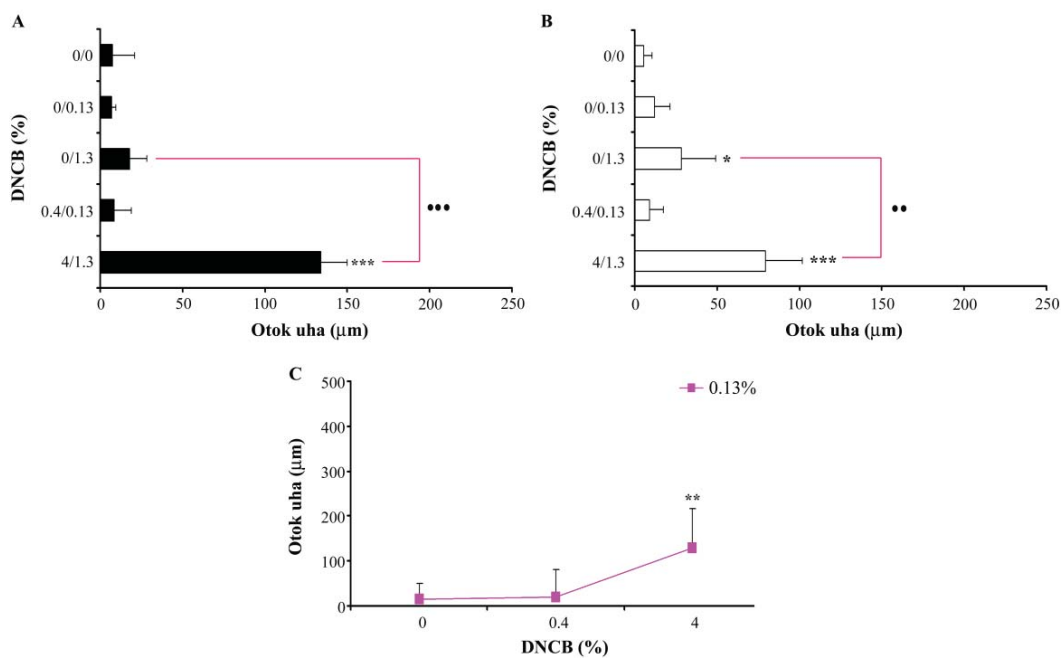
## 4.2. Mehanizmi indukcije reakcije KP kod pacova

### 4.2.1. Doprinos faze senzibilizacije povećanju otoka uha nakon elicitacije reakcije KP

Reakcija KP započinje fazom senzibilizacije, u toku koje dolazi do aktivacije T ćelijskog imunskog odgovora u limfnim čvorovima, a koja je neophodna za ekspresiju reakcije (Rennert i drugi, 2001).

U cilju ispitivanja doprinosa faze senzibilizacije promenama otoka uha nakon elicitacije reakcije, kao i primarnog iritantnog efekta haptena, nesenzibilisanim životinjama je na površinu uha nanet DNCB koncentracije 0.13% ili 1.3% (Slika 3). Nakon primene niže doze DNCB-a (tretman 0%/0.13%) nisu zapažene promene otoka uha ni kod DA (Slika 3A) ni kod AO (Slika 3B) soja, u odnosu na nesenzibilisane jedinke (tretman 0%/0%), što ukazuje na slab iritantan efekat ove doze haptena. Primena više DNCB doze (tretman 0%/1.3%) dovela je do povećanja otoka uha kod jedinki oba soja (mada samo tendencija povećanja kod DA soja,  $p=0.066$ ), u odnosu na odgovarajuće nesenzibilisane jedinke. Nakon primene više doze, kod oba soja, otok uha je manji kod nesenzibilisanih jedinki u odnosu na jedinke koje su prethodno senzibilisane (tretman 4%/1.3%).

Efekat doze senzibilizacije na intenzitet reakcije KP ispitan je nakon primene niske, slabo iritantne doze DNCB-a (0.13%) na uho DA jedinki prethodno senzibilisanih sa dve različite doze DNCB-a (0.4% ili 4%). Elicitacija reakcije kod životinja senzibilisanih nižom dozom (tretman 0.4%/0.13%) nije statistički značajno promenila otok uha u odnosu na nesenzibilisane kontrole (tretman 0%/0.13%), za razliku od elicitacije reakcije kod životinja senzibilisanih sa višom dozom (tretman 4%/0.13%) kod kojih je značajno povećan otok uha (Slika 3C). Histološka analiza preseka uha pokazala je obilniji infiltrat mononuklearnih ćelija u dermu životinja senzibilisanih sa višom (Slika 3E), u odnosu na životinje senzibilisane sa nižom dozom DNCB-a (Slika 3D).



**Slika 3. Doprinos faze senzibilizacije povećanju otoka uha nakon elicitacije reakcije.** Nesenzenzibilisanim životinjama je na površinu uha nanet DNCB u koncentraciji 0.13% (tretman 0%/0.13%) ili 1.3% (tretman 0%/1.3%), ili sam rastvarač (tretman 0%/0%). Promene u otoku uha merene su kod jedinki DA soja (**A**) i jedinki AO soja (**B**). Efekat doze senzibilizacije ispitan je nakon primene niske doze haptena (0.13%) na uho nesenzenzibilisanih jedinki DA soja (tretman 0%/0.13%) ili prethodno senzibilisanih sa dve različite doze DNCB-a (tretman 0.4%/0.13% ili 4%/0.13%). Otok uha (**C**) i patohistološke promene na presecima kože uha nakon tretmana 0.4%/0.13% (**D**) i 4%/0.13% (**E**) (hematoksilin i eozin, uvećanje 10x). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost otoka uha iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolne jedinice odgovarajućeg soja; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na 0%/1.3% odgovarajućeg soja.



#### **4.2.2. Osnovni parametri aktivnosti ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi senzibilizacije kod pacova**

U fazi senzibilizacije ispitivana je aktivnost ćelija limfnih čvorova (aksilarnih i skapularnih) koji dreniraju dorzalnu površinu kože na koju je nanošen DNCB (SdLČ), uključujući celularnost, proliferativnu aktivnost, odnos osnovnih subpopulacija T ćelija, produkciju i ekspresiju citokina (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-10).

##### **4.2.2.1. Promena broja ćelija i njihove proliferativne aktivnosti u drenirajućem limfnom čvoru u fazi senzibilizacije**

Nanošenje DNCB-a dovelo je do povećanja celularnosti SdLČ kod pacova, sa različitim dinamikom ovih promena kod jedinki DA i AO soja (Slika 4A). Povećanje celularnosti limfnih čvorova kod DA jedinki primećeno je već prvog dana nakon senzibilizacije samo sa višom dozom DNCB-a, u odnosu na kontrole, uz dalje povećanje trećeg dana i petog dana nakon primene svake od doza DNCB-a, kada su zabeležene i veće vrednosti u poređenju sa prvim danom ( $p < 0.05$ , kod obe doze). Trećeg dana senzibilizacije, kod ovog soja, zabeleženo je dozno-zavisno povećanje celularnosti, dok je petog dana zapažena tendencija povećanja ( $p = 0.06$ ) celularnosti na višoj, u odnosu na nižu dozu, ali i generalno niža celularnost u odnosu na treći dan (tendencija pada,  $p = 0.07$ , pri nižoj dozi tj. značajno,  $p < 0.01$ , opadanje pri višoj dozi). Kod jedinki AO soja celularnost je povećana samo trećeg dana senzibilizacije, numerički ( $p = 0.078$ ) pri nižoj dozi i značajno pri višoj dozi. Iako povećana nakon primene više doze, celularnost je u tom vremenskom terminu niža u odnosu na DA jedinke.

*Ex vivo* proliferativna aktivnost ćelija SdLČ povećana je kod senzibilisanih pacova u svim ispitivanim terminima, u odnosu na nesenzibilisane životinje, sa sličnom dinamikom promena kod jedinki dva soja (Slika 4B). Prvog dana zabeleženo je povećanje *ex vivo* proliferativne aktivnosti kod senzibilisanih jedinki oba soja, u odnosu na nesenzibilisane jedinke, i to dozno-zavisno povećanje kod AO soja, dok je kod DA soja zapažena tendencija povećanja ( $p = 0.06$ ) pri višoj u odnosu na nižu dozu DNCB-a.

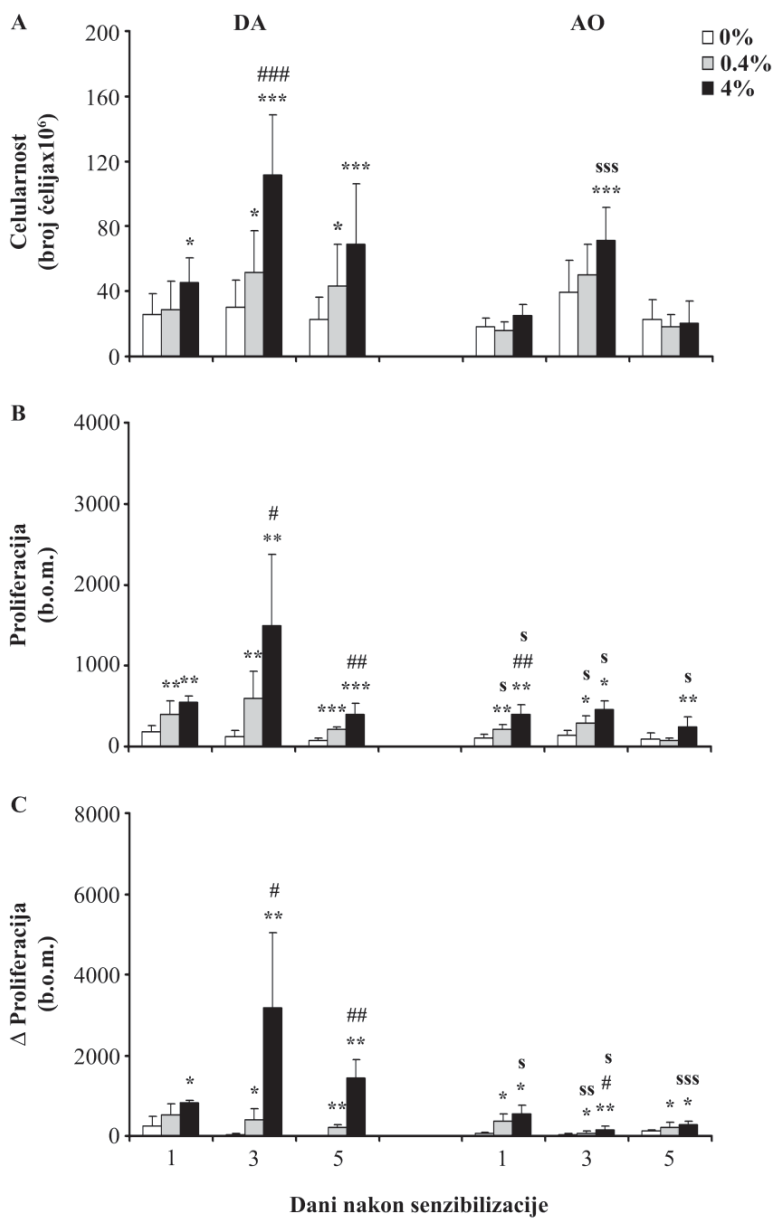
Trećeg dana je kod DA soja zabeleženo dozno-zavisno povećanje proliferacije, dok je kod AO soja zabeleženo povećanje proliferacije nakon primene svake od doza DNCB-a, u odnosu na kontrole, i numeričko povećanje ( $p=0.08$ ) pri višoj u odnosu na nižu dozu. Petog dana se kod DA soja održava dozno-zavisno povećanje proliferativne aktivnosti, dok se kod AO soja povećana proliferativna aktivnost zadržava nakon primene samo više doze DNCB-a. Intenzitet proliferacije je niži ( $p<0.05$ ) petog dana nakon primene svake od doza DNCB-a, u odnosu na prvi i treći dan, kod oba soja. Iako povećana, proliferativna aktivnost je generalno niža kod AO u odnosu na DA jedinke.

Kako proliferativna aktivnost T ćelija zavisi od prisustva i produkcije IL-2, kao i od ekspresije receptora za ovaj citokin, ispitana je sposobnost ćelija SdLČ da odgovore na stimulaciju sa egzogeno dodatim IL-2 (Slika 4C), kao i membranska ekspresija inducibilnog  $\alpha$ -lanca receptora za IL-2 (CD25 molekul) (Tabela 2.). Kod jedinki DA soja povećanje proliferacije u odgovoru na egzogeno dodati IL-2 zapaženo je već prvog dana senzibilizacije samo sa višom dozom DNCB-a, u odnosu na kontrolne jedinke, dok je trećeg i petog dana senzibilizacije zabeleženo dozno-zavisno povećanje proliferativne aktivnosti. Kod ovog soja, responsivnost ćelija SdLČ na IL-2 stimulaciju zabeležena nakon primene niže doze DNCB-a je petog dana najniža ( $p<0.05$  u odnosu na treći i prvi dan), dok je responsivnost nakon primene više doze intenzivnija trećeg (tendencija povećanja  $p=0.067$ ), i petog ( $p<0.05$ ) dana u odnosu na prvi dan, mada je petog dana zabeležena tendencija pada ( $p=0.078$ ) intenziteta u odnosu na treći dan. Kod jedinki AO soja je zabeleženo značajno povećanje proliferativnog odgovora ćelija SdLČ na stimulaciju sa IL-2 nakon senzibilizacije sa svakom od ispitivanih doza DNCB-a, u svim ispitivanim terminima, ali je najniži nivo proliferacije primećen trećeg dana ( $p<0.05$ ) u odnosu na prvi i peti dan. Iako povećana, responsivnost pri višoj dozi kod jedinki AO soja niža je u odnosu na jedinke DA soja, u svim ispitivanim terminima, kao i pri nižoj dozi trećeg dana.

Ekspresija CD25 molekula na površini ćelija SdLČ ispitana je citofluorimetrijskom metodom, prvog dana nakon senzibilizacije, kada je zabeleženo najranije povećanje proliferativne aktivnosti ćelija SdLČ, kod jedinki oba soja (Tabela 2). Povećanje relativnog i ukupnog broja CD25<sup>+</sup> ćelija zapaženo je kod jedinki oba soja nakon primene samo više doze DNCB-a, uz povećanje gustine ekspresije ovog molekula (srednji intenzitet fluorescence) pri ovoj dozi samo kod jedinki DA soja.



Relativan i ukupan broj CD25<sup>+</sup> ćelija niži je u svim eksperimentalnim grupama kod AO u poređenju sa DA jedinkama (p<0.05).



**Slika 4. Broj ćelija drenirajućeg limfnog čvora i njihova proliferativna aktivnost u toku faze senzibilizacije.** Životinje su senzibilisane nanošenjem doza DNCB-a 0.4% ili 4% na dorzalnu površinu kože, dok je kontrolnim životinjama nanošen samo rastvarač. Prvog, trećeg i petog dana nakon senzibilizacije izolovani su drenirajući limfni čvorovi (aksilarni i skapularni)

(SdLČ). Promena broja ćelija SdLČ kod jedinke DA i AO soja (A). Promena *ex vivo* proliferativne aktivnosti ćelija SdLČ (B). Proliferativni odgovor ćelija SdLČ na *in vitro* stimulaciju sa IL-2 (50 jedinica/ml kulture) (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolne jedinice i # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  u odnosu na 0.4% DNCB, odgovarajućeg soja; <sup>s</sup> $p < 0.05$ , <sup>ss</sup> $p < 0.01$ , <sup>sss</sup> $p < 0.001$  u odnosu na jedinice DA soja.

**Tabela 2. Ekspresija CD25 molekula na površini ćelija drenirajućeg limfnog čvora prvog dana senzibilizacije**

Doza DNCB-a (%)	DA			AO		
	CD25 <sup>+</sup> ćelije			CD25 <sup>+</sup> ćelije		
	%	x10 <sup>6</sup>	SIF	%	x10 <sup>6</sup>	SIF
0/0	4.0 $\pm$ 0.5	76.2 $\pm$ 22.2	2.6 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.3	36.1 $\pm$ 4.6	2.3 $\pm$ 0.4
0.4/0.13	4.6 $\pm$ 0.5	68.2 $\pm$ 30.3	2.8 $\pm$ 0.03	3.1 $\pm$ 0.1	47.7 $\pm$ 15.5	2.3 $\pm$ 0.1
4/1.3	4.7 $\pm$ 0.4 <sup>*</sup>	262.7 $\pm$ 51.0 <sup>*</sup>	3.2 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	3.2 $\pm$ 0.6 <sup>*s</sup>	60.9 $\pm$ 10.8 <sup>*s</sup>	2.8 $\pm$ 0.5

SIF-Srednji Intenzitet Fluorescence

Statistički značajne razlike: \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolne jedinice odgovarajućeg soja; <sup>s</sup> $p < 0.05$  u odnosu na jedinice DA soja.

#### 4.2.2.2. Zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru trećeg i petog dana senzibilizacije

Ispitivanje procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija, glavnih subpopulacija T ćelija, u SdLČ pokazalo je različitu dinamiku promena trećeg i petog dana kod jedinki DA soja, kao i različit obrazac promena kod jedinki DA u odnosu na AO soj (Tabela 3.). Naime, kod jedinki DA soja (Tabela 3A), trećeg dana nisu zabeležene promene u zastupljenosti ove dve ćelijske subpopulacije kod senzibilisanih u odnosu na nesenzibilisane jedinke, dok je petog dana zabeleženo povećanje zastupljenosti CD4<sup>+</sup> ćelija nakon primene samo više doze DNCB-a, i smanjenje zastupljenosti CD8<sup>+</sup> ćelija nakon primene niže doze, mada je zapažen i numerički pad ( $p=0.1$ ) zastupljenosti CD8<sup>+</sup> ćelija nakon primene više doze, u odnosu na nesenzibilisane jedinke. Ovakve promene su petog dana dovele do povećanja odnosa ove dve ćelijske subpopulacije (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), mada samo numeričkog ( $p=0.1$ ) nakon primene niže doze. S obzirom na povećan broj ukupnih ćelija SdLČ nakon tretmana sa DNCB-om kod jedinki ovog soja, kada se preračuna ukupan broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija zapaža se dozno-zavisno povećanje i trećeg i petog dana senzibilizacije. Kod jedinki AO soja (Tabela 3B) senzibilisanih sa 0.4% ili 4% DNCB-om procentualna zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija se smanjuje u odnosu na nesenzibilisane jedinke i trećeg i petog dana senzibilizacije, i niža je u odnosu na DA jedinke. Procentualna zastupljenost CD8<sup>+</sup> ćelija nakon primene svake od ispitivanih doza DNCB-a je povećana samo petog dana, mada je zabeleženo numeričko povećanje ( $p=0.1$ ) i trećeg dana pri primeni više doze. Ove promene dovele su do smanjenja odnosa ove dve ćelijske subpopulacije trećeg dana nakon primene samo više doze, i petog dana nakon primene obe od doza DNCB-a. Kod ovog soja, preračunavanje ukupnog broja pokazalo je nepromenjen broj CD4<sup>+</sup> ćelija u oba termina, ali značajno povećanje CD8<sup>+</sup> ćelija trećeg dana tj. numeričko povećanje ( $p=0.09$ ) petog dana nakon senzibilizacije samo sa višom dozom, u odnosu na nesenzibilisane jedinke. Iako je ukupan broj CD8<sup>+</sup> ćelija povećan, niži je u odnosu na jedinke DA soja.

**Tabela 3. Zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u toku faze senzibilizacije**

**A**

Dani nakon senzibilizacije	Doza DNCB-a (%)	DA				CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
		CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>		
		%	x10 <sup>6</sup>	%	x10 <sup>6</sup>	
treći	0	56.9±3.3	12.8±4.8	20.5±1.0	4.6±1.7	2.8±0.3
	0.4	56.1±0.01	40.5±12.3 <sup>***</sup>	18.9±3.2	13.6±4.2 <sup>***</sup>	3.0±0.5
	4	53.2±2.0	55.5±18.9 <sup>***#</sup>	19.2±1.0	20.0±6.8 <sup>***#</sup>	2.8±0.04
peti	0	60.4±1.1	12.7±7.1	25.2±1.8	5.3±2.9	2.4±0.2
	0.4	58.3±3.3	35.0±17.2 <sup>***</sup>	22.6±1.8 <sup>*</sup>	13.6±6.7 <sup>**</sup>	2.6±0.1
	4	62.2±0.9 <sup>*</sup>	50.3±16.6 <sup>***#</sup>	23.6±0.6	19.1±6.3 <sup>***#</sup>	2.6±0.0 <sup>*</sup>

**B**

Dani nakon senzibilizacije	Doza DNCB-a (%)	AO				CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
		CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>		
		%	x10 <sup>6</sup>	%	x10 <sup>6</sup>	
treći	0	54.5±4.4	14.5±2.1	19.4±2.5	5.2±0.8	2.8±0.1
	0.4	48.1±1.8 <sup>*</sup>	13.1±3.4	19.3±3.5	5.3±1.4	2.5±0.4
	4	46.4±4.3 <sup>*</sup>	19.6±7.7	22.2±1.7	9.4±3.7 <sup>sss</sup>	2.1±0.0 <sup>*</sup>
peti	0	60.2±1.1	12.8±6.7	26.9±0.4	5.7±3.0	2.2±0.1
	0.4	58.0±0.8 <sup>*</sup>	10.6±4.1	30.8±3.6 <sup>*s</sup>	5.6±2.2	1.9±0.2 <sup>*</sup>
	4	54.2±2.1 <sup>*#s</sup>	17.4±6.1	30.6±1.5 <sup>*</sup>	9.8±3.4	1.8±0.2 <sup>*s</sup>

Statistički značajne razlike: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 u odnosu na kontrolne jedinice i #p<0.05 u odnosu na 0.4% DNCB, odgovarajućeg soja; <sup>s</sup>p<0.05, <sup>sss</sup>p<0.001 u odnosu na jedinice DA soja.

#### **4.2.3. Citokinski odgovor ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi senzibilizacije**

U AKD kod ljudi, i na mišjem modelu bolesti, pokazano je da je aktivacija efektorskih Th1/tip1 i Th17/tip17 ćelija mehanizam u osnovi tkivnog oštećenja (Albanesi i drugi, 2000; Xu i drugi, 1996). Uloga Th2/tip2 ćelija je međutim kontroverzna, jer postoje podaci o regulatornoj (Xu i drugi, 1996; Gautman i drugi, 1992; Asada i drugi, 1997), ali i efektorskoj (Traidl i drugi, 1999; Weigmann i drugi,

1997) funkciji IL-4, koji je glavni citokin ovih ćelija. Ne postoje podaci o Th1 i Th2 imunskom odgovoru u fazi senzibilizacije, kao ni o ulozi Th17 ćelija u reakciji KP, kod pacova.

U svetlu toga, ispitana je dinamika produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17, glavnih citokina Th1 i Th17 imunskog odgovora za koje je pokazano da su bitni za indukciju reakcije KP kod miševa (He i drugi, 2009), kao i Th2/anti-inflamatornih citokina IL-4 i IL-10, od strane ćelija SdLČ kod pacova. Ekspresija gena za ispitivane citokine određena je petog dana senzibilizacije, kada se najčešće vrši ispitivanje ove faze reakcije KP kod životinja (Xu i drugi, 1997; He i drugi, 2009), tj. kada se smatra da je aktivacija efektorskih i memorijskih ćelija specifičnih za haptenu kompletna (Vocanson i drugi, 2009).

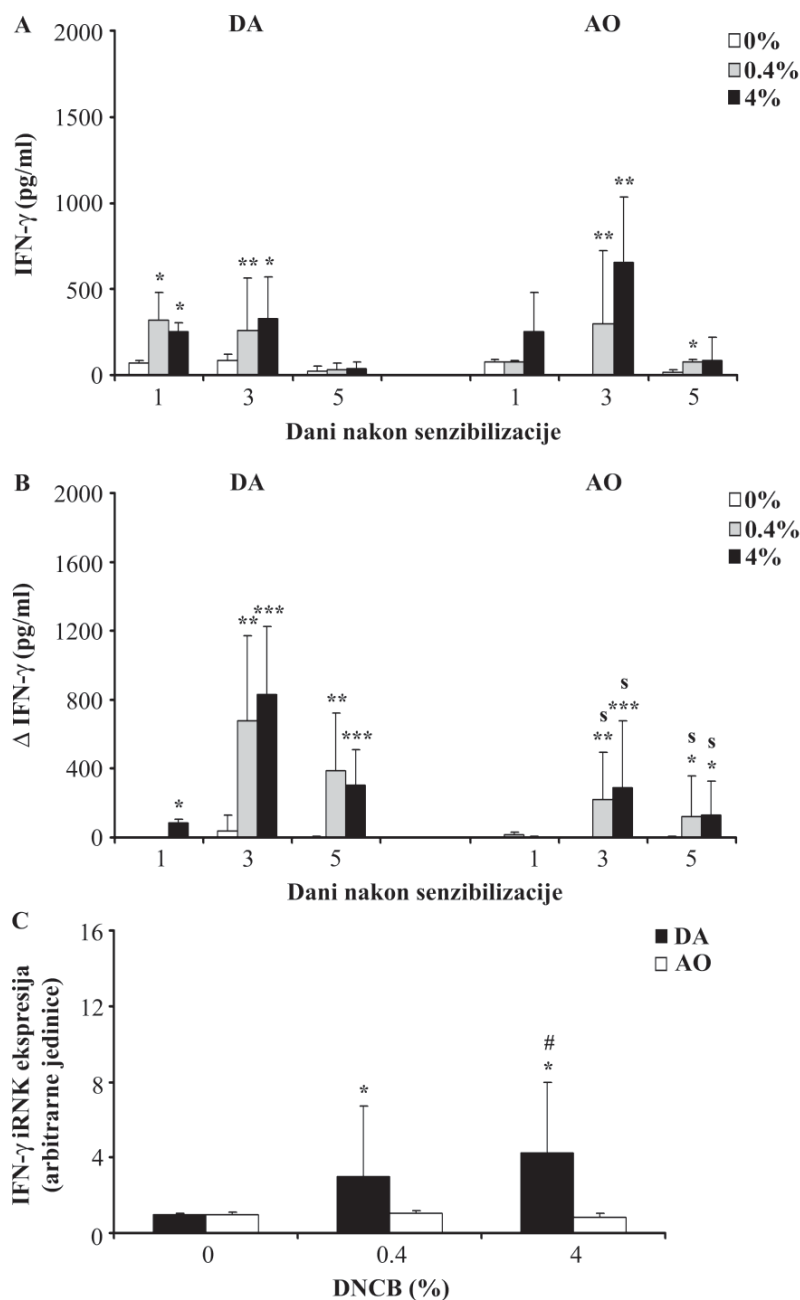
#### **4.2.3.1. Produkcija i ekspresija IFN- $\gamma$ od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije**

Spontana produkcija IFN- $\gamma$  povećana je prvog dana senzibilizacije kod jedinki DA soja nakon primene svake od doza DNCB-a, dok je kod AO soja u ovom terminu zabeležena tendencija povećanja ( $p=0.06$ ) spontane produkcije nakon primene samo više doze, u odnosu na nesenzibilisane jedinke. Trećeg dana spontana produkcija ovog citokina povećana je kod jedinki oba soja nakon senzibilizacije sa svakom od doza, dok petog dana produkcija opada na nivo zabeležen kao kod kontrola, osim nakon primene niže doze kod jedinki AO soja, kada se povećanje u odnosu na nesenzibilisane jedinke održava značajno višim (Slika 5A).

U cilju analize specifičnosti produkcije citokina, ispitan je odgovor ćelija SdLČ na *in vitro* stimulaciju sa dinitrobenzen sulfonskom kiselinom (DNBS), vodosolubilnim analogom DNCB-a. Porast specifične produkcije IFN- $\gamma$  zabeležen je prvog dana kod jedinki DA soja senzibilisanih samo sa višom dozom DNCB-a, i trećeg i petog dana kod jedinki oba soja nakon primene svake od doza, ali je responsivnost na DNBS generalno niža kod senzibilisanih jedinki AO u odnosu na senzibilisane jedinke DA soja (Slika 5B).

Određivanje količine iRNK za IFN- $\gamma$  petog dana senzibilizacije je pokazalo dozno-zavisno povećanje relativne ekspresije gena za ovaj citokin kod DA jedinki, dok

je kod AO soja ekspresija nepromenjena u odnosu na nesenzibilisane jedinke (Slika 5C).



**Slika 5. Produkcija IFN- $\gamma$  i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora u toku faze senzibilizacije. Spontana produkcija IFN- $\gamma$  (A) i specifična produkcija (nakon *in vitro* stimulacije na DNBS-om, 10 $\mu$ g/ml kulture) (B) od strane ćelija SdLČ kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNA za IFN- $\gamma$  određena RT-PCR metodom u ćelijama**

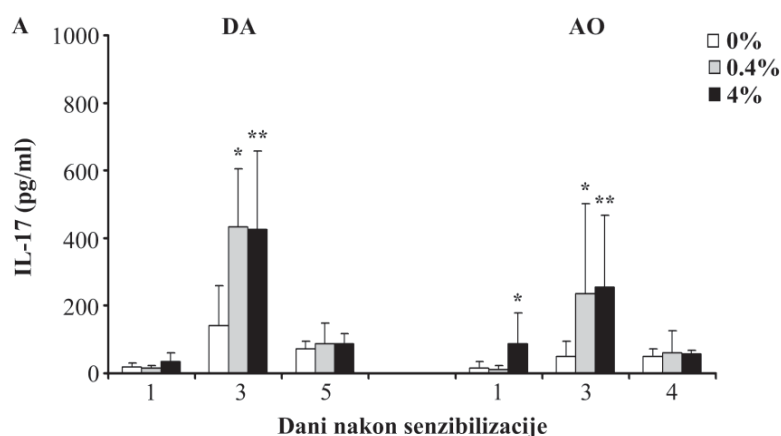
SdLČ petog dana senzibilizacije (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD, tj. kao arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolne jedinice i # $p < 0.05$  u odnosu na 0.4% DNCB, odgovarajućeg soja;  $^s p < 0.05$  u odnosu na jedinice DA soja.

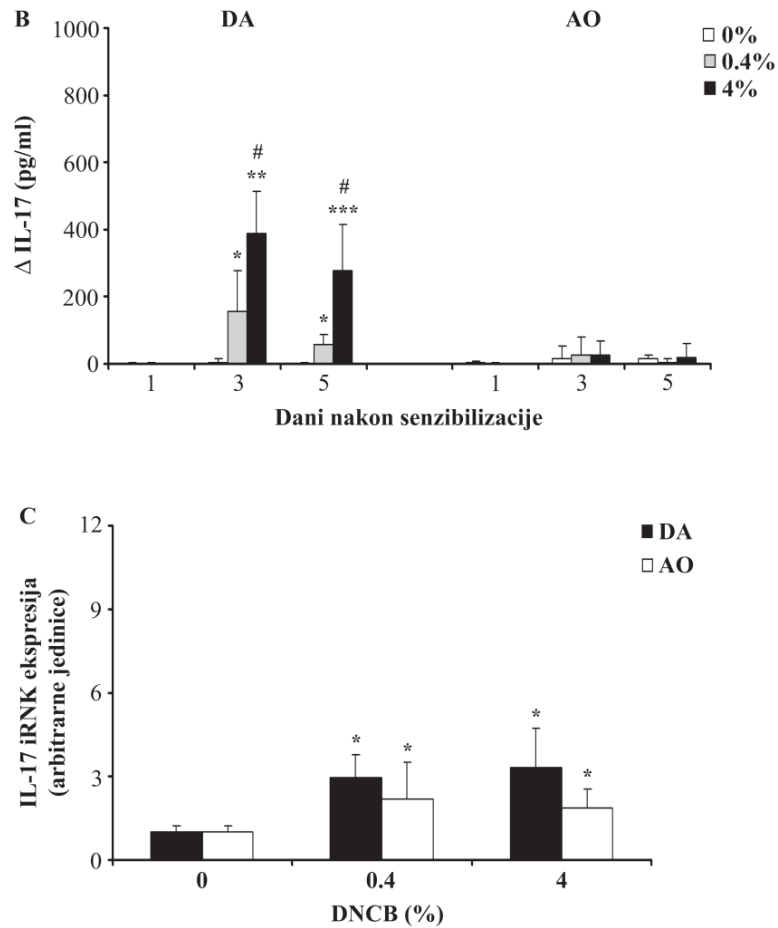
#### 4.2.3.2. Produkcija i ekspresija IL-17 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije

Spontana produkcija IL-17 povećana je prvog dana samo kod jedinici AO soja senzibilisanih samo sa višom dozom DNCB-a, i trećeg dana kod jedinici oba soja senzibilisanih i sa 0.4% i sa 4% DNCB-om, u odnosu na nesenzibilisane jedinice (Slika 6A).

*In vitro* stimulacija ćelija SdLČ sa DNBS-om dovela je do dozno-zavisnog povećanja specifične produkcije kod jedinici DA soja trećeg i petog dana, dok kod AO pacova nije zapažena promena produkcije IL-17 u odgovoru na *in vitro* antigensku stimulaciju (Slika 6B).

Ekspresija gena za IL-17 je veća kod senzibilisanih u odnosu na nesenzibilisane životinje kod oba soja (Slika 6C).



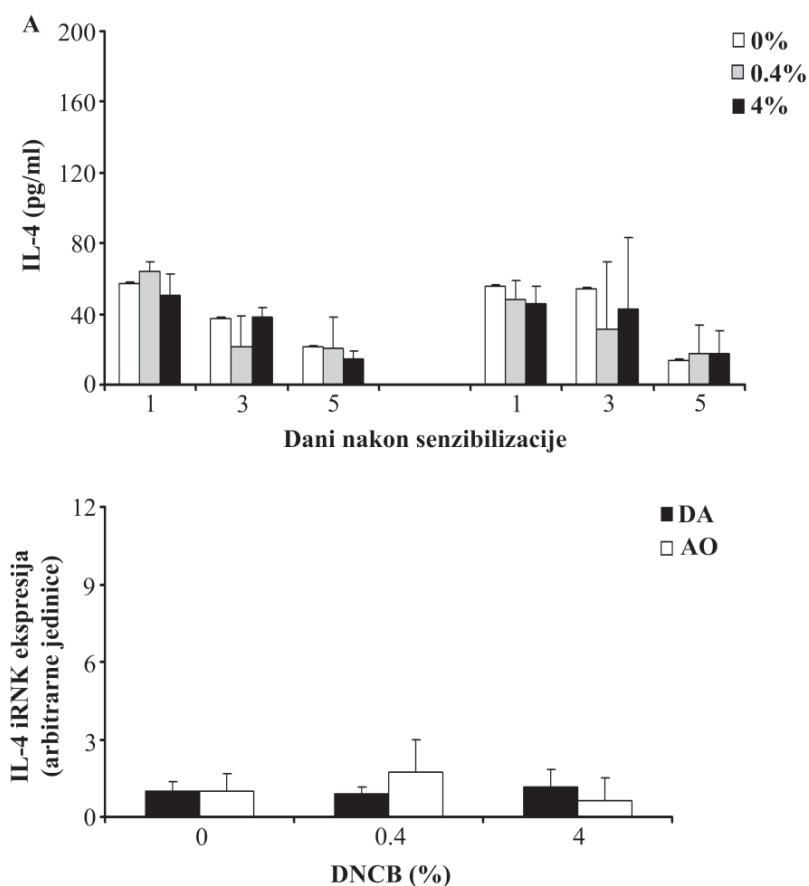


**Slika 6. Produkcija IL-17 i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora u toku faze senzibilizacije.** Spontana produkcija IL-17 (A) i specifična produkcija (B) od strane ćelija SdLČ kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNAK za IL-17 određena RT-PCR metodom u ćelijama SdLČ petog dana senzibilizacije (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD, tj. kao arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolne jedinice i # $p < 0.05$  u odnosu na 0.4% DNCB, odgovarajućeg soja.



#### 4.2.3.3. Produkcija i ekspresija IL-4 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije

S obzirom da su spontana i DNBS-stimulisana produkcija IL-4 bile ispod nivoa detekcije, produkcija ovog citokina ispitana je nakon stimulacije ćelija sa ConA (1  $\mu\text{g/ml}$  kulture). Rezultati su pokazali nepromenjenu produkciju IL-4 kod senzibilisanih u odnosu na nesenzibilisane jedinke oba soja, i u svim ispitivanim terminima (Slika 7A), kao i nepromenjenu ekspresiju gena za ovaj citokin petog dana senzibilizacije (Slika 7B).



**Slika 7. Produkcija IL-4 i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora u toku faze senzibilizacije.** Produkcija IL-4 nakon *in vitro* stimulacije ćelija SdLČ sa ConA (1  $\mu\text{g/ml}$  kulture) (A) kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNA za IL-4 određena RT-PCR metodom u ćelijama SdLČ petog dana senzibilizacije (B). Rezultati su

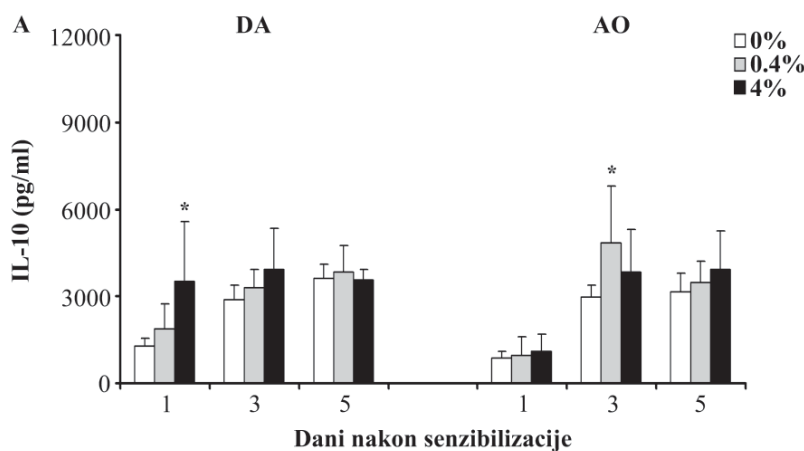
prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD, tj. kao arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD.

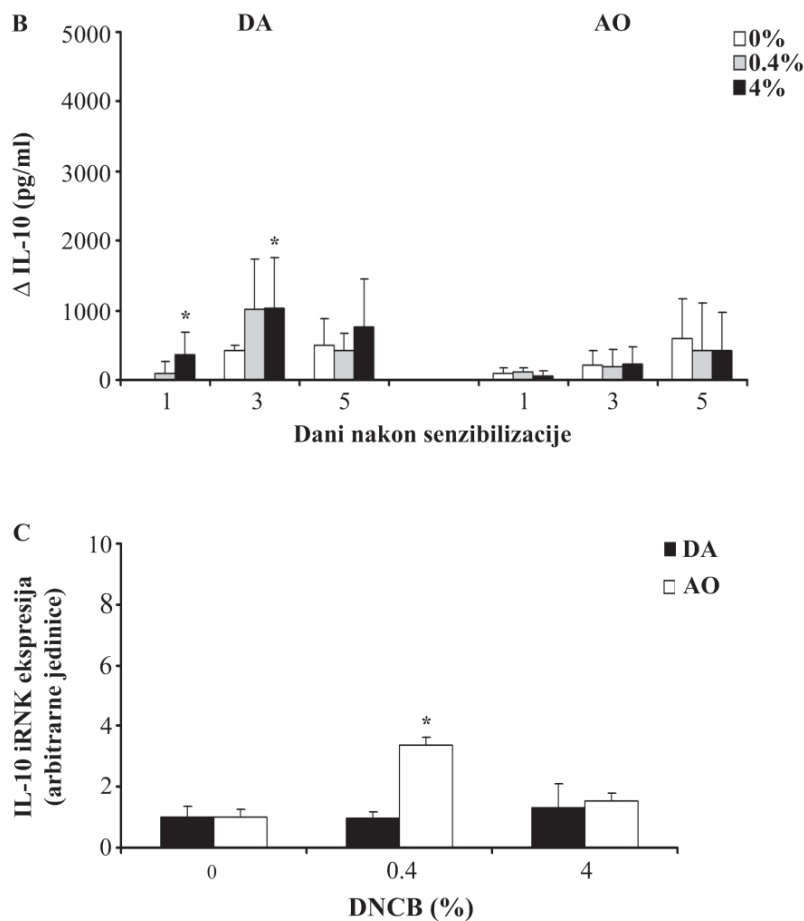
#### 4.2.3.4. Produkcija i ekspresija IL-10 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora tokom faze senzibilizacije

Porast spontane produkcije IL-10 zabeležen je kod senzibilisanih jedinki DA soja samo prvog dana senzibilizacije, nakon primene niže doze (numerički porast,  $p=0.08$ ) i više doze DNCB-a. Kod AO soja porast je zabeležen samo na nižoj dozi, trećeg dana nakon poslednje DNCB aplikacije (Slika 8A).

Nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa DNBS-om utvrđena je značajno veća produkcija IL-10 kod jedinki DA soja prvog dana nakon senzibilizacije samo sa visokom dozom, i trećeg dana nakon senzibilizacije i sa nižom dozom (numeričko povećanje,  $p=0.088$ ) i sa višom dozom, u odnosu na kontrole. Kod jedinki AO soja nije zapažena promena u specifičnoj produkciji ovog citokina (Slika 7B).

Ekspresija gena za IL-10 nepromenjena je kod jedinki DA soja, dok je kod jedinki AO soja zabeležen porast ekspresije gena za IL-10 nakon nanošenja samo niže DNCB doze, u odnosu na nesenzibilisane jedinke (Slika 8C).





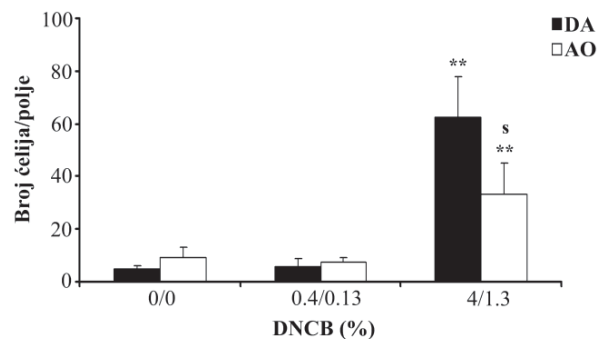
**Slika 8. Produkcija IL-10 i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora u toku faze senzibilizacije.** Spontana produkcija IL-10 (A) i specifična produkcija (B) od strane ćelija SdLČ kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNAK za IL-10 određena RT-PCR metodom u ćelijama SdLČ petog dana senzibilizacije (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD, tj. kao arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolne jedinice odgovarajućeg soja.

### **4.3. Mehanizmi ekspresije reakcije KP kod pacova**

U fazi elicitanje reakcije KP, nakon ponovnog kontakta bilo kog dela kože sa haptenom, lokalno dolazi do oslobađanja inflamatornih medijatora koji podstiču infiltraciju specifičnih T limfocita i inflamatornih leukocita u kožu, čime se amplifikuje početna inflamatorna reakcija u intenzivnu antigen-specifičnu reakciju kontaktne preosetljivosti. Podaci o efektorskim mehanizmima ekspresije reakcije KP kod pacova dobijeni su ispitivanjem produkcije inflamatornih medijatora u kondicioniranom medijumu organokulture uha, kao i ispitivanjem aktivnosti ćelija aurikularnih LČ, koji dreniraju mesto elicitanje (EdLČ), i za koje je poznato da brzo i intenzivno reaguju na sekundarno izlaganje haptenu. Kao kontrolna grupa životinjama tretiranim sa DNCB-om (tretman 0.4%/0.13% ili 4%/1.3%), korišćene su jedinke kojima je i u fazi senzibilizacije i u fazi elicitanje nanošen samo rastvarač (tretman 0%/0%).

#### **4.3.1. Infiltracija ćelija u uho nakon elicitanje reakcije KP**

Jedan od pokazatelja inflamacije u ekspresiji reakcije KP je povećana infiltracija ćelija u kožu (Roupe i Ridell, 1979). Kvantifikacija ćelijskog infiltrata u uhu pokazala je povećanje broja mononuklearnih ćelija 24 časa nakon tretmana samo sa višom dozom DNCB-a (tretman 4%/1.3%) u odnosu na kontrolne životinje (tretman 0/0%) kod oba soja, ali je zapaženo povećanje gustine mononuklearnog infiltrata značajno niže kod AO u odnosu na DA soj (Slika 9). Ovi nalazi su u saglasnosti za histopatološkom slikom kože uha. Broj mastocita nije promenjen ni kod jedinki DA ( $5.8 \pm 3.1$ ,  $6.4 \pm 4.7$  i  $7.9 \pm 6.3$  za tretmane 0%/0%, 0.4%/0.13% i 4%/1.3% redom) ni AO soja ( $8.0 \pm 3.8$ ,  $7.6 \pm 1.2$  i  $6.2 \pm 1.6$  za tretmane 0%/0%, 0.4%/0.13% i 4%/1.3% redom).



**Slika 9. Promene u gustini mononuklearnog infiltrata u koži uha 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti.** Kvantitativna analiza obuhvatala je brojanje mononuklearnih ćelija na najmanje 30 polja uvećanja 100x koja su zahvatala čitavu površinu histoloških preseka tretiranog uha, bojenih hematoksilinom i eozinom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost broja ćelija na polje, iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \*\* $p < 0.01$  u odnosu na kontrolne jedinice odgovarajućeg soja; <sup>s</sup> $p < 0.05$  u odnosu na jedinice DA soja.

#### 4.3.2. Produkcija (pro)inflamatornih medijatora u kondicioniranom medijumu organokulture uha

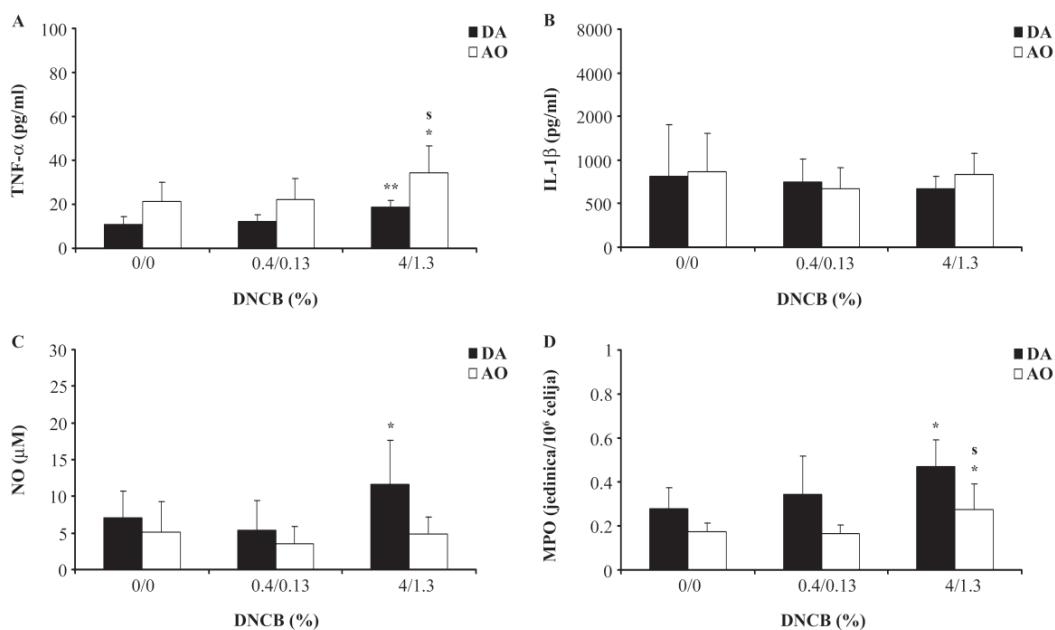
##### 4.3.2.1. Ispitivanje markera inflamacije (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO i unutarćelijski MPO) u kondicioniranom medijumu organokulture uha

Povećana produkcija TNF- $\alpha$ , u odnosu na kontrolne jedinice, zabeležena je nakon primene samo više doze DNCB-a kod oba soja. Značajno viša produkcija TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) je izmerena kod AO u odnosu na DA soj, u svim eksperimentalnim grupama (Slika 10A).

Produkcija IL-1 $\beta$  nije se promenila nakon primene svake od doza elicitacije kod senzibilisanih životinja u odnosu na kontrolne životinje, kod oba soja (Slika 10B).

Povećanje produkcije NO zapaženo je kod DA soja samo pri višoj dozi DNCB-a, dok je kod AO soja produkcija NO nepromenjena, u odnosu na kontrolne jedinice (Slika 10C).

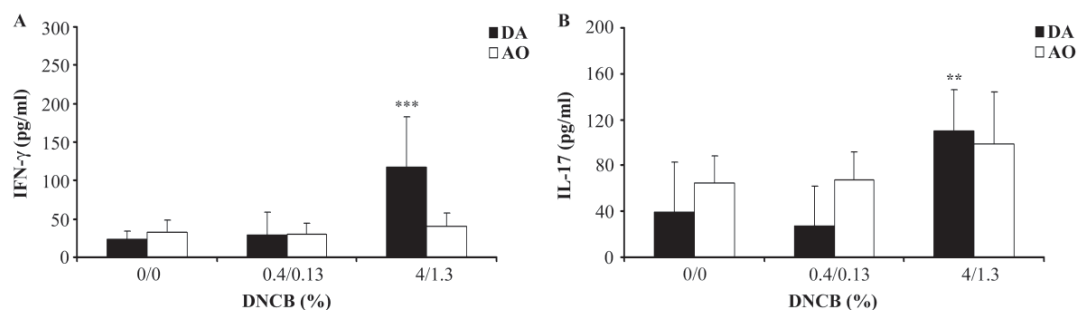
Aktivnost enzima mijeloperoksidaze (MPO) ispitana je u ćelijama koje su migrirale iz kože u medijum u toku 48-časovne organokulture eksplanata kože uha, i indirektan je pokazatelj migracije granulocita u uho, ali i njihove aktivacije, nakon elicitacije reakcije. Značajno povećanje MPO aktivnosti zabeleženo je kod jedinki DA i AO soja tretiranih samo višom dozom DNCB-a, u odnosu na životinje tretirane rastvaračem, pri čemu je značajno veća aktivnost zapažena kod DA u odnosu na AO soj (Slika 10D).



**Slika 10. Koncentracija medijatora inflamacije (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, MPO) u kondicioniranom medijumu organokulture uha.** Koncentracija TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) i NO (C) određivana je u medijumu u kome su kultivisani eksplanti tretirane kože uzete 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti. Aktivnost MPO (D) određivana je unutar ćelija koje su migrirale iz kože u medijum u toku 48-časovne organokulture eksplanata tretirane kože. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije tj. aktivnosti enzima na 10<sup>6</sup> ćelija, iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \* p<0.05, \*\* p<0.01 u odnosu na 0%/0% odgovarajućeg soja; <sup>s</sup>p<0.05, <sup>ss</sup>p<0.01 u odnosu na jedinke DA soja.

#### 4.3.2.2. Produkcija IFN- $\gamma$ i IL-17 u kondicioniranom medijumu organokulture uha

Produkcija efektorskih citokina IFN- $\gamma$  (Slika 11A) i IL-17 (Slika 11B) povećana je kod jedinki DA soja nakon primene samo više doze DNCB-a, u odnosu na kontrolnu grupu. Kod ovog soja, utvrđena je statistički značajna korelacija između produkcije ova dva citokina i otoka uha ( $R=0.80$ ,  $Y=20.16+0.721*X$ ,  $p<0.001$  za IFN- $\gamma$ , i  $R=0.82$ ,  $Y=3.53+0.671*X$ ,  $p<0.001$  za IL-17). Iako nižeg koeficijenta, zapažena je i statistički značajna korelacija između produkcije IFN- $\gamma$  i NO ( $R=0.64$ ,  $Y=5.1787+0.0038*X$ ,  $p=0.01$ ) kod jedinki DA soja. Kod jedinki AO soja zabeležena je tendencija ( $p=0.069$ ) povećanja produkcije IFN- $\gamma$  samo pri višoj dozi DNCB-a (Slika 11A), uz prisustvo umereno visoke ali statistički značajne korelacije između produkcije ovog citokina i otoka uha ( $R=0.66$ ,  $Y=24.822+0.1338*X$ ,  $p=0.03$ ). Produkcija IL-17 nije značajno promenjena nakon elicitacije reakcije kod senzibilisanih jedinki AO soja, u odnosu na kontrole (Slika 11B).



**Slika 11. Koncentracija IFN- $\gamma$  i IL-17 u kondicioniranom medijumu organokulture uha.**

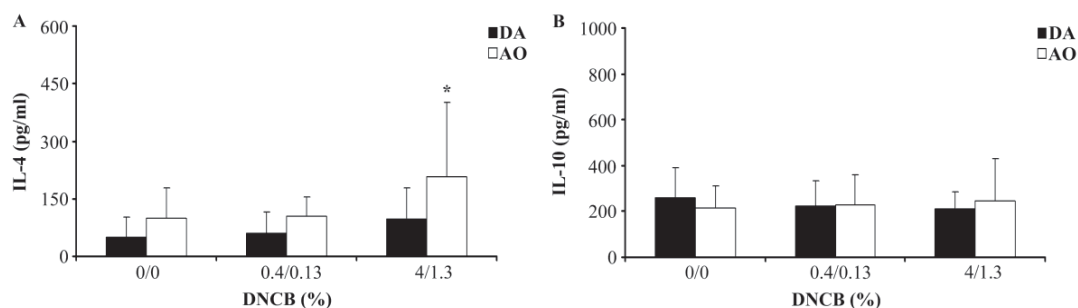
Koncentracija IFN- $\gamma$  (A) i IL-17 (B) određivana je u medijumu u kome su kultivisani eksplanti tretirane kože uzete 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD.

Statistički značajne razlike \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  u odnosu na kontrolne jedinice odgovarajućeg soja.

#### 4.3.2.3. Produkcija Th2/anti-inflamatornih citokina u kondicioniranom medijumu organokulture uha

Produkcija IL-4 je povećana samo kod jedinki AO soja, i to nakon primene samo više doze haptena (tretman 4%/1.3%), u odnosu na kontrole (tretman 0%/0%) (Slika 12A). Takođe, zapaženo je da je produkcija IL-4 generalno viša kod AO soja u odnosu na DA soj, u svim eksperimentalnim grupama ( $p < 0.05$ ).

Produkcija IL-10 je nepromenjena nakon primene svake od DNCB doza u odnosu na kontrolne jedinice, kod oba soja (Slika 12B).



**Slika 12. Koncentracija IL4 i IL-10 u kondicioniranom medijumu organokulture uha.**

Koncentracija IL-4 (A) i IL-10 (B) određivana je u medijumu u kome su kultivisani eksplanti tretirane kože uzete 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolne jedinice odgovarajućeg soja.



### 4.3.3. Aktivnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora nakon elicitacije reakcije kod senzibilisanih pacova

#### 4.3.3.1. Promena broja ćelija i njihove proliferativne aktivnosti u drenirajućem limfnom čvoru u fazi senzibilizacije

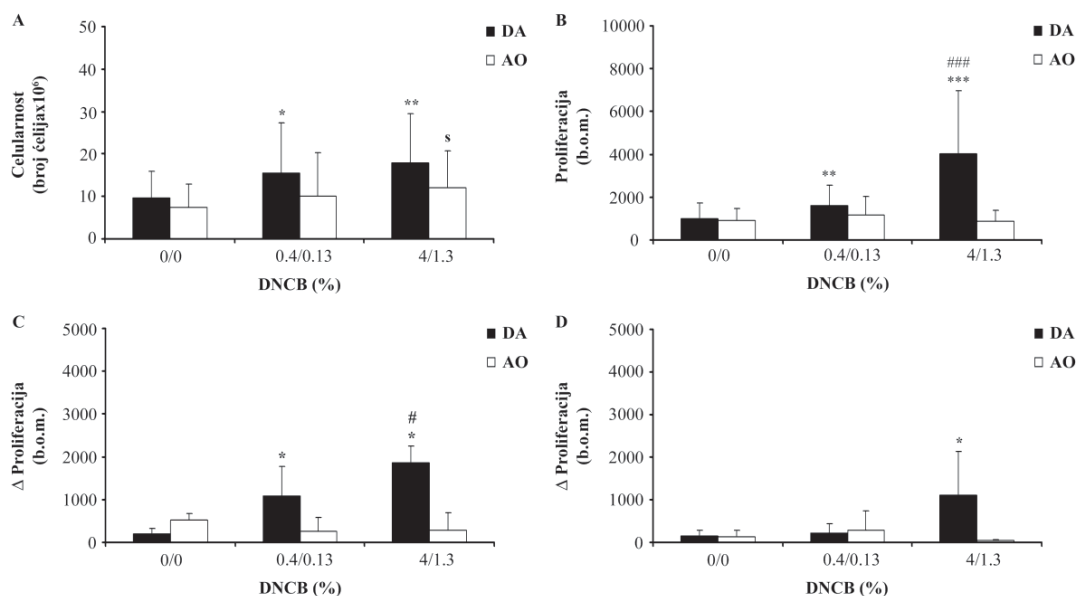
Broj ćelija u EdLČ je povećan nakon elicitacije reakcije KP kod jedinki DA soja tretiranih sa obe doze DNCB-a (tretman 0.4%/0.13% ili 4%/1.3%) u odnosu na kontrole (tretman 0%/0%), dok je kod jedinki AO soja zabeleženo numeričko povećanje ( $p=0.076$ ) broja ćelija nakon primene samo više doze DNCB-a u odnosu na kontrole, ali značajno niže nego kod jedinki DA soja ( $p=0.02$ ) (Slika 13A).

*Ex vivo* proliferativni odgovor ćelija EdLČ pokazao je dozno-zavisno povećanje kod jedinki DA soja, dok je kod jedinki AO soja nepromenjen, u odnosu na kontrolne jedinice (Slika 13B).

Kod jedinki DA soja zabeleženo je dozno-zavisno povećanje proliferativnog odgovora nakon stimulacije ćelija sa egzogenim IL-2, dok ćelije AO soja nisu odgovorile promenom proliferativne aktivnosti nakon stimulacije sa IL-2 (Slika 13C).

Analizom membranske ekspresije  $\alpha$  lanca receptora za IL-2 utvrđeno je povećanje procentualne zastupljenosti CD25<sup>+</sup> ćelija (kao i njihovog ukupnog broja) u EdLČ jedinki DA soja tretiranih sa DNCB-om, mada je pri nižoj dozi samo numeričko povećanje ( $p=0.08$ ). Takođe, kod jedinki ovog soja utvrđeno je povećanje srednjeg intenziteta fluorescence (SIF) nakon primene svake od doza DNCB-a, u odnosu na kontrolne životinje. Kod AO soja procentualna zastupljenost CD25<sup>+</sup> ćelija je nepromenjena kod jedinki tretiranih DNCB-om u odnosu na kontrolne jedinice, dok je nakon preračunavanja ukupnog broja utvrđeno statistički značajno, i numeričko povećanje ( $p=0.1$ ) kod jedinki tretiranih nižom (tretman 0.4%/0.13) i višom (4%/1.3%) dozom, redom. SIF je povećan kod jedinki ovog soja tretiranih samo sa višom dozom DNCB-a. Ispitivani parametri u svim eksperimentalnim grupama niži su kod AO u odnosu na DA soj (Tabela 4).

Specifičnost proliferacije ćelija EdLČ ispitana je pomoću *in vitro* stimulacije ovih ćelija sa DNBS-om. Samo ćelije EdLČ jedinki DA soja kod kojih je reakcija KP izazvana nanošenjem više doze DNCB-a (tretman 4%/1.3%), odgovorile su na egzogeno dodati haptenu povećanjem proliferativne aktivnosti (Slika 13D).



**Slika 13. Broj ćelija drenirajućeg limfnog čvora i njihova proliferativna aktivnost nakon elicitanje reakcije kontaktne preosetljivosti.** Drenirajući limfni čvorovi uha (aurikularni) (EdLČ) uzeti su 24 časa nakon elicitanje reakcije, nakon čega je određena njihova celularnost (A). *Ex vivo* proliferativna aktivnost ćelija EdLČ (B), proliferativna aktivnost nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa IL-2 (50 jedinica/ml kulture) (C) i proliferativna aktivnost nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa DNBS-om (10 µg/ml kulture) (D). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± SD. Statistički značajne razlike: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 u odnosu na 0%/0% i #p<0.05, ###p<0.001 u odnosu na 0.4%/0.13% DNCB, odgovarajućeg soja; <sup>s</sup>p<0.05 u odnosu na jedinke DA soja.

**Tabela 4. Ekspresija CD25 molekula na površini ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitanje reakcije**

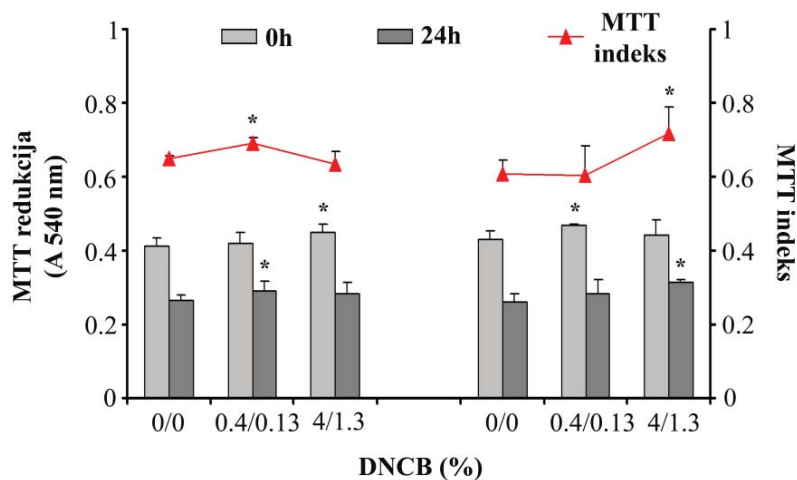
Doza DNCB-a (%)	DA			AO		
	CD25 <sup>+</sup> ćelije			CD25 <sup>+</sup> ćelije		
	%	x10 <sup>6</sup>	SIF	%	x10 <sup>6</sup>	SIF
0/0	9.2±0.6	165.1±72.5	25.35±1.4	5.7±0.9	56.8±7.0	19.6±1.2
0.4/0.13	10.2±0.9	244.2±17.1	32.3±3.0*	5.9±0.3	85.2±7.2*	21.2±2.3
4/1.3	11.2±0.9 <sup>s</sup>	457.2±91.8*	35.6±2.3*	5.5±0.4	105.7±61.7	24.3±2.5 <sup>s</sup>

SIF-Srednji Intenzitet Fluorescence

Statistički značajne razlike: \*p<0.05 u odnosu na 0%/0% odgovarajućeg soja; <sup>s</sup>p<0.05 u odnosu na DA soj.

#### 4.3.3.2. Metabolička vijabilnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitacije

Jedan od uzroka nepromenjene proliferacije i odsustva responsivnosti na stimulaciju sa IL-2 i haptenom kod jedinki AO soja, može biti povećano umiranje ćelija u kulturi. Iz tog razloga, ispitana je metabolička vijabilnost ćelija, merena pomoću kolorimetrijskog MTT testa (Oez i drugi, 1990). MTT indeks, predstavljen kao odnos redukcije MTT u kulturi ćelija gajenih 24 časa (24h), i sveže izolovanih ćelija (0h), a koji ilustruje stepen preživljavanja ćelija, povećan je kod jedinki DA soja nakon primene samo niže doze DNCB-a (0.4%/0.13%) i kod jedinki AO soja nakon primene samo više doze (tretman 4%/1.3%), u odnosu na kontrolne jedinke (tretman 0%/0%). MTT indeks se nije promenio kod jedinki DA pacova nakon primene više doze DNCB-a, u odnosu na kontrole, verovatno kao posledica povećane MTT redukcije i 0h ( $p=0.03$ )

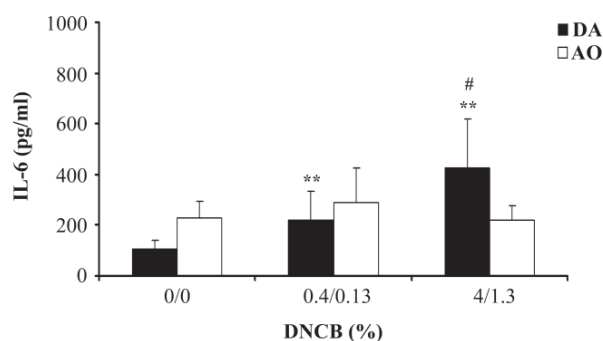


i 24h (numeričko povećanje  $p=0.1$ ) (Slika 14).

**Slika 14. Metabolička vijabilnost ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti.** Statistički značajne razlike  $*p < 0.05$  u odnosu na 0%/0% odgovarajućeg soja.

#### 4.3.3.3. Produkcija IL-6 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora u fazi elicitanije

U mišjem modelu KP sugerisana je uloga IL-6 u proliferaciji ćelija dLČ nakon kontakta kože sa haptenom (Hope i drugi, 1994). S obzirom na različitu proliferativnu aktivnost ćelija EdLČ jedinki DA i AO soja nakon elicitanije reakcije, ispitali smo produkciju ovog citokina. Dozno-zavisno povećanje produkcije IL-6 zabeleženo je samo kod jedinki DA soja, dok je kod AO soja produkcija ovog citokina nepromenjena nakon primene DNCB-a, u odnosu na kontrole (Slika 15). Kod oko 50% jedinki oba soja zapažen je odgovor ćelija EdLČ na *in vitro* stimulaciju haptenom povećanjem produkcije IL-6 (osim kod AO jedinki nakon tretmana nižom dozom DNCB-a koje nisu odgovorile), ali bez značajne razlike između eksperimentalnih grupa usled velikih variranja ( $50 \pm 25$ ,  $56 \pm 43$  i  $26 \pm 9$  za 0/0%, 0.4/0.13% i 4/1.3% redom, kod DA soja, i  $63 \pm 67$ ,  $0 \pm 0$  i  $127 \pm 60$  za 0/0%, 0.4/0.13% i 4/1.3% redom, kod AO soja, izraženo u



pg/ml).

**Slika 15. Spontana produkcija IL-6 od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora 24 časa nakon elicitanije reakcije kontaktne preosetljivosti.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \*\*  $p < 0.01$ , u odnosu na 0%/0% i ##  $p < 0.01$  u odnosu na 0.4%/0.13% DNCB, odgovarajućeg soja.

#### 4.3.3.4. Zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u fazi elicitacije

Kod jedinki oba soja zabeleženo je smanjenje procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup> ćelija nakon primene svake od doza DNCB-a (mada je kod jedinki AO soja pri primeni više doze samo numeričko sniženje, p=0.1), i povećanje procentualne zastupljenosti CD8<sup>+</sup> ćelija, nakon primene svake od doza kod DA soja (Tabela 5A) i samo više doze kod AO soja (Tabela 5B). Ove promene dovele su do smanjenja odnosa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ćelija, nakon primene svake od doza, kod oba soja. Preračunavanjem ukupnog broja CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija utvrđen je nepromenjen broj CD4<sup>+</sup> ćelija, i povećan broj CD8<sup>+</sup> ćelija nakon primene svake od doza kod jedinki DA soja, dok je kod AO soja povećanje ukupnog broja i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija utvrđeno nakon primene samo više DNCB doze (ali značajno niži broj CD8<sup>+</sup> ćelija u odnosu na jedinke DA soja).

**Tabela 5. Zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u fazi elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti.**

A					
Doza DNCB-a (%)	DA				
	CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
	%	x10 <sup>6</sup>	%	x10 <sup>6</sup>	
0/0	49.7±4.6	3.5±2.4	21.1±3.5	1.8±1.3	2.2±0.3
0.4/0.13	45.2±2.7*	5.6±2.5	26.9±2.4*	3.4±1.6*	1.7±0.1*
4/1.3	44.9±4.5*	4.8±2.5	23.9±3.2*	3.4±1.5*	1.8±0.2*

B					
Doza DNCB-a (%)	AO				
	CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
	%	x10 <sup>6</sup>	%	x10 <sup>6</sup>	
0/0	47.7±3.1	1.9±1.0	22.2±4.7	0.8±0.5	2.1±0.4
0.4/0.13	41.8±5.4*	1.2±1.0	23.5±3.0	0.7±0.8	1.8±0.3*
4/1.3	44.6±3.1	3.0±1.1*	26.6±4.6*	2.1±0.9 <sup>s</sup>	1.7±0.3*

Statistički značajne razlike: \* p<0.05, \*\* p<0.01 u odnosu na 0%/0% odgovarajućeg soja; <sup>s</sup>p<0.05 u odnosu na DA soj.

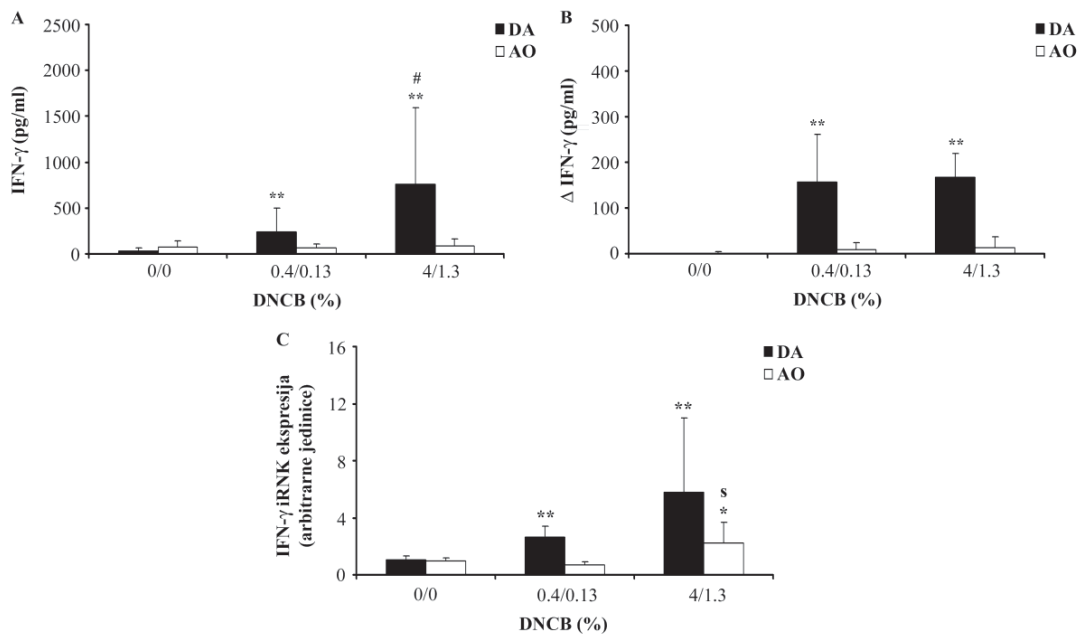
#### **4.3.3.5. Citokinski odgovor ćelija drenirajućeg limfnog ćvora u fazi elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti**

##### **4.3.3.5.1. Produkcija i ekspresija IFN- $\gamma$**

S obzirom da se KP na DNCB kod miša kvalifikuje najćešće kao Th1/tip1 reakcija, ispitana je produkcija i ekspresija IFN- $\gamma$ , glavnog citokina ovog tipa imunskog odgovora (Slika 16). Spontana produkcija IFN- $\gamma$  pokazuje dozno-zavisno povećanje kod jedinki DA soja, dok je kod jedinki AO soja nepromenjena u odnosu na kontrole (Slika 16A).

Nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa DNBS-om došlo je do porasta specifićne produkcije ovog citokina samo kod jedinki DA soja, nakon primene svake od doza DNCB-a (tretman 0.4%/0.13% i 4%/1.3%), u odnosu na kontrole (tretman 0%/0%) (Slika 16B).

Ekspresija gena za IFN- $\gamma$  povećana je kod jedinki DA soja nakon primene svake od doza DNCB-a, dok je kod jedinki AO soja zabeleţeno povećanje ekspresije gena samo pri višoj DNCB dozi (Slika 16C), u odnosu na kontrole, ali znaćajno niţe u odnosu na DA soj.

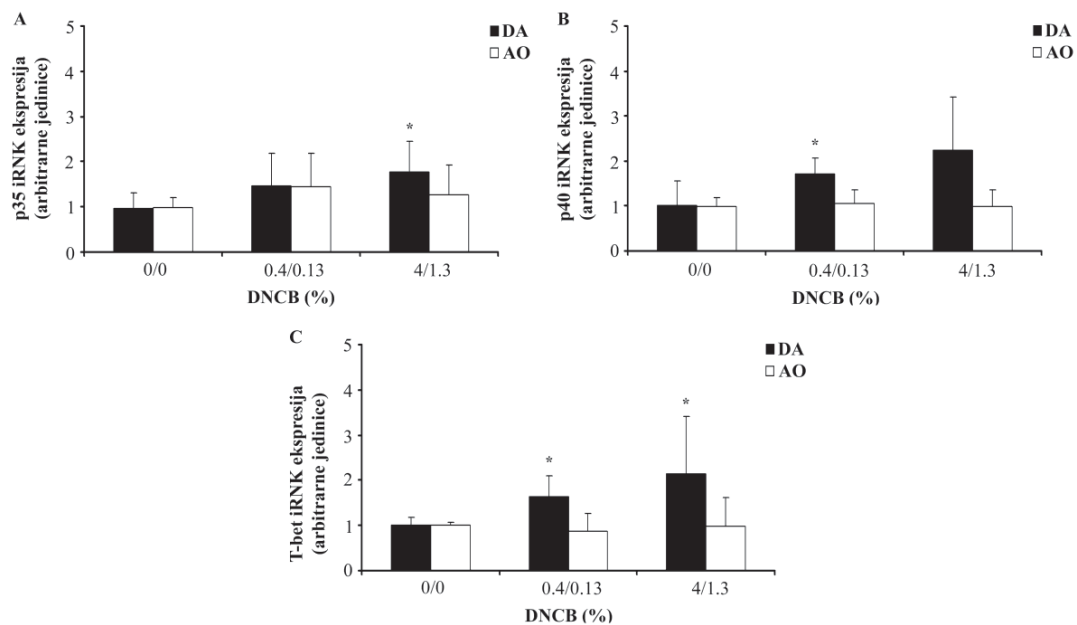


**Slika 16. Produkcija IFN- $\gamma$  i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti.** Spontana produkcija IFN- $\gamma$  (A) i specifična produkcija (nakon *in vitro* stimulacije sa DNBS-om, 10 $\mu$ g/ml kulture) (B) od strane ćelija EdLČ kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNAK za IFN- $\gamma$  određena RT-PCR metodom u ćelijama EdLČ (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD, tj. kao arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na 0%/0% i # $p < 0.05$  u odnosu na 0.4%/0.13% DNCB, odgovarajućeg soja; <sup>s</sup> $p < 0.05$  u odnosu na jedinke DA soja.

#### 4.3.3.5.2. Ekspresija gena za p35, p40 i T-bet

U daljim istraživanjima, ispitana je ekspresija gena za p35 i p40, dve subjedinice citokina IL-12, kao i T-bet, za koje je poznato da su značajni u diferencijaciji Th1/tip1 ćelija.

Ekspresija gena za p35 (Slika 17A) i p40 (Slika 17B) povećana je kod jedinki DA soja nakon primene više doze DNCB-a (tretman 4%/1.3%) (mada samo numeričko povećanje za p40,  $p=0.076$ ), dok je pri nižoj dozi (tretman 0.4%/0.13%) zabeleženo povećanje ekspresije gena samo za p40, u odnosu na kontrole (tretman 0%/0%). Ekspresija gena za T-bet povećana je kod jedinki DA soja nakon primene obe doze senzibilizacije i elicitacije (Slika 17C), u odnosu na kontrole. Kod jedinki AO soja ekspresija gena za p35, p40 i T-bet nije promenjena nakon nanošenja DNCB-a, u odnosu na kontrolnu grupu.



**Slika 17. Ekspresija gena za p35, p40 i T-bet u ćelijama drenirajućeg limfnog čvora 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti. Količina iRNK za p35 (A), p40 (B) i T-bet (C) određena je RT-PCR metodom. Rezultati su prikazani kao srednja arbitrarna**

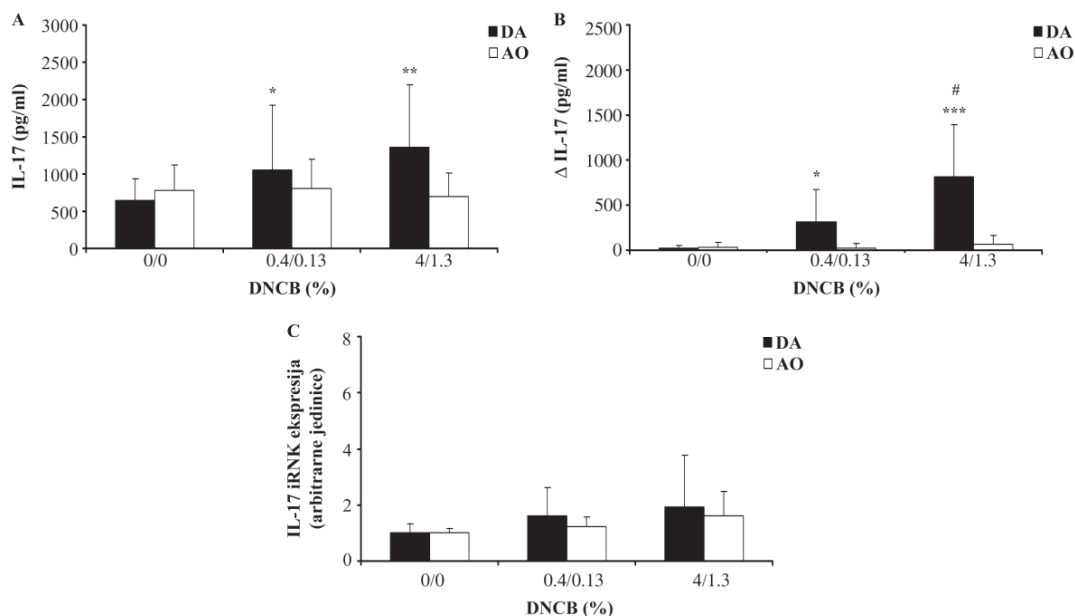


vrednost ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike  $p < 0.05$  u odnosu na 0%/0% DNCB odgovarajućeg soja.

#### 4.3.3.5.3. Produkcija i ekspresija IL-17

Spontana produkcija IL-17 povećana je kod jedinki DA soja nakon primene svake od doza DNCB-a (tretmani 0.4%/0.13% i 4%/1.3%), dok kod senzibilisanih jedinki AO soja elicitacija reakcije nije promenila spontanu produkciju IL-17 od strane ćelija EdLČ, u odnosu na kontrole (tretman 0%/0%) (Slika 17A). Nakon *in vitro* stimulacije ćelija EdLČ sa DNBS-om, zabeleženo je dozno-zavisno povećanje produkcije IL-17 samo kod jedinki DA soja (Slika 18B).

Ekspresija gena za ovaj citokin nije promenjena kod jedinki DA soja, dok je kod jedinki AO soja zabeležena tendencija ( $p=0.07$ ) povećanja ekspresije gena za IL-17 nakon primene samo više doze DNCB-a, u odnosu na kontrolne jedinice (Slika 18C).



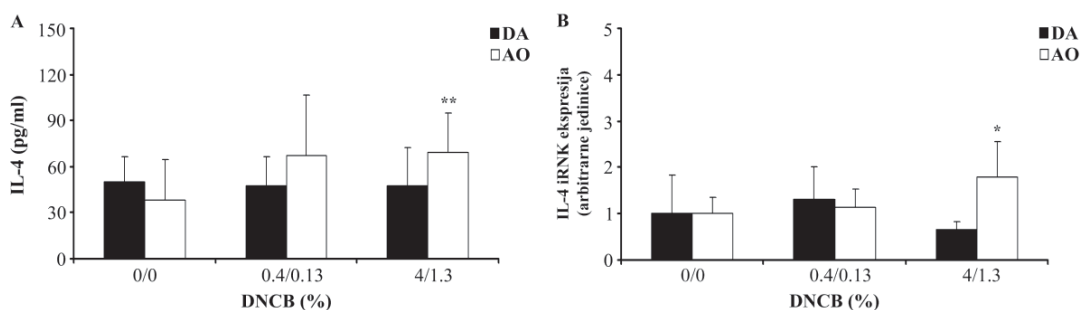
**Slika 18. Produkcija IL-17 i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti.** Spontana produkcija IL-17 (A) i specifična produkcija (B) od strane ćelija EdLČ kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNK za IL-17 određena RT-PCR metodom u ćelijama EdLČ (C). Rezultati

suprikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD, tj. kao arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na 0%/0% i # $p < 0.05$  u odnosu na 0.4%/0.13% DNCB, odgovarajućeg soja.

#### 4.3.3.5.4. Produkcija i ekspresija IL-4

S obzirom da su spontana i DNBS-stimulisana produkcija IL-4 bile ispod nivoa detekcije, produkcija ovog citokina ispitana je nakon stimulacije ćelija sa ConA. Utvrđeno je povećanje produkcije IL-4 samo kod jedinki AO soja nakon primene niže (numeričko povećanje,  $p = 0.1$ ) i više doze DNCB-a (tretman 0.4%/0.13% i 4%/1.3% redom), u odnosu na kontrole (0%/0%) (Slika 19A).

Ekspresija gena za IL-4 povećana je samo kod jedinki AO soja nakon senzibilizacije i elicitanje samo sa višom dozom DNCB-a, u odnosu na kontrole (Slika 19B).

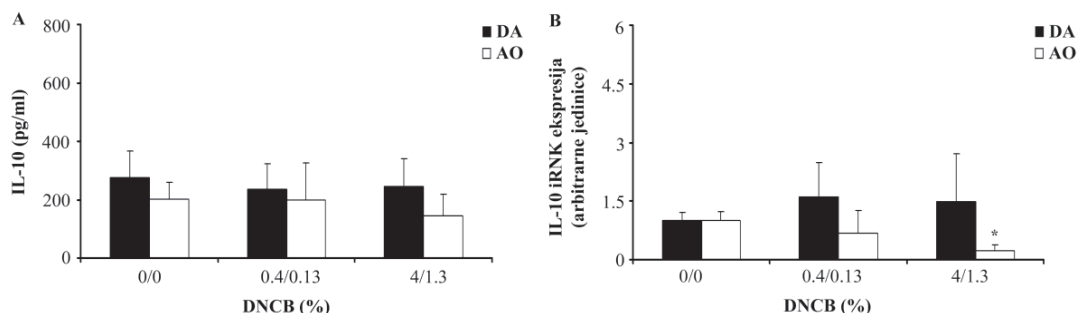


**Slika 19. Produkcija IL-4 i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora 24 časa nakon elicitanje reakcije kontaktne preosetljivosti.** Produkcija IL-4 nakon *in vitro* stimulacije ćelija EdLČ sa ConA (1  $\mu$ g/ml kulture) (A) kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNA za IL-4 određena RT-PCR metodom u ćelijama EdLČ (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  SD, tj. kao srednja arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  u odnosu na 0%/0% DNCB odgovarajućeg soja.

#### 4.3.3.5.5. Produkcija i ekspresija IL-10

Spontana produkcija IL-10 nije se promenila nakon elicitacije senzibilisanih jedinki oba soja u odnosu na kontrole (Slika 20A). Oko 50% jedinki oba soja, u svim eksperimentalnim grupama, odgovorilo je na *in vitro* stimulaciju ćelija sa DNBS-om (96±61, 45±27 i 55±50 za 0/0%, 0.4/0.13% i 4/1.3% redom, kod DA soja, i 56±43, 73±64 i 29±23 za 0/0%, 0.4/0.13% i 4/1.3% redom, kod AO soja, izraženo u pg/ml).

Ekspresija gena za IL-10 je nepromenjena kod DA soja, dok je kod AO soja zabeleženo smanjenje ekspresije nakon primene samo više doze DNCB-a, u odnosu na kontrole (Slika 20B).



**Slika 20. Produkcija IL-10 i ekspresija gena za ovaj citokin od strane ćelija drenirajućeg limfnog čvora 24 časa nakon elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti.** Spontana produkcija IL-10 (A) od strane ćelija EdLČ kod jedinki DA i AO soja. Količina iRNA za IL-10 određivana RT-PCR metodom u ćelijama EdLČ (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost produkcije iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± SD, tj. kao arbitrarne vrednosti ekspresije gena iz dva eksperimenta ± SD. Statistički značajne razlike \* $p < 0.05$  u odnosu na 0%/0% DNCB odgovarajućeg soja.

#### 4.3.3.6. Zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u fazi elicitanije

Kod miševa je pokazano da CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelije, prirodne regulatorne T ćelije (Treg), kontrolišu intenzitet reakcije KP nakon elicitanije senzibilisanih jedinki (Dubois i drugi, 2003). Kako ne postoje podaci o ulozi ovih ćelija u reakciji KP kod pacova, a s obzirom na zabeležene razlike u intenzitetu reakcije KP između jedinki DA i AO soja, ispitana je zastupljenost ćelija ovih fenotipskih karakteristika u EdLČ ova dva soja. Kod jedinki DA soja zabeležen je nepromenjen broj (procentualni i ukupni) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u EdLČ nakon nanošenja DNCB-a, u odnosu na kontrolne jedinke. Kod AO soja procentualna zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> povećana je nakon primene i niže i više doze DNCB-a (statistički značajno povećanje pri nižoj dozi i tendencija povećanja pri višoj dozi, p=0.086), dok je povećanje ukupnog broja CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija zabeleženo nakon primene samo više DNCB doze, u odnosu na kontrole (Tabela 6).

Ekspresija gena za TGF-β, anti-inflamatorni citokin značajan za imunosupresivnu aktivnost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T ćelija (Josefowicz i drugi, 2012), nije promenjena nakon elicitanije reakcije KP kod senzibilisanih jedinki DA soja (0.9±0.7 i 1.2±0.8 za tretman 0.4%/0.13% i 4%/1.3% redom), kao ni AO soja (0.7±0.4 i 1.1±0.4 za tretman 0.4%/0.13% i 4%/1.3% redom) u odnosu na odgovarajuće kontrole (1.0±0.3 kod DA i 1.0±0.4 kod AO).

**Tabela 6. Zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u drenirajućem limfnom čvoru u fazi elicitanije reakcije kontaktne preosetljivosti**

Doza DNCB-a (%)	DA		AO	
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> ćelije		CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> ćelije	
	%	x10 <sup>3</sup>	%	x10 <sup>3</sup>
0/0	2.0±0.8	409.3±117.5	0.7±0.1	153.6±41.4
0.4/0.13	1.8±1.3	390.0±179.6	1.3±0.9*	239.2±195.7
4/1.3	1.4±0.5	553.6±323.9	1.4±1.0	353.5±227.5*

Statistički značajne razlike \*p<0.05 u odnosu na 0%/0% DNCB odgovarajućeg soja.

## **5. Diskusija**

U radu su ispitani mehanizmi reakcije KP na DNCB, koji je jedan od najčešće korišćenih haptena, kod pacova. Karakteristike lokalnog imunskog odgovora na DNCB ispitane su u fazi senzibilizacije i elicitacije, korišćenjem dva soja pacova, DA i AO, za koje je prethodno pokazano da se razlikuju u osetljivosti/otpornosti na razvoj pojedinih autoimunskih/zapaljenskih bolesti kao što su eksperimentalni alergijski encefalomijelitis (Mostarica Stojkovic i drugi, 1982; Dimitrijevic i drugi, 2000), eksperimentalni autoimunski uveitis (Lalic i drugi, 1983), diabetes indukovani višestrukim malim dozama streptozotocina (Pravica i drugi, 1993), artritis (Dimitrijevic i drugi, 2001), ali i u imunskom odgovoru na infekciju parazitima kao što je *Trichinella spiralis* (Vasilev i drugi, 2009). U fazi senzibilizacije, ispitana je dinamika promena u aktivnosti ćelija limfnih čvorova koji dreniraju dorzalnu regiju kože (skapularni i aksilarni čvorovi), prvog, trećeg i petog dana nakon nanošenja haptena. U fazi elicitacije, ispitane su osnovne karakteristike otoka uha, kao *in vivo* mere ekspresije KP (promena debljine uha, histološke promene i infiltracija mononuklearnih ćelija i mast ćelija), produkcija medijatora inflamacije u kondicioniranom medijumu organokulture uha, kao i aktivnost ćelija limfnih čvorova koji dreniraju region uha (aurikularni čvorovi), 24 časa nakon ponovnog nanošenja haptena u ovoj fazi reakcije. Pored osnovnih karakteristika imunskog odgovora u drenirajućim limfnim čvorovima (dLČ) (celularnost i zastupljenost osnovnih subpopulacija T ćelija, i proliferativna aktivnost ćelija), ispitana je produkcija citokina i ekspresija gena za IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-4 kao glavnih citokina Th1/tip1, Th17/tip17 i Th2/tip2 ćelija, redom, kao i anti-inflamatornog citokina IL-10.

Iako vrsta koja se već dugo koristi u toksikološkim ispitivanjima, zbog svoje veličine i mogućnosti upotrebe različitih organa za analizu, tek upotreba pacova kao životinjskog modela u imunotoksikološkim ispitivanjima unapredila je znanje o imunskom sistemu kod ove vrste. Danas je pacov vrsta od izbora u nekliničkim imunotoksikološkim ispitivanjima (Descotes 2004). Jedan od testova imunološke funkcije u imunotoksikološkim ispitivanjima kod pacova je reakcija KP, kojom se ispituje funkcionalnost ćelijske imunosti. Reakcija KP kod pacova korišćena je za ispitivanje efekta morfina (Nelson i drugi, 1999) i cis-urokanične kiseline na *in vivo* ćelijsku imunost, kao i efekta fotoforeze na ćelijski posredovanu imunost u koži (Van Iperen i drugi, 1993). Reakcija KP je najviše ispitivana na mišjem modelu, dajući

najveći broj podataka o mehanizmima kontaktnog dermatitisa, dok većina parametara aferentne i eferentne faze ove reakcije kod pacova nisu dovoljno ispitani.

Kako je otok jedno od obeležja AKD, promena debljine uha u reakciji KP predstavlja *in vivo* test ekspresije ove reakcije. Ekspresija reakcije KP je praćena 24 časa nakon elicitanje, s obzirom da je kod miševa pokazano da se u ovom terminu postiže maksimum reakcije preosetljivosti (praćeno pomoću otoka uha i histopatološke analize tkiva uha) (Cho i Hough, 1986). Povećanje otoka uha kod DA i AO jedinki, zabeleženo 24 časa nakon primene samo više doze haptena, praćeno je *ex vivo* pokazateljima zapaljenske reakcije: patohistološkim promenama na preseku uha i povećanjem gustine mononuklearnog infiltrata u dermu. Edem epiderma (spongioza), kao i edem derma, vazodilatacija u dermu, i egzocitoza limfocita u epidermu, zabeleženi kod jedinki DA i AO soja nakon primene više doze DNCB-a, slični su promenama zabeleženim u koži pacijenata obolelih od AKD (Streit, 2001). Takođe, kod miševa je pokazano da su edem epiderma, povećanje broja slojeva epidermih ćelija i egzocitoza limfocita u epiderm histološke promene specifične za reakciju KP (Cho i Hough, 1986). Jedna od najranije prepoznatih karakteristika AKD je povećanje gustine dermalnog infiltrata ćelija u koži nakon nanošenja haptena (Roupe i Ridell, 1979), koga čine T ćelije, makrofagi, Langerhansove ćelije i neutrofili (Avnstrop i drugi, 1987). U vezi sa tim, prisustvo neutrofila u dermu i nivo aktivnosti MPO (hem enzima, prisutnog u primarnim granulama neutrofila, odgovornog za antimikrobno dejstvo aktivisanih neutrofila) u ćelijama koje su migrirale iz kože u toku 48-časovne organokulture, najizraženiji su kod DA pacova tretiranih višom dozom DNCB-a (tretman 4%/1.3%), kod kojih je zabeležen najveći otok uha zajedno sa najvećom gustinom mononuklearnog infiltrata (u odnosu na jedinke DA soja tretirane nižom dozom DNCB-a, ali i u odnosu na jedinke AO soja tretirane višom dozom DNCB-a). Ovi rezultati su u skladu sa podacima dobijenim na miševima, koji su pokazali da je rano nakon elicitanje neophodna infiltracija neutrofila u kožu, koja direktno utiče na infiltraciju efektorskih T ćelija, i intenzitet reakcije KP (Engeman i drugi, 2004). Takođe, histološka slika AKD kod ljudi može pokazati egzocitozu neutrofila sa formiranjem pustula, zajedno sa neutrofilnom spongiozom (Weedon, 2002), ukazujući na značaj neutrofila u ekspresiji reakcije kontaktne preosetljivosti. Generalno, sve ispitivane karakteristike otoka uha zabeležene nakon primene više doze DNCB-a izraženije su kod DA soja u odnosu na

AO soj, što je u skladu sa radovima koji su pokazali da se ova dva soja razlikuju u osetljivosti na razvoj i drugih zapaljenskih bolesti (Mostarica-Stojkovic i drugi, 1982; Dimitrijevic i drugi, 2001; Lalic i drugi, 1983; Pravica i drugi, 1993). Odsustvo statistički značajnog povećanja otoka uha kod životinja tretiranih nižom DNCB dozom (tretman 0.4%/0.13%), kod oba soja, praćeno je manje izraženim histološki evidentnim promenama u uhu životinja tretiranih ovom dozom DNCB-a, kao i nepromenjenom gustinom mononuklearnog infiltrata u odnosu na kontrole (tretman 0%/0%). U osnovi ovih rezultata može biti slabiji iritantni efekat niže doze DNCB-a (0.13%) primenjene u elicitaciji. Nakon topikalnog nanošenja, haptenu obezbeđuje signal specifičan za antigen ali i nespecifičan proinflamatorni signal, oba neophodna za optimalnu elicitaciju reakcije KP (McFadden i Basketter, 2000). McLelland i drugi su pokazali da primena iritanasa na mestu nanošenja nikel-sulfata kod senzibilisane osobe, povećava intenzitet zapaljenske reakcije u AKD, kao i da suboptimalna doza haptena, nedovoljna da izazove odgovor samostalno, izaziva reakciju nakon istovremenog nanošenja iritanta (McLelland i drugi, 1990). Slični rezultati dobijeni su i kod miševa, kod kojih je sugerisano da zapravo nespecifičan proinflamatorni kapacitet haptena određuje dozno-zavisnost u elicitaciji reakcije KP kod senzibilisanih životinja (Grabbe i drugi, 1996).

Reakcija KP započinje sa fazom senzibilizacije i zavisi od nje, što pokazuje odsustvo ili blago povećanje otoka uha nakon nanošenja haptena kod nesenzibilisanih pacova oba soja, značajno niže u odnosu na životinje koje su prethodno senzibilisane. Uticaj doze senzibilizacije na ekspresiju reakcije KP pokazan je kod DA pacova kod kojih se nakon primene slabo iritantne doze elicitacije (0.13%), intenzitet reakcije povećao sa povećanjem doze senzibilizacije. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima dozno-zavisnog odgovora kod ljudi (Friedmann, 2007) i miševa (Scott i drugi, 2002), u kojima je pokazano da nakon elicitacije reakcije konstantnom dozom DNCB-a, otok kože raste sa povećanjem doze senzibilizacije. Iako su ovi rezultati jasno pokazali doprinos doze senzibilizacije intenzitetu reakcije KP, mehanizmi dozno-zavisnog odgovora u fazi senzibilizacije, i u reakciji KP uopšte, nisu dovoljno ispitani.

Razvoj testa lokalnog limfnog čvora (LLNA, eng. Local Lymph Node Assay) kod pacova ukazao je na ovu vrstu kao dobar eksperimentalni model za ispitivanje faze senzibilizacije (Arts i drugi, 1996). Ispitivanje dinamike promena u dLČ u toku faze



senzibilizacije kod DA i AO pacova, prvog, trećeg i petog dana nakon nanošenja haptena, pokazalo je dozno-zavisno povećanje osnovnih parametara aktivnosti ćelija dLČ (broj ćelija i proliferacija) kod oba soja (ali značajno više vrednosti kod senzibilisanih DA jedinki). Slično ovim rezultatima, pomoću LLNA kod miševa (van Och i drugi, 2000; Scot i drugi, 2002) i pacova (Arts i drugi, 1996), pokazano je da broj ćelija dLČ i njihova *ex vivo* proliferativna aktivnost, koji su imunološki pokazatelji senzibilizujućeg potencijala haptena, rastu sa porastom doze DNCB-a primenjene u senzibilizaciji. Iako je zapaženo dozno-zavisno povećanje broja ćelija u dLČ trećeg dana senzibilizacije kod jedinki oba soja, dinamika promena celularnosti se razlikuje između DA i AO pacova (kod DA soja celularnost raste već prvog dana senzibilizacije (pri višoj dozi), i održava se visokom i petog dana, za razliku od jedinki AO soja kod kojih je celularnost u ovim terminima nepromenjena, u odnosu na kontrole). Do povećanja broja ćelija u dLČ može doći usled povećane proliferacije T ćelija i/ili migracije ćelija u čvor. U vezi sa tim, senzibilizacija pacova oba soja dovela je do dozno-zavisnog povećanja *ex vivo* proliferativne aktivnosti ćelija dLČ, sa sličnom dinamikom promena kod dva soja pacova. Visoka korelacija utvrđena između proliferacije i broja ćelija dLČ prvog ( $R=0.80$ ,  $p=0.01$ ,  $Y=9.898+0.0092*X$ ) i trećeg dana ( $R=0.81$ ,  $p=0.0025$ ,  $Y=16.686+0.00024*X$ ) senzibilizacije samo kod jedinki DA soja, ukazuje na doprinos proliferativne aktivnosti povećanju celularnosti dLČ u toku faze senzibilizacije kod ovog soja, ali posredno ukazuje i na doprinos migracije ćelija, posebno kod jedinki AO soja. Ćelije koje mogu migrirati u dLČ u toku senzibilizacije su dendritične ćelije, mast ćelije i makrofagi iz kože (Macatonia i drugi, 1986; Wang i drugi, 1998; Kripke i drugi, 1990). Za dozno-zavisno povećanje proliferativne aktivnosti ćelija dLČ kod jedinki oba soja mogu biti odgovorne DC, s obzirom da su naši preliminarni podaci pokazali povećanje broja ćelija dendritične morfologije, zavisno od primenjene doze DNCB-a, u sveže izolovanim ćelijama dLČ prvog dana nakon senzibilizacije jedinki oba soja ( $0.05\pm 0.03$ ,  $0.10\pm 0.05$  i  $0.31\pm 0.9$  za doze 0%, 0.4% i 4% kod DA soja, i  $0.05\pm 0.01$ ,  $0.17\pm 0.04$  i  $0.30\pm 0.10$  za doze 0%, 0.4% i 4% kod AO soja, izraženo u  $10^6$  ćelija). U vezi sa tim, pokazano je da 24 časa nakon senzibilizacije CBA miševa sa FITC-om, broj DC i njihova funkcionalna aktivnost u dLČ značajno rastu sa porastom primenjene doze FITC-a (iako se broj ukupnih ćelija u dLČ ne menja). Ove DC, koje sa porastom doze primenjenog haptena prezentuju rastući

broj antigena na svojoj površini, izazivaju dozno-zavisno povećanje proliferativne aktivnosti ćelija LČ *in vitro* (Macatonia i drugi, 1986). Takođe, ova grupa autora je pokazala da broj i funkcionalna aktivnost DČ u dLČ dostižu svoj maksimum drugog dana senzibilizacije, nakon čega opadaju, tako da smanjen broj i funkcionalna aktivnost DČ može biti u osnovi niže proliferativne aktivnosti ćelija dLČ petog dana senzibilizacije, u odnosu na prvi i treći dan, zabeležene kod oba soja. Pored DČ, pokazano je da i makrofagi mogu stimulisati proliferaciju T ćelija dLČ nakon senzibilizacije miševa (Hope i drugi, 1994). Odsustvo promene broja ćelija dLČ uprkos značajnom povećanju proliferativne aktivnosti, kod jedinki AO soja, može biti posledica povećane apoptoze ovih ćelija, ili možda njihove emigracije iz čvorova.

Pored spontane proliferacije, ispitana je i dinamika proliferativnog odgovora ćelija dLČ na *in vitro* stimulaciju sa IL-2, s obzirom da je proliferacija T ćelija povezana i zavisi od produkcije IL-2 i njegove interakcije sa IL-2 receptorom (Smith, 1988). Naši rezultati su pokazali da je egzogeno dodati IL-2 povećao proliferaciju ćelija dLČ senzibilisanih jedinki oba soja već prvog dana, kada je zabeleženo i povećanje broja ćelija koje eksprimiraju inducibilni  $\alpha$  lanac receptora za IL-2 (CD25<sup>+</sup> ćelije) na svojoj membrani, kao i povećanje gustine ekspresije IL-2R $\alpha$  molekula, ali značajno niže kod jedinki AO u odnosu na DA soj. Dozno-zavisno povećanje proliferativnog odgovora stimulisnog sa IL-2 trećeg i petog dana senzibilizacije kod jedinki DA soja, i trećeg dana kod AO soja (mada značajno niže u odnosu na DA soj), u skladu je sa rezultatima Kimbera i drugih, koji su pokazali na miševima da proliferativni odgovor ćelija dLČ nakon *in vitro* stimulacije sa IL-2, tri dana nakon senzibilizacije, raste sa porastom primenjene doze DNCB-a, ali ne i iritanta, omogućavajući prepoznavanje antigenskih epitopa odgovornih za senzibilizujući potencijal hemikalija (Kimber i Weisenberger, 1989). S obzirom da egzogeno dodati IL-2 može da stimuliše proliferaciju efektorskih T ćelija (Montes i drugi, 2005), moguće objašnjenje dozno-zavisnog odgovora je da senzibilizacija višom dozom haptena obezbeđuje veći pul aktivisanih T ćelija iz koga se nakon elicitacije može regrutovati veći broj haptenspecifičnih T ćelija, uslovljavajući intenzivniju ekspresiju reakcije KP.

Iako povećani kod oba soja, broj i proliferativna aktivnost ćelija dLČ nakon senzibilizacije niži su kod jedinki AO soja u odnosu na DA soj, što je zabeleženo i u drugim eksperimentalnim modelima zapaljenskih bolesti ispitivanim kod ova dva soja

pacova (Miljković i drugi, 2006). U ovom radu je pokazano da ćelije dLČ jedinki AO soja pokazuju i smanjen kapacitet da odgovore na stimulaciju sa egzogeno dodatim IL-2, što može biti posledica manje zastupljenosti CD25<sup>+</sup> ćelija, i manje gustine ekspresije ovog molekula, sugerišući njihovu nižu funkcionalnu aktivnost. Rana istraživanja vršena na DA i AO pacovima pokazala su da se limfociti ova dva soja razlikuju i u sposobnosti produkcije IL-2 nakon stimulacije sa ConA: AO su slabiji producenti IL-2 za razliku od DA pacova koji produkuju više IL-2 (Mostarica-Stojkovic i drugi, 1988; Vukmanovic i drugi, 1989). Ovakvi rezultati daju mesta za pretpostavku da ćelije AO soja imaju smanjenu sposobnost da diferenciraju u efektorske CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelije. Naime, pokazano je da specifične CD8<sup>+</sup> T ćelije u odsustvu optimalne stimulacije sa IL-2 u toku primarnog imunskog odgovora, slabije proliferišu, i ne obezbeđuju adekvatan imunski odgovor u toku sekundarne aktivacije (Boyman i Sprent, 2012).

Analiza zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija, dve glavne subpopulacije T ćelija, u dLČ trećeg i petog dana senzibilizacije, pokazala je različit obrazac promena kod jedinki DA i AO soja. Naime, kod jedinki DA soja promene u odnosu ove dve ćelijske subpopulacije javljaju se petog dana senzibilizacije, i to u smeru povećanja zastupljenosti CD4<sup>+</sup> ćelija, i opadanja zastupljenosti CD8<sup>+</sup> ćelija, u odnosu na kontrole. Dominacija CD4<sup>+</sup> T ćelija u dLČ petog dana senzibilizacije pokazana je i kod miševa tretiranih sa DNFB-om, kod kojih je zabeleženo da u ovom terminu, dva puta više CD4<sup>+</sup> ćelija proliferišu u odnosu na CD8<sup>+</sup> ćelije (Larsen i drugi, 2007). Međutim, iako je relativan broj smanjen, ukupan broj CD8<sup>+</sup> ćelija, kao i CD4<sup>+</sup>, pokazuje dozno-zavisno povećanje, i trećeg i petog dana senzibilizacije DA jedinki, sugerišući značaj obe ćelijske populacije u fazi senzibilizacije KP kod ovog soja. Sa druge strane, smanjenje odnosa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ćelija kod jedinki AO soja, već trećeg dana senzibilizacije, posledica je smanjenja relativnog broja CD4<sup>+</sup> ćelija i povećanja CD8<sup>+</sup> ćelija. Snižena zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija u dLČ kod AO soja može biti posledica emigracije ovih ćelija iz čvora ili njihove povećane apoptoze. Naime, pokazano je da citotoksične CD8<sup>+</sup> T ćelije specifične za haptent TNP (trinitrofenil) mogu suprimirati aktivaciju CD4<sup>+</sup> efektorskih T ćelija *in vitro*, izazivanjem njihove apoptoze (Martin i drugi, 2004). Kako CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelije doprinose citokinskom miljeu u dLČ u fazi senzibilizacije (Dearman i drugi, 1996), bitnom za razvoj efektorskih T ćelija, različit odnos ove dve ćelijske subpopulacije kod DA i AO soja može biti u osnovi različite produkcije IFN- $\gamma$  i

IL-17 zabeležene od strane ćelija dLČ ova dva soja (diskutovano u daljem tekstu), i posledično različitog intenziteta ekspresije reakcije nakon elicitacije.

Produkcija citokina u toku kontaktne alergije se sve češće razmatra u cilju procene senzibilizujućeg potencijala hemikalija, kao dopuna klasičnom LLNA (Dearman i drugi, 2003), ali i mehanizama koji indukuju i regulišu reakciju KP. U ovom radu je prvi put pokazano da u dLČ u fazi senzibilizacije kod pacova dominira citokinski odgovor tipa 1, nezavisno od korišćenog soja. Takođe, po prvi put je pokazano učešće IL-17 u ovoj fazi reakcije kod pacova. Rezultati su u skladu sa nalazima kod miševa, koji su pokazali da senzibilizacija sa kontaktnim alergenima kao što je DNCB, izaziva selektivno citokinski odgovor tipa 1 u dLČ, koji je bitan za razvoj efektorskih ćelija i ekspresiju reakcije (Kimber i drugi, 2002), mada su pojedina istraživanja pokazala da DNCB može da stimuliše i ekspresiju citokina karakterističnih za tip 2 ćelije (Ulrich i drugi, 2001).

Rezultati koji pokazuju povećanje spontane produkcije IFN- $\gamma$  prvog i trećeg dana senzibilizacije, i specifične produkcije (nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa haptenom) trećeg i petog dana, kod oba soja pacova, uz povećanje ekspresije gena za ovaj citokin petog dana kod senzibilisanih DA jedinki, u skladu su sa podacima dobijenim na mišjem modelu KP na nitrohalobenzene kao što je DNCB, a koji su pokazali značaj produkcije IFN- $\gamma$  u reakciji kontaktne preosetljivosti na ovu klasu haptena (Ulrich i drugi, 2001; He i drugi, 2006). Naime, povećanje produkcije IFN- $\gamma$  u dLČ 24 časa nakon senzibilizacije sa DNCB-om pokazano je i kod BALB/c miševa, nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa poliklonskim T ćelijskim mitogenom (Ulrich i drugi, 2001), kao i da rana produkcija ovog citokina u čvorovima može biti značajna za polarizaciju imunskog odgovora u pravcu tipa 1. Kod jedinki DA soja i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelije, čiji ukupan broj raste u dLČ nakon senzibilizacije, mogu biti odgovorne za produkciju ovog citokina. Sa druge strane, kod AO soja povećanje ukupnog broja samo CD8<sup>+</sup> ćelija nakon senzibilizacije sugerise ovu subpopulaciju T ćelija kao glavni izvor IFN- $\gamma$ . Kod miševa je pokazano da za povećanje produkcije IFN- $\gamma$  u dLČ trećeg (Moussavi i drugi, 1998; Xu i drugi, 1996) i petog dana (Gorbachev i Fairchild, 2004) senzibilizacije sa halogenim haptanima mogu biti odgovorne i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelije. Doprinos određene populacije, međutim, može varirati, jer postoje podaci koji pokazuju da su CD8<sup>+</sup> (Xu i drugi, 1996; He i drugi, 2009) ili CD4<sup>+</sup> (Moussavi i drugi, 1998) T

ćelije glavni izvor ovog citokina u KP na DNFB i DNCB kod miševa. Pored T ćelija izvor IFN- $\gamma$  u dLČ u fazi senzibilizacije mogu biti i NK ćelije.

Povećanje spontane produkcije IL-17 trećeg dana i *ex vivo* ekspresije ovog citokina petog dana senzibilizacije kod oba soja pacova, dalje sugerije proinflamatorni karakter KP na DNCB kod pacova, i po prvi put ukazuje na učešće IL-17 u indukciji reakcije KP i kod ove vrste. Produkcija IL-17 u dLČ u fazi senzibilizacije pokazana je i u mišjem modelu KP na DNFB, od strane i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija (He i drugi, 2009). Ispitivanjem KP kod miševa sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za IL-17, sugerisana je uloga ovog citokina u aktivaciji pre svega CD4<sup>+</sup> T ćelija specifičnih za haptenu u fazi senzibilizacije, a koje su značajne za ekspresiju reakcije KP (Nakae i drugi, 2002). U skladu sa tim, dozno-zavisno povećanje produkcije IL-17 nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa DNBS-om, kod jedinki DA soja, može biti u osnovi zabeleženog uticaja doze senzibilizacije na ekspresiju reakcije KP kod ovog soja. Sa druge strane, odsustvo specifične produkcije IL-17 citokina kod AO soja može se dovesti u vezu sa nižom zastupljenošću CD4<sup>+</sup> ćelija. Odsustvo i niža specifična produkcija IL-17 i IFN- $\gamma$ , redom, u dLČ kod AO soja, može biti u osnovi slabijeg intenziteta ekspresije reakcije KP kod ovog soja, u poređenju sa DA sojem, s obzirom da su haptenu-senzibilisane T ćelije koje proizvode IFN- $\gamma$  i IL-17 neophodne za optimalnu ekspresiju reakcije nakon elicitanje (He i drugi, 2009).

Nepromenjena produkcija IL-4 (nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa ConA) u svim ispitivanim terminima nakon senzibilizacije jedinki DA i AO soja, u odnosu na kontrole, ukazuje na to da DNCB u fazi senzibilizacije ne dovodi do stimulacije Th2/tip2 imunskog odgovora u dLČ. Ovo je u skladu sa rezultatima koji su pokazali da ćelije dLČ miševa i pacova, nakon *in vitro* restimulacije sa poliklonskim mitogenom, ne proizvode IL-4 prvog, trećeg i petog dana nakon senzibilizacije sa DNCB-om (Urlich i drugi, 2001), kao ni u kasnijem terminu kod miševa (Dearman i drugi, 2002). Iako je pokazano da je u fazi senzibilizacije produkcija IL-4 u jetri, od strane iNKT ćelija, značajna za aktivaciju B1 ćelija i produkciju haptenu-specifičnih IgM antitela neophodnih za fazu elicitanje (Campos i drugi, 2006a; 2006b), naši rezultati na

pacovima, i rezultati na miševima (Gautam i drugi, 1992; Salerno i drugi, 1995) ukazuju da ovaj citokin ne utiče na senzibilizaciju T ćelija u dLČ.

Produkcija IL-10 povećana je kod senzibilisanih jedinki DA soja prvog dana (spontana i specifična produkcija) i trećeg dana (specifična produkcija) senzibilizacije, u odnosu na kontrole, mada su kod oba soja trećeg i petog dana senzibilizacije i spontana i specifična produkcija ovog citokina povećane nakon nanošenja i DNCB-a ali i samog rastvarača. IL-10 je anti-inflamatorni citokin koji ima ulogu u sprečavanju razvoja zapaljenskih i autoimunskih procesa (Hawrylowicz i O'Gara, 2005; O'Gara i drugi, 2008). Iako prvobitno identifikovan kao citokin koga proizvode Th2 ćelije (Fiorentino i drugi, 1989), kasnija istraživanja su povezala ovaj citokin sa funkcijom regulatornih T ćelija (Treg) (Moore i drugi, 2001). Pored Th2 i Treg, danas se zna da IL-10 proizvode mnoge druge ćelije adaptivne imunosti (Th1, Th17, CD8<sup>+</sup> T ćelije i B ćelije), kao i ćelije urođene imunosti, uključujući DC, makrofage, mast ćelije, NK ćelije, eozinofile i neutrofile (Saraiva i O'Gara, 2010). Produkcija ovog citokina od strane Th1 i Th17 ćelija smatra se delom negativne povratne sprege koja deluje na antigen-prezentujuće ćelije (APC), sa ciljem ograničavanja preterane aktivacije efektorskih T ćelija i razvoja imunopatološkog procesa (Saraiva i O'Gara, 2010). Povećana produkcija IL-10 kod senzibilisanih jedinki DA soja, kod kojih je generalno imunski odgovor u dLČ intenzivniji (u pogledu i proliferacije ćelija i produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17), ukazuje na ovaj citokin kao deo mehanizma kojim se kontroliše povećana T ćelijska aktivnost u dLČ izazvana haptenom. U prilog ovoj pretpostavci govori odsustvo povećane produkcije IL-10 petog dana, kada aktivnost u dLČ opada. U skladu sa ovakvim razmatranjima, kod miševa je zabeležena ekspresija i IFN- $\gamma$  i IL-10 u dLČ tri dana nakon senzibilizacije sa DNFB-om (Fujisawa i drugi, 1996), i više diferenciran (tip 1) citokinski profil u kasnijim terminima (Dearman i drugi, 2003). Produkcija IL-10 i IFN- $\gamma$  u dLČ DA soja (koji nakon elicitacije razvija intenzivnu reakciju KP), sugerise da anti-inflamatorni citokin IL-10 ne utiče na efektorsku funkciju T ćelija, što je pokazano i kod miševa inficiranih sa *Toxoplasma gondii* (Jankovic i drugi, 2007), ukazujući i na druge efekte IL-10 osim regulatornih i inhibitornih. U tom smislu, pokazano je da IL-10 *in vitro*, u prisustvu IL-2, može da stimuliše aktivnost CD8<sup>+</sup> T ćelija (Groux i drugi, 1998; Santin i drugi, 2000).

Osim merenja otoka uha i histološke analize, kao osnovnih *in vivo* i *ex vivo* parametara ekspresije reakcije KP, u ovom radu ispitani su i drugi pokazatelji ekspresije reakcije, uključujući odabrane *in vitro* parametre urođene i adaptivne imunosti. Medijatori inflamacije (NO, MPO i citokini TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, IL-4) koje oslobađaju ćelije kože nakon kontakta sa haptenom u fazi elicitanje (Hoefakker i drugi, 1992; Nakae i drugi, 2002; Kataranovski et al., 2002a, 2002b; Ferguson i drugi, 1994; Werfel i drugi, 1997) ispitani su u medijumu u kome su kultivisani eksplanati kože tretiranog uha. Kultura eksplanata kože je pogodan model za ispitivanje inflamacije u koži, i dejstva različitih fizičkih i hemijskih agenasa na kožu (Kataranovski i Karadaglić, 1999), pogotovo uzimajući u obzir da u ovom modelu odnosi između ćelijskih elemenata epiderma i derma nisu poremećeni. Korišćenje organokulture eksplanata humane kože se pokazalo korisno i u ispitivanju efekta topikalnog nanošenja kontaktnih alergena na kožu (Varani i drugi, 2007).

Statistički značajno povećanje koncentracije TNF- $\alpha$  u medijumu organokulture eksplanata kože tretirane samo višom dozom DNCB-a, kod oba soja pacova, je u skladu sa ranijim istraživanjima vršenim na AO pacovima koja su pokazala da *in vitro* produkcija TNF- $\alpha$  korelira sa *in vivo* i *ex vivo* parametrima ekspresije reakcije KP kod ove vrste (Kataranovski i drugi, 2002b). TNF- $\alpha$  je citokin značajan za migraciju leukocita na mesto zapaljenske reakcije (Petri i drugi, 2008). *In situ* imunohistohemijska analiza biopsije kože pacijenata obolelih od AKD, pokazala je povećanje broja ćelija koje proizvode TNF- $\alpha$ , pored IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$  i IL-2, u kožnim lezijama (Hoefakker i drugi, 1992). Značaj ovog citokina u elicitanji KP pokazan je i na mišjem modelu bolesti, s obzirom da lokalna primena anti-TNF- $\alpha$  antitela suprimira reakciju KP (Piguet i drugi, 1991). Kod miševa sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za TNF- $\alpha$  ili solubilni p75, TNF- $\alpha$  receptor, intenzitet reakcije KP je snižen usled inhibicije migracije LC iz kože u dLC, kao i smanjene produkcije faktora rasta za endotelne ćelije (VEGF, engl. Vascular Endothelial Growth Factor) u koži i posledično smanjene dilatacije i propustljivosti krvnih sudova i infiltracije inflamatornih ćelija na mesto elicitanje (Shibata i drugi, 2005, Wang i drugi, 1997). Pored keratinocita i LC, i mast ćelije mogu doprineti produkciji TNF- $\alpha$  u koži uha nakon elicitanje (Nakae i drugi, 2003). Generalno viša produkcija TNF- $\alpha$  izmerena kod AO u odnosu na DA soj,



u svim eksperimentalnim grupama (i kontrolnim i tretiranim DNCB-om) može biti posledica anatomskih razlika (kao što su debljina kože, veličina uha) između dva soja.

Elicitacija reakcije KP kod oba soja pacova nije dovela do promene u produkciji IL-1 $\beta$ , 24 časa nakon nanošenja svake od doza DNCB-a. Ispitivanjem dinamike promena genskog profila u koži pacova nakon elicitanje, pokazano je prisustvo rane zapaljenske reakcije (uključujući ekspresiju gena za IL-1) osam časova nakon elicitanje, koja opada nakon 24 časa (Hartmann i drugi, 2006). Slično ovim rezultatima, sugerisano je da je aktivacija inflamazoma, i posledično produkcija IL-1 $\beta$ , bitna za ranu fazu KP (5 časova nakon elicitanje) ali ne i kasnu fazu (24 časa nakon elicitanje) elicitanje reakcije KP kod miševa (Watanabe i drugi, 2007).

Povećanje nivoa NO u kondicioniranom medijumu organokulture kože uha zabeležena je kod jedinki DA soja nakon elicitanje samo sa višom dozom DNCB-a, kod kojih je zabeležen najveći intenzitet ekspresije reakcije. U koži uha Crl: CD (SD) pacova, nakon elicitanje reakcije, pokazana je povećana ekspresija gena za iNOS (Hartmann i drugi, 2006), enzima odgovornog za produkciju NO u KP (Kataranovski i drugi, 2002a; Ross i drugi, 1998), dok su nalazi kod miševa pokazali da je NO, poreklom od keratinocita i Langerhansovih ćelija, jedan od značajnih medijatora otoka uha u elicitanji reakcije KP (Ross i drugi, 1998). Na mišjem modelu KP sugerisano je da NO, produkovan od strane ćelija kože nakon aplikacije haptena, može da dovede do povećane vazodilatacije i posledično infiltracije leukocita na mesto inflamacije.

Povećan nivo aktivnosti enzima MPO od strane ćelija kože jedinki oba soja pacova nakon primene više doze DNCB-a, u odnosu na kontrole, u skladu je sa podacima dobijenim na miševima, koji su ukazali na značaj ovog enzima, primarno produkovanog od strane makrofaga i granulocita, za razvoj zapaljenske reakcije u koži u reakciji KP (He i drugi, 2009). Niži nivo aktivnosti MPO kod AO u odnosu na DA soj verovatno je posledica niže infiltracije leukocita koji su izvor ovog enzima, u kožu jedinki AO soja.

Komparativno ispitivanje KP kod Lew i BN pacova, koji su skloni Th1 tj. Th2 imunskom odgovoru, redom, pokazalo je da Lew pacovi razvijaju intenzivniji otok uha, u odnosu na BN pacove, što je sugerisalo značaj Th1 ćelija u ekspresiji reakcije KP (Peszowski i drugi, 1994). U našem radu, povećanje produkcije IFN- $\gamma$  od strane ćelija kože uha tretirane višom dozom DNCB-a kod oba soja pacova, ali značajno više kod



osetljivijeg DA soja, uz korelaciju između citokinske produkcije i otoka uha, ukazuje na značaj IFN- $\gamma$  u elicitaciji KP kod pacova.

Novija istraživanja su pokazala da infiltrirajuće T ćelije u koži u toku akutne faze AKD kod ljudi proizvode IL-17, koji zajedno sa IFN- $\gamma$  doprinosi zapaljenskoj reakciji i tkivnom oštećenju (Pennino i drugi, 2010). Povećana nivo IL-17 u kondicioniranom medijumu organokulture uha kod jedinki DA soja tretiranih višom dozom DNCB-a u elicitaciji reakcije, koja korelira sa povećanjem otoka uha, kao i povećana produkcija ovog citokina u dLČ kod DA soja, po prvi put pokazuje značaj IL-17 u ekspresiji reakcije KP i kod pacova. Kod miševa sa potpunim ili delimičnim odsustvom ekspresije gena za receptor za IL-17 i IFN- $\gamma$  pokazano je da su oba citokina, IFN- $\gamma$  i IL-17, neophodni za optimalnu reakciju, ali da joj doprinose različitim mehanizmima: IL-17 signal je neophodan za infiltraciju leukocita na mesto elicitacije, dok je IFN- $\gamma$  bitniji za stimulaciju produkcije reaktivnih vrsta kiseonika u zapaljenskom tkivu (He i drugi, 2009). U vezi sa poslednjom tvrdnjom, pokazana je korelacija između produkcije IFN- $\gamma$  i NO u kondicioniranom medijumu organokulture kože uha jedinki DA soja. Niža produkcija IFN- $\gamma$  i odsustvo produkcije IL-17 od strane ćelija kože uha kod jedinki AO soja, mogu biti posledica niže, i odsustva antigen-specifične produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17, redom, petog dana senzibilizacije, kada je i vršena elicitacija životinja.

Aplikacija DNCB-a u elicitaciji reakcije KP dovela je do značajnog povećanja produkcije IL-4 od strane ćelija kože uha, kao i ćelija drenirajućih limfnih čvorova, samo kod jedinki AO soja. Značajno povećanje produkcije IL-4 sa tendencijom povećanja produkcije IFN- $\gamma$  u kondicioniranom medijumu organokulture uha, koje je zabeleženo kod AO soja nakon elicitacije sa višom dozom DNCB-a u skladu je sa podacima koji su pokazali istovremenu produkciju ova dva citokina u koži pojedinih pacijenata sa AKD (Probst i drugi, 1995; Rowe i drugi, 1998), kao i u koži miševa nakon elicitacije KP (Asada i drugi, 1997). Kod miševa tretiranih sa TNCB-om pokazano je da ekspresija IL-4 u koži uha nakon elicitacije ima ulogu u regulaciji lokalne produkcije proinflamatornih citokina, s obzirom da primena anti-IL-4 antitela kod ovih miševa dovodi do povećanja otoka uha, koji je praćen povećanom ekspresijom IFN- $\gamma$ , IL-2, p40 IL-12 i IL-1 $\beta$  (Asada i drugi, 1997). U vezi sa tim, povećana produkcija IL-4 samo kod AO soja kod koga je zabeležen niži otok uha i niža produkcija efektorskih molekula IFN- $\gamma$  i IL-17, sugerise regulatornu ulogu IL-4 u fazi

elicitacije KP kod AO pacova. Sa druge strane, nepromenjena produkcija IL-4 kod DA soja praćena je intenzivnim otokom uha i povećanom produkcijom IFN- $\gamma$  i IL-17 od strane ćelija kože uha. Gautam i drugi su, korišćenjem C3H/HeN miševa, pokazali da intravenska primena IL-4 u vreme ili posle elicitacije životinja sa TNCB-om, značajno redukuje ekspresiju KP, tj da primena anti-IL-4 antitela povećava intenzitet reakcije, takođe sugerišući anti-inflamatorni efekat ovog citokina u eferentnoj fazi reakcije (Gautam i drugi, 1992). Regulatorna uloga IL-4 u elicitaciji KP kod miševa pokazana je i od strane drugih istraživača (Biedermann i drugi, 2001). Pored inhibitornog efekta IL-4 na aktivnost Th1/Tc1 ćelija (Asada i drugi, 1997), ovaj citokin može da smanji produkciju hemoatraktanta i ekspresiju adhezivnih molekula na površini inflamatornih mononukleara i endotelnih ćelija, i na taj način inhibira migraciju leukocita na mesto elicitacije (Gautam i drugi, 1992). Izvor IL-4 u koži mogu biti Th2 ćelije (Mosmann i drugi, 1986), ali i mast ćelije (Bradding i drugi, 1992). Suprotni rezultati drugih autora, u odnosu na naše, koji su pokazali da IL-4 ima proinflamatorni efekat značajan za ekspresiju KP uglavnom su dobijeni korišćenjem miševa sa odsustvom ekspresije gena za IL-4 (Weigmann i drugi, 1997; Traidl i drugi, 1999). Naime, niži otok uha kod ovih miševa može biti posledica povećane aktivacije kompenzatornih imunosupresivnih mehanizama, ali i nedostatka ovog citokina i u fazi senzibilizacije u kojoj je, kao što je već pomenuto, IL-4 neophodan za produkciju haptenspecifičnih IgM antitela, koji su bitni za fazu elicitacije (Campos i drugi, 2006a; 2006b).

Nepromenjena produkcija anti-inflamatornog citokina IL-10 24 časa nakon elicitacije reakcije kod jedinki oba soja, u skladu je sa istraživanjima Ferguson i drugih, koji su pokazali da produkcija IL-10 u koži raste 10-14 časova nakon elicitacije miševa sa TNCB-om, nakon čega opada dostižući kontrolnu vrednost 24 časa (Ferguson i drugi, 1994; Barreiro i drugi, 2004). Ova grupa je sugerisala da je IL-10 prirodni regulator reakcije KP u koži (Ferguson i drugi, 1994).

Mehanizmi eferentne faze reakcije KP uglavnom se ispituju na osnovu promena zabeleženih u koži nakon elicitacije reakcije kod senzibilisanih životinja. Međutim, ispitivanje akumulacije, proliferacije i aktivacije ćelija u dLČ nakon elicitacije reakcije, takođe može biti značajno za razumevanje patogeneze KP, kao i za ispitivanje potencijala hemikalije kao kontaktnog alergena (Larsen i drugi, 2007). Za povećanje celularnosti dLČ koje je zabeleženo samo kod jedinki DA soja, može biti odgovorna

povećana proliferacija ovih ćelija, povećana migracija ćelija u dLČ i/ili smanjena emigracija ćelija iz dLČ. Dozno-zavisno povećanje *ex vivo* proliferativne aktivnosti ćelija dLČ nakon elicitanje reakcije kod jedinki DA soja, u saglasnosti je sa istraživanjima koja su pokazala povećanje ekspresije pojedinih gena bitnih za aktivaciju/ proliferaciju T ćelija, u dLČ 24 časa nakon elicitanje reakcije kod senzibilisanih pacova Crl:CD (SD) soja (Hartmann i drugi, 2006). Istraživanja na miševima su pokazala da 24 časa nakon elicitanje senzibilisanih jedinki, u dLČ dolazi do povećane akumulacije i proliferacije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija, ali i B ćelija i NK ćelija (Larsen i drugi, 2007). Pored spontane proliferacije, kod jedinki DA soja zabeleženo je i dozno-zavisno povećanje proliferativnog odgovora na *in vitro* stimulaciju sa IL-2, što uz povećanje broja CD25<sup>+</sup> ćelija i gustine ekspresije IL-2R $\alpha$ , sugeriše značaj ovog citokina u elicitanji KP kod DA pacova, ali ukazuje i na povećanu funkcionalnu aktivnost ćelija dLČ, u zavisnosti od primenjene doze haptena. U prilog tome, pokazano je povećanje proliferacije ćelija dLČ nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa haptenom, samo kod jedinki DA soja tretiranih višom dozom DNCB-a. Povećanju proliferacije ćelija dLČ nakon *in vitro* stimulacije sa haptenom, može doprineti aktivacija naivnih T ćelija ali i memorijskih T ćelija, čije prisustvo je pokazano u dLČ 24 časa nakon elicitanje miševa (Larsen i sar., 2007). Pored IL-2, kod miševa je sugerisana uloga i IL-6 u proliferaciji ćelija dLČ nakon senzibilizacije, ali i značaj ovog citokina za ekspresiju reakcije KP (Hope i drugi, 1994). Iako je produkcija IL-6 zabeležena u koži nakon elicitanje reakcije (Hoefakker i drugi, 1992; Ulfgren i drugi, 2000), nema podataka o produkciji i značaju ovog citokina u dLČ u fazi elicitanje reakcije KP. U ovom radu pokazano je dozno-zavisno povećanje produkcije IL-6 u dLČ samo kod DA soja, kod koga je zabeleženo i dozno-zavisno povećanje proliferativne aktivnosti, što može sugerisati doprinos ovog citokina proliferaciji ćelija dLČ u fazi elicitanje KP kod pacova. Numeričko povećanje broja ćelija u dLČ kod jedinki AO soja tretiranih višom dozom DNCB-a, uz odsustvo promena u proliferaciji ovih ćelija, može biti posledica povećane migracije ćelija u dLČ kod ovog soja. Odsustvo proliferativne aktivnosti u dLČ nakon elicitanje reakcije kod AO soja, nije prevaziđeno ni nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa rekombinantnim IL-2, uprkos povećanju gustine ekspresije IL-2R $\alpha$  nakon elicitanje sa višom dozom DNCB-a, što sugeriše anergiju ćelija u čvorovima ovog soja. Treg ćelije, koje ekspimiraju IL-2R $\alpha$ , i koje su bitne u regulaciji reakcije KP (Ring i drugi, 2006),

moгу biti odgovorne za odsustvo proliferativne aktivnosti u dLČ kod AO soja, s obzirom da ove ćelije imaju sposobnost inhibicije aktivacije/proliferacije drugih T ćelija (Thornton i Shevach, 2000). U vezi sa tim, broj ćelija sa fenotipskim karakteristikama Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelije) povećan je u dLČ nakon elicitacije reakcije kod senzibilisanih jedinki AO soja (Tabela 5.).

Niži odnos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ćelija u dLČ nakon elicitacije posledica je povećanja relativnog (i ukupnog broja) CD8<sup>+</sup> ćelija, uz istovremeni pad relativne zastupljenosti CD4<sup>+</sup> ćelija, kod oba soja pacova. Iako je relativan broj CD4<sup>+</sup> ćelija smanjen kod jedinki oba soja, zbog povećanja celularnosti dLČ, ukupan broj ovih ćelija je nepromenjen kod DA soja a čak je povećan kod jedinki AO soja. U dLČ miševa u fazi elicitacije pokazano je da su aktivisane CD8<sup>+</sup> T ćelije brojnije od aktivisanih CD4<sup>+</sup> T ćelija, ali i da obe populacije ćelija proliferišu u dLČ nakon elicitacije (Larsen i drugi, 2007). Povećanje broja CD8<sup>+</sup> ćelija u dLČ, može se dovesti u vezu sa nalazima kod miševa i ljudi, koji su pokazala da su CD8<sup>+</sup> T ćelije, koje proizvode IFN- $\gamma$  i IL-17, glavne efektorske ćelije u toku faze elicitacije KP (Xu i drugi, 1997b; Cavani i drugi, 1998; Xu i drugi, 2006). Povećanje ukupnog broja CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u dLČ jedinki AO soja, uprkos odsustvu proliferativne aktivnosti, sugerise migraciju ovih ćelija u dLČ nakon elicitacije reakcije.

Povećanje produkcije i ekspresije IFN- $\gamma$ , uz povećanu ekspresiju gena za IL-12 i T-bet, u dLČ nakon elicitacije senzibilisanih jedinki DA soja, ukazuje na aktivaciju Th1/tip1 imunskog odgovora u ovoj fazi reakcije KP na DNCB kod pacova. Naime, u ovom radu je pokazano dozno-zavisno povećanje spontane produkcije IFN- $\gamma$ , uz povećanje specifične produkcije (nakon *in vitro* aplikacije haptena) i *ex vivo* ekspresije gena za IFN- $\gamma$  u dLČ 24 časa nakon elicitacije reakcije kod senzibilisanih DA pacova. Sa druge strane, zapažena je nepromenjena produkcija IFN- $\gamma$  kod AO soja, ali uz povećanje ekspresije gena za ovaj citokin nakon elicitacije sa samo višom dozom DNCB-a. S obzirom da IFN- $\gamma$  mogu da proizvode i CD4<sup>+</sup> Th1 i CD8<sup>+</sup> Tc1 ćelije, koje se smatraju efektorskim ćelijama u KP (Ishiyaki i drugi, 2007), dalje je ispitana ekspresija gena za IL-12 i T-bet, koji imaju značajnu ulogu u diferencijaciji i aktivaciji Th1/tip1 ćelija (Glimcher i drugi, 2004; Szabo u drugi, 2000). Povećana ekspresija gena uključenih u IFN- $\gamma$  signalni put, kao što su CCR-5, CXCL-10, Irf1, STAT-5B i STAT-1, zapažena je u dLČ 24 časa nakon elicitacije KP sa DNFB-om kod pacova Crl:CD

(SD) soja (Hartmann i sar., 2006), međutim nema podataka o aktivaciji IL-12 i T-bet-a u dLČ u eferentnoj fazi reakcije KP. Povećan nivo iRNK za p35 subjedinicu IL-12 zabeležen je kod jedinki DA soja tretiranih samo sa višom dozom DNCB-a, dok je nivo iRNK za p40, kao i za T-bet, povećan nakon primene svake od doza haptena, kod ovog soja. Riemann i drugi su pokazali da za razliku od p35 čija ekspresija je konstitutivna, ekspresija p40 raste u dLČ nakon kontakta kože sa haptenom (Riemann i drugi, 1996). Povećana ekspresija gena za T-bet i IL-12, u dLČ jedinki samo DA soja, i posledično povećana produkcija IFN- $\gamma$ , mogu biti u osnovi intenzivne ekspresije reakcije KP zabeležene kod ovog soja. Naime, transgeni miševi sa povećanom ekspresijom gena za T-bet, spontano razvijaju kožne lezije slične promenama karakterističnim za KP, a nakon elicitacije sa DNFB-om, razvijaju intenzivniji otok uha, u odnosu na "wild type" jedinke (Ishizaki i drugi, 2007). Kod ovih životinja produkcija IFN- $\gamma$  povećana je u Th1 i Tc1 ćelijama specifičnim za haptenu (Ishizaki i drugi, 2007). Takođe, neutralizacija IL-12 pre elicitacije senzibilisanih miševa smanjuje otok uha, sugerirajući značaj ovog citokina u eferentnoj fazi reakcije KP (Riemann i sar., 1996). Povećana ekspresija gena za IFN- $\gamma$  u dLČ kod jedinki AO soja, nakon elicitacije sa višom dozom DNCB-a, uz nepromenjenju ekspresiju gena za IL-12 i T-bet, sugerise angažovanje nekih drugih transkripcionih faktora, neophodnih u indukciji ekspresije IFN- $\gamma$ . U svetlu toga, treba spomenuti da su nedavna istraživanja pokazala da Runx3, transkripcioni faktor značajan za razvoj T ćelija, može direkto indukovati ekspresiju gena za IFN- $\gamma$ , nezavisno od IL-12 i T-beta-a (Yagi i drugi, 2010). Nepromenjena produkcija IFN- $\gamma$ , uprkos povećanoj ekspresiji gena za ovaj citokin, kod AO soja, može biti posledica prisustva inhibitorskih faktora u toku 72-časovne kulture ćelija, kao što je npr. IL-4, čija produkcija je povećana od strane ćelija dLČ ovog soja.

Povećana spontana produkcija IL-17 uz dozno-zavisno povećanje specifične produkcije ovog citokina (nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa haptenom) zabeležena je od strane ćelija dLČ nakon elicitacije senzibilisanih jedinki DA soja, i sugerise na diferencijaciju/aktivaciju Th17/tip17 ćelija u dLČ u ovoj fazi reakcije. U perifernoj krvi pacijenata obolelih od AKD na nikl prisutne su memorijske Th17 ćelije, koje proizvode IL-17 nakon *in vitro* stimulacije sa DC koje ekspimiraju nikl (Larsen i drugi, 2009). T ćelije koje proizvode IL-17 prisutne su i u koži pacijenata obolelih od AKD, kao i koži miševa na mestu elicitacije KP (Peiser i drugi, 2013), međutim nema podataka o

aktivaciji ovih ćelija u dLČ nakon elicitacije reakcije KP kod miševa. Povećanje produkcije IL-17 u dLČ u fazi elicitacije, zavisno od doze DNCB-a primenjene u fazi senzibilizacije (Popov i drugi, 2012), zajedno sa dozno-zavisnim povećanjem produkcije ovog citokina u dLČ u fazi senzibilizacije kod DA pacova, može biti jedan od mehanizama u osnovi efekta doze senzibilizacije na intenzitet ekspresije reakcije KP, ukazujući na značaj ovog citokina u ekspresiji KP na DNCB kod pacova. Povećana produkcija IL-17 uz nepromenjeni nivo iRNK za ovaj citokin kod DA pacova može biti posledica uticaja različitih stimulusa prisutnih u 72-časovnoj kulturi ćelija. Pored TGF- $\beta$  (čija ekspresija je nepromenjena u dLČ kod jedinki oba soja), faktor bitan za razvoj Th17 ćelija je IL-6 (McGeachy i Cua, 2008), čija produkcija je povećana od strane ćelija dLČ DA pacova nakon elicitacije KP. Sa druge strane, nepromenjena produkcija IL-17 u dLČ jedinki AO soja nakon elicitacije, u odnosu na kontrole, može biti posledica nepromenjene produkcije IL-6 kod ovog soja i samim tim odsustva diferencijacije Th17 ćelija. Generalno, odsustvo specifične produkcije IL-17 u dLČ, zajedno sa odsustvom promena u produkciji ovog citokina u koži uha AO soja, u ekspresiji reakcije KP, može se dovesti u vezu sa odsustvom specifične produkcije ovog citokina i od strane ćelija dLČ u fazi senzibilizacije, što zajedno sugerise neadekvatnu aktivaciju Th17/ tip17 imunskog odgovora u reakciji KP na DNCB kod ovog soja.

Povećana produkcija IL-4 i *ex vivo* ekspresija gena za ovaj citokin kod jedinki AO soja može biti u osnovi niže ekspresije IFN- $\gamma$ , p35, p40 i T-bet-a u dLČ, ili obrnuto, uzimajući u obzir recipročnu regulaciju glavnih citokina Th1 i Th2 ćelija (Bushel i Wood, 1999). U tom smislu gledano, odsustvo produkcije i ekspresije IL-4 kod DA soja može biti posledica inhibicije diferencijacije Th2 ćelija, usled povećane produkcije i ekspresije IFN- $\gamma$  i ekspresije IL-12 (Wurtz i drugi, 2004) u dLČ nakon elicitacije reakcije kod senzibilisanih jedinki ovog soja.

Spontana produkcija i produkcija IL-10 *in vitro* stimulisana haptenom u dLČ nepromenjena je nakon elicitacije reakcije kod oba soja, što je u skladu sa rezultatima dobijenim na miševima, koji pokazuju odsustvo produkcije IL-10 i ekspresije iRNK za ovaj citokin u dLČ 24 časa nakon elicitacije senzibilisanih jedinki sa DNCB-om (Ulrich i drugi, 2001). Međutim, ne treba zanemariti ulogu IL-10 u fazi elicitacije reakcije, s obzirom da je pokazana povećana produkcija ovog citokina u dLČ 48 i 72 časa nakon elicitacije reakcije (Ulrich i drugi, 2001), što se može povezati sa regulatornom ulogom



IL-10 u kasnijoj fazi reakcije. Niži nivo iRNK za IL-10 u dLČ kod jedinki AO soja tretiranih sa višom dozom DNCB-a, u poređenju sa kontrolama, može biti posledica povećane ekspresije gena za IL-4 (Yao i drugi, 2005), koja je zabeležena u dLČ ovih životinja.

Zastupljenost  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  (Treg) ćelija, bitnih u kontroli imunskog odgovora na patogene, aloantigene i alergene (Sakaguchi i drugi, 2006), povećana je u dLČ jedinki AO soja nakon elicitacije svakom od doza DNCB-a. Kod ljudi je pokazano da su  $CD25^+$  Treg ćelije odgovorne za održavanje imunske tolerance kod zdravih osoba koje nisu sklone razvoju alergijskog kontaktnog dermatitisa (Cavani i drugi, 2003). Naime, ova grupa autora pokazala je da  $CD4^+CD25^+$  T ćelije izolovane iz krvi zdravih osoba suprimiraju *in vitro* aktivnost T ćelija specifičnih za nikl, za razliku od istih ćelija izolovanih iz krvi pacijenata alergičnih na nikl, kod kojih je supresorska aktivnost smanjena ili odsutna (Cavani i drugi, 2003). *In vivo* tretman miševa sa anti- $CD25^+$  antitelima, u vreme senzibilizacije, vodi povećanoj aktivaciji efektorskih  $CD8^+$  T ćelija, i intenzivnijoj reakciji KP (Vocanson i drugi, 2009). Kod miševa senzibilisanih sa DNFB-om, pokazano je da Treg ćelije migriraju iz kože u dLČ nakon elicitacije (Tomura i drugi, 2010), gde mogu da inhibiraju proliferaciju efektorskih T ćelija specifičnih za haptenu, kao i njihovu produkciju IFN- $\gamma$  (Tomura i drugi, 2010; Gorbachev i Fairchild, 2004). Takođe, pokazano je da IL-4 može izazvati razvoj humanih  $CD4^+CD25^+$  Treg ćelija od naivnih  $CD4^+$  T ćelija iz periferne krvi (Skapenko i drugi, 2005). Ove Treg ćelije imaju sposobnost inhibicije proliferacije  $CD25^+$  T ćelija nezavisno od produkcije regulatornih citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ ), i njihova regulatorna aktivnost nije pod uticajem IL-2 (Skapenko i drugi, 2005). U svetlu ovih podataka, odsustvo proliferativne aktivnosti ćelija dLČ nakon elicitacije senzibilisanih jedinki AO soja, koja se ne prevazilazi dodavanjem IL-2, i nepromenjena produkcija efektorskih citokina (IFN- $\gamma$  i IL-17), može biti posledica delovanja Treg ćelija, kao i povećane produkcije IL-4 kod ovog soja. Regulacija aktivnosti/proliferacije efektorskih T ćelija od strane Treg zavisi od njihove ekspresije površinskih molekula (i samim tim kontakta sa efektorskim ćelijama) i produkcije anti-inflamatornih citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ ) (Josefowicz i drugi, 2012). Citoliza efektorskih T ćelija, putem produkcije granzima, takođe može biti mehanizam regulacije imunskog odgovora od strane Treg ćelija (Josefowicz i drugi, 2012). Nepromenjena produkcija IL-10 i ekspresija gena za TGF- $\beta$ ,

uz povećanje broja CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija u dLČ kod AO soja, sugerirše pre supresiju zavisnu od ćelijskog kontakta, uz moguću citotoksičnu aktivnost ovih ćelija. U prilog ovoj pretpostavci govore naši preliminarni podaci koji su pokazali povećanu ( $p < 0.001$ ) *ex vivo* apoptozu ćelija dLČ (određivanu citofluorimetrijskom metodom sa propidijum jodidom) kod jedinki AO soja tretiranih višom dozom DNCB-a ( $23.5\% \pm 1.4\%$ ), u odnosu na kontrolne jedinke ( $16.1\% \pm 0.6\%$ ), kod kojih je povećan i relativan i ukupan broj CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija,. Kod DA jedinki nije zabeležena promena u *ex vivo* apoptozu ćelija dLČ nakon primene više doze DNCB-a ( $13.6\% \pm 4.3\%$ ), u odnosu na kontrole ( $15.5\% \pm 4.3\%$ ). Povećana apoptoza ćelija dLČ kod AO soja može biti u osnovi generalno niže rensponsivnosti ćelija dLČ nakon elicitacije reakcije kod ovog soja. Pored CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T ćelija, pokazano je da CD8<sup>+</sup> Tc2 ćelije mogu imati regulatornu ulogu u reakciji KP, tj. da mogu posredovati tolerancu izazvanu niskom dozom haptena (Steinbrink i drugi, 1996; Seidel-Guyenot i drugi, 2006). Supresorske CD8<sup>+</sup> T ćelije ne proliferišu u odgovoru na antigen, imaju sposobnost supresije proliferativne aktivnosti CD4<sup>+</sup> T ćelija, ne produkuju IFN- $\gamma$  i IL-10, ali produkuju IL-4 koji je neophodan za njihovu supresorsku aktivnost (Salgame i drugi, 1991). Povećan broj CD8<sup>+</sup> ćelija u dLČ jedinki AO soja, uz nepromenjenu proliferaciju (*ex vivo*, i *in vitro* stimulisanu haptenom i IL-2) i produkciju efektorskih citokina, ali povećanu produkciju IL-4 nakon elicitacije reakcije, sugerirše da bi ove ćelije mogle imati pre regulatornu nego efektorsku aktivnost kod ovog soja.

Gledano u celini, senzibilizacija pacova sa DNCB-om dovela je do aktivacije Th1/tip1 i Th17/tip17 imunskog odgovora u dLČ, mada je intenzitet odgovora veći kod DA u poređenju sa AO sojem. Zabeležene međusojne razlike u ovoj fazi reakcije se delom mogu objasniti manjim brojem CD25<sup>+</sup> ćelija, i manjoj gustini ekspresije ovog molekula, kod AO soja. U fazi elicitacije, povećana ekspresija reakcije praćena je povećanom produkcijom medijatora inflamacije (TNF- $\alpha$ , NO, MPO, IFN- $\gamma$  i IL-17) na mestu elicitacije reakcije i posledično migracijom ćelija, kao i aktivacijom Th1/tip1 i Th17/tip17 imunskog odgovora u dLČ, kod DA soja. Odsustvo efektorske aktivnosti u dLČ u ovoj fazi reakcije kod AO soja, praćeno je povećanom produkcijom i ekspresijom IL-4 i povećanom zastupljenošću CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija, i ukazuje na supresiju kao mogući uzrok nižeg intenziteta ekspresije reakcije KP kod ovog soja.



Razlike u intenzitetu (faza senzibilizacije i elicitacije) i tipu (faza elicitacije) imunskog odgovora između dva soja, otvaraju dalje puteve za ispitivanja mehanizama koji su u osnovi indukcije i ekspresije, kao i regulacije reakcije KP, posebno mehanizama koji deluju na nivou kože, kao ciljnog tkiva.

## **6. Zaključci**

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Epikutano nanošenje DNCB-a kod pacova DA i AO soja dovodi do razvoja zapaljenske reakcije specifične za haptenu, sa povećanjem *in vivo/ex vivo* (otok uha/histopatološke promene u uhu) parametara reakcije kontaktne preosetljivosti kod oba soja, ali koje su izraženije kod DA u odnosu na AO soj.

**Faza senzibilizacije reakcije kontaktne preosetljivosti:**

2. U drenirajućem limfnom čvoru senzibilisanih jedinki dolazi do:
  - povećanja celularnosti i proliferativne aktivnosti ćelija kod oba soja, ali izraženije kod DA u poređenju sa AO sojem;
  - promene zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija, sa različitim obrascem promena između dva soja: povećanje odnosa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ćelija kod DA soja i sniženja ovog odnosa kod AO soja;
  - povećanja spontane produkcije i ekspresije IFN- $\gamma$  i IL-17 kod oba soja;
  - povećanja specifične produkcije (nakon *in vitro* stimulacije ćelija sa haptenom) IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-10 kod DA soja, i povećanja specifične produkcije samo IFN- $\gamma$  kod AO soja, značajno niže u odnosu na DA soj;
  - nepromenjene produkcije IL-4 kod oba soja.

**Efektorska faza reakcije kontaktne preosetljivosti:**

3. Nakon elicitacije reakcije zabeleženo je prisustvo proinflamatornog odgovora u tretiranoj koži, kao i produkcija efektorskih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17, značajnih za ekspresiju reakcije, izraženije kod jedinki DA soja u odnosu na AO soj, ali i povećanje produkcije citokina IL-4 samo kod jedinki AO soja.
4. U drenirajućem limfnom čvoru nakon elicitacije reakcije kod senzibilisanih jedinki dolazi do:

- povećanja celularnosti i proliferativne aktivnosti ćelija samo kod DA soja;
- smanjenja odnosa CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ćelija kod oba soja;
- povećanja spontane i specifične produkcije, kao i ekspresije, IFN- $\gamma$  i IL-17 samo kod DA soja, a povećanja produkcije i ekspresije IL-4 samo kod AO soja, uz nepromenjenu produkciju i ekspresiju IL-10 kod oba soja;
- povećanja zastupljenosti CD4<sup>+</sup>DC25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija samo kod AO soja.

Gledano u celosti, karakteristike reakcije kontaktne preosetljivosti kod pacova u saglasnosti su sa dosadašnjim saznanjima o ovoj reakciji koja su dobijena na mišjem modelu bolesti, i u istraživanjima kod čoveka. Na osnovu produkcije citokina karakterističnih za subpopulacije T ćelija, može se zaključiti da fazu senzibilizacije reakcije kontaktne preosetljivosti kod pacova karakteriše aktivacija Th1/tip1 i Th17/tip17 ćelija u drenirajućem limfnom čvoru, koja je intenzivnija kod jedinki DA u odnosu na AO soj. U fazi elicitanje reakcije u drenirajućem limfnom čvoru dolazi do aktivacije Th1/tip1 i Th17/tip17 ćelija samo kod jedinki DA soja, a povećane produkcije Th2/anti-inflamatornog citokina IL-4, uz povećanje broja CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ćelija, samo kod AO soja. Razlike u intenzitetu odgovora u fazi senzibilizacije i tipu odgovora u fazi elicitanje, uz razlike u produkciji medijatora inflamacije na mestu elicitanje reakcije i posledično migraciji ćelija, mogu biti u osnovi različite reaktivnosti jedinki DA i AO soja na primenu kontaktnog alergena. Ovi rezultati s toga ukazuju na genetičku varijabilnosti kao značajan endogeni faktor u reakciji KP. U svetlu toga, komparativno ispitivanje kontaktne preosetljivosti kod reaktivnijeg DA soja i manje reaktivnog AO soja, može dalje osvetliti imunske mehanizme koji su u osnovi razvoja i ekspresije, kao i regulacije ove reakcije. Ovakva saznanja mogu dati dobru osnovu za razvoj novih terapijskih modaliteta u lečenju alergijskog kontaktnog dermatitisa. Takođe, s obzirom da je pacov vrsta koja se najčešće koristi u imunotoksičnim i imunofarmakološkim istraživanjima, rezultati ove disertacije omogućavaju primenu KP na ovoj vrsti za ispitivanje imunomodulatornog potencijala hemijskih agenasa, posebno onih koji dospevaju u organizam preko kože.

## **7. Literatura**

1. Aiba S. i Tagami H. Dendritic cell activation induced by various stimuli, e.g., exposure to microorganisms, their products, cytokines and simple chemicals as well as adhesion to extracellular matrix. *Journal of Dermatological Science* 1999, 20: 1–13.
2. Aiba S., Manome H., Nakagawa S., Mollah Z. U., Mizuashi M., Ohtani T., Yoshino Y., Tagami H. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and 2, 4-dinitrochlorobenzene. *Journal of Investigative Dermatology* 2003, 120: 390-399.
3. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, 124: 783-801.
4. Albanesi C., Cavani A., Girolomoni G. Interferon- $\gamma$ -stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *Journal of Investigative Dermatology* 1998, 110: 138–142.
5. Albanesi C., Scarponi C., Cavani A., Federici M., Nasorri F., Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon- $\gamma$ - and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2000, 115: 81-87.
6. Angeli V., Faveeuw C., Roye O., Fontaine J., Teissier E., Capron A., Wolowczuk I., Capron M., Trottein F. Role of the parasite-derived prostaglandin D<sub>2</sub> in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *The Journal of Experimental Medicine* 2001, 193: 1135-1148.
7. Arts J.H., Droge S.C., Bloksma N., Kuper C.F. Local lymph node activation in rats after dermal application of the sensitizers 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *Food and Chemical Toxicology* 1996, 34: 55-62.
8. Asada H., Linton J., Katz S.I. Cytokine gene expression during the elicitation phase of contact sensitivity: regulation by endogenous IL-4. *Journal of Investigative Dermatology* 1997, 108: 406–441.

9. Askenase P.W. Yes T cells, but three different T cells (alphabeta, gammadelta and NK T cells), and also B-1 cells, mediate contact sensitivity. *Clinical and Experimental Immunology* 2001, 125: 345–350.
10. Avnstrop C., Ralfkiaer E., Jorgensen J., Wantzin G. Sequential immunophenotypic study of lymphoid infiltrate in allergic and irritant reactions. *Contact Dermatitis* 1987, 16: 239-245.
11. Balato A., Unutmaz D., Gaspari A.A. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *Journal of Investigative Dermatology* 2009, 129: 1628–1642.
12. Banerjee A., Damodaran N., Dharmalingam D.K., Raman G. Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 2004, 59: 385–394.
13. Barreiro R., Luker G., Herndon J., Ferguson T.A. Termination of antigen-specific immunity by CD95 ligand (Fas ligand) and IL-10. *The Journal of Immunology* 2004, 173: 1519-1525.
14. Benezra C. Molecular recognition in allergic contact dermatitis. The concept of double-headed haptens. *Dermatologic clinics* 1990, 8: 13-16.
15. Bennett C.L., van Rijn E., Jung S., Inaba K., Steinman R.M., Kapsenberg M.L., Clausen B.E. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *The Journal of Cell Biology* 2005, 169: 569–576.
16. Berg D.J., Leach M.W., Kiihn R., Rajewsky K., Mfiller W., Davidson N.J., Rennick D. Interleukin 10 but not Interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *The Journal of Experimental Medicine* 1995, 182: 99-108.

17. Bernard F., Morel F., Camus M., Pedretti N., Barrault C., Garnier J., Lecron J. Keratinocytes under fire of proinflammatory cytokines: Bona Fide innate immune cells involved in the physiopathology of chronic atopic dermatitis and psoriasis. *Journal of Allergy* 2012, doi: 10.1155/2012/718725.
18. Biedermann T., Kneilling M., Mailhammer R., Maier K., Sander C.A., Kollias G. Kunkel S.L., Hültner L., Röcken M. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *The Journal of Experimental Medicine* 2000, 192: 1441-1452.
19. Biedermann T., Mailhammer R., Mai A., Sander C., Ogilvie A., Brombacher F. Maier K., Levine A.D., Röcken M. Reversal of established delayed type hypersensitivity reactions following therapy with IL-4 or antigen-specific Th2 cells. *European Journal of Immunology* 2001, 31: 1582-1591.
20. Bobr A., Olvera-Gomez I., Igyarto B.Z., Haley K.M., Hogquist K.A., Kaplan D.H. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *The Journal of Immunology* 2010, 185: 4724-4728.
21. Bonneville M., Chavagnac C., Vocanson M., Rozieres A., Benetiere J., Pernet I., Denis A., Nicolas J.F., Hennino A. Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 2007, 127: 1430-1435.
22. Boyman O. i Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2012, 12: 180-190.
23. Bozeman P.M., Learn D.B., Thomas E.L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of immunological methods* 1990, 126: 125-133.



24. Bradding P., Feather I.H., Howarth P.H., Mueller R., Roberts J.A., Britten K., Bews J.P.A., Hunt T.C., Okayama Y., Heusser C.H., Bullock G.R., Church M.K., Holgate S.T. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *Journal of Experimental Medicine* 1992, 176: 1381–1386.
25. Buehler E.V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Archives of Dermatology* 1965, 91: 171-175.
26. Burke K.E. i Anandasabapathy N. Cellular immunity of the skin: Langerhans cells and dendritic cells. In: Dayan N. i Wertz P.W. (eds.), *Innate immune system of skin and oral mucosa: properties and impact in pharmaceuticals, cosmetics, and personal care products*. 2011, John Wiley & Sons, New York, pp. 195-214.
27. Bursch L.S., Wang L., Igyarto B., Kissenpfenning A., Malissen B., Kaplan D.H., Hogquist K.A. Identification of a novel population of langerin<sup>+</sup> dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2007, 204: 3147–3156.
28. Bushell A. i Wood K.J. Th1 and Th2 T cells can regulate each other (reciprocal regulation).1999.  
[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM1\\_17/S1462399499001179sup016.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM1_17/S1462399499001179sup016.htm)
29. Campos R.A., Szczepanik M., Itakura A., Akahira-Azuma M., Sidobre S., Kronenberg M., Askenase P.W. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant V $\alpha$ 14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *The Journal of Experimental Medicine* 2003, 198: 1785-1796.
30. Campos R.A., Szczepanik M., Lisbonne M., Itakura A., Leite-de-Moraes M., Askenase P.W. Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity. *The Journal of Immunology* 2006a, 177: 3686–3694.

31. Campos R.A., Szczepanik M., Itakura A., Lisbonne M., Dey N., Leite-de-Moraes M.C., Askenase P.W. Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptive contact sensitivity. *Immunology* 2006b, 117: 536–547.
32. Cavani A., Mei D., Guerra E., Corinti S., Giani M., Pirrotta L., Puddu P., Girolomoni G. Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8<sup>+</sup> and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of Investigative Dermatology* 1998, 111: 621-628.
33. Cavani A., Nasorri F., Prezzi C., Sebastiani S., Albanesi C., Girolomoni G. Human CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *Journal of Investigative Dermatology* 2000, 114: 295–302.
34. Cavani A., Albanesi C., Traidl C., Sebastiani S., Girolomoni G. Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends in Immunology* 2001, 22: 118–120.
35. Cavani A., Nasorri F., Ottaviani C., Sebastiani S., De Pita O., Girolomoni G. Human CD25 regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *The Journal of Immunology* 2003, 171: 5760–5768.
36. Cetinkale O., Senel O., Bulan R. The effect of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. *Burns* 1999, 25: 113-118.
37. Chipinda I., Hettick J.M., Siegel P. D. Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *Journal of allergy* 2011, doi:10.1155/2011/839682.
38. Cho G.Y. i Hough W. Time course of contact hypersensitivity to DNFB and histologic findings in mice. *Journal of Korean Medical Science* 1986, 1: 31-36.

39. Colantonio L., Iellem A., Sinigaglia F., D'Ambrosio D. Skin-homing CLA<sup>+</sup> T cells and regulatory CD25<sup>+</sup> T cells represent major subsets of human peripheral blood memory T cells migrating in response to CCL1/I-309. *European Journal of Immunology* 2002, 32: 3506–3514.
40. Corsini E. i Galli C.L. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology* 2000, 142: 203–211.
41. Cumberbatch M., Scott R.C., Basketter D.A., Scholes E.W., Hilton J., Dearman R.J., Kimber I. Influence of sodium lauryl sulphate on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced lymph node activation. *Toxicology* 1993, 77: 181-191.
42. Cumberbatch, M. i Kimber, I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology* 1995, 84: 31.
43. Cumberbatch M., Dearman R.J., Kimber I. Langerhans cell migration in mice requires intact type I Interleukin 1 receptor (IL-1RI) function. *Archives of Dermatological Research* 1999, 291: 357–361.
44. Cumberbatch M., Dearman R.J., Griffiths C.E.M., Kimber I. Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens. *Apmis* 2003, 111: 797–804.
45. Dearman R.J., Moussavi A., Kemeny D.M., Kimber I. Contribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets to the cytokine secretion patterns induced in mice during sensitization to contact and respiratory chemical allergens. *Immunology* 1996, 89: 502-510.
46. Dearman R.J. i Kimber I. Role of CD4<sup>+</sup> T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 2000, 101: 442–451.
47. Dearman R.J., Warbrick E.V., Skinner R., Kimber I. Cytokine fingerprinting of chemical allergens: species comparisons and statistical analysis. *Food and Chemical Toxicology* 2002, 40: 1881-1892.

48. Dearman R.J., Betts C.J., Humphreys N., Flanagan B.F., Gilmour N.J., Basketter D.A., Kimber I. Chemical allergy: considerations for the practical application of cytokine profiling. *Toxicological Sciences* 2003, 71: 137-145.
49. Dearman R.J., Humphreys N., Skinner R.A., Kimber I. Allergen-induced cytokine phenotypes in mice: role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations. *Clinical and Experimental Allergy* 2005, 35: 498-505.
50. Descotes J. Principles and Methods of Immunotoxicology. 2004, Elsevier.
51. Dhabhar F.S. i McEwen B.S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96: 1059-1064.
52. Dilulio N.A., Engeman T., Armstrong D., Tannenbaum C., Hamilton T.A., Fairchild R.L. G $\alpha$ -mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity. *European Journal of Immunology* 1999, 29: 3485-3495.
53. Dimitrijević M., Laban O., Stanojević S., Radulović J. Induction and reinduction of experimental allergic encephalomyelitis in DA rats: the effect of age and encephalitogen. *Acta Veterinaria* 2000, 50: 289–296.
54. Dimitrijević M., Laban O., Đurić V., Stanojević S., Miletić T., Kovačević-Jovanović V., Todorović Č., Radulović J. Behavior and severity of adjuvant arthritis in four rat strains. *Brain, Behavior and Immunity* 2001, 15: 255–265.
55. Ding L. i Shevach E.M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *The Journal of Immunology* 1992, 148: 3133-3139.
56. Divković M., Pease C.K., Gerberick G.F., Basketter D.A. Hapten-protein binding: from theory to practical application in the *in vitro* prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* 2005, 53: 189-200.

57. Dubois B., Chapat L., Goubier A., Papiernik M., Nicolas J.F., Kaiserlian D. Innate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8<sup>+</sup> T cells mediating skin inflammation. *Blood* 2003, 102: 3295–3301.
58. Duprat P. Cutaneous Sensitization, Experimental, Mouse, Hamster, Rat. In: Jones T.C.J., Mohr U., Hunt R.D. (eds.), *Integument and Mammary Glands*. 1989, Springer Berlin Heidelberg, pp. 139-145.
59. Dvorak A.M., Mihm Jr M.C., Dvorak H.F. Morphology of delayed-type hypersensitivity reactions in man. II. Ultrastructural alterations affecting the microvasculature and the tissue mast cells. *Laboratory Investigation* 1976, 34: 179-191.
60. Edelson B.T., Wumesh K.C., Juang R., Kohyama M., Benoit L.A., Klekotka P.A., Moon C., Albring J.C., Ise W., Michael D.G., Bhattacharya D., Stappenbeck T.S., Holtzman M.J., Sung S.S.J., Murphy T.L., Hildner K., Murphy K.M. Peripheral CD103<sup>+</sup> dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2010, 207: 823-836
61. Engeman T., Gorbachev A.V., Kish D.D., Fairchild R.L. The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *Journal of Leukocyte Biology* 2004, 76: 941–949.
62. Enk A.H. i Katz S.I. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *The Journal of Immunology* 1992, 149: 92-95.
63. Enk A.H., Angeloni V.L., Udey M.C., Katz S.I. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 $\beta$  in the initiation of primary immune responses in skin. *The Journal of Immunology* 1993a, 150: 3698-3704.
64. Enk A.H., Angeloni V.L., Udey M., Katz S.I. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *The Journal of Immunology* 1993b, 151: 2390-2398.

65. Esser P.R., Wölfle U., Dürr C., von Loewenich F.D., Schempp C.D., Freudenberg M.A., Jakob T., Martin S.F. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One* 2012, 7: e41340.
66. Ferguson T.A., Dube P., Griffith T.S. Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *The Journal of Experimental Medicine* 1994, 179: 1597–1604.
67. Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine* 1989, 170: 2081-2095.
68. Ford H., Watkins S., Reblock K., Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery* 1997, 32: 275-282.
69. Fowler J.F. i Fisher A. Predictive testing for human contact dermatitis. In: Fowler J.F. i Fisher A. (eds.), *Fisher's contact dermatitis*. 2008, BC Decker Inc., Hamilton, pp. 30-34.
70. Friedmann P.S. The relationships between exposure dose and response in induction and elicitation of contact hypersensitivity in humans. *British Journal of Dermatology* 2007, 157: 1093-1102.
71. Fujisawa H., Kondo S., Wang B., Shivji G. M., Sauder D.N. The role of CD4 molecules in the induction phase of contact hypersensitivity cytokine profiles in the skin and lymph nodes. *Immunology* 1996, 89: 250-255.
72. Fukunaga A., Khaskhely N.M., Sreevidya C.S., Byrne S.N., Ullrich S.E. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *The Journal of Immunology* 2008, 180: 3057–3064.
73. Gad S.C. The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s. *Toxicology* 1994, 93: 33-46.
74. Galli S.J. i Hammel I. Unequivocal delayed hypersensitivity in mast cell-deficient and beige mice. *Science* 1984, 226: 710–713.

75. Gallucci S. i Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* 2001, 13: 114–119.
76. Gautam S.C., Chikkala N.F., Hamilton T.A. Negative regulation of contact sensitivity to trinitrochlorobenzene. *The Journal of Immunology* 1992, 148: 1411-1415.
77. Gautam S., Battisto J., Major J.A., Armstrong D., Stoler M., Hamilton T.A. Chemokine expression in trinitrochlorobenzene-mediated contact hypersensitivity. *Journal of leukocyte biology* 1994, 55: 452-460.
78. Ghoreishi M., Bach P., Obst J., Komba M., Fleet J.C., Dutz J.P. Expansion of antigen-specific regulatory T cells with the topical vitamin D analog calcipotriol. *The Journal of Immunology* 2009, 182: 6071–6078.
79. Girardi M., Lewis J., Glusac E., Filler R.B., Geng L., Hayday A.C., Tigelaar R.E. Resident skin-specific T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 2002, 195: 855–867.
80. Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by  $\gamma\delta$  T cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2006, 126: 25–31.
81. Glimcher L.H., Townsend M.J., Sullivan B.M., Lord G.M. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature Reviews Immunology* 2004, 4: 900–911.
82. Gober M.D. i Gaspari A.A. Allergic contact dermatitis. *Current Directions in Autoimmunity* 2008, 10: 1–26.
83. Gocinski B.L. i Tigelaar R.E. Roles of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in murine contact sensitivity revealed by *in vivo* monoclonal antibody depletion. *The Journal of Immunology* 1990, 144: 4121-4128.

84. Goebeler M., Trautmann A., Voss A., Bröcker E.B., Toksoy A., Gillitzer R. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *The American Journal of Pathology* 2001, 158: 431-440.
85. Gorbachev A.V. i Fairchild R.L. Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity. *Critical Reviews in Immunology* 2001, 21.
86. Gorbachev A.V., Heeger P.S., Fairchild R.L. CD4 and CD8 T cell priming for contact hypersensitivity occurs independently of CD40-CD154 interactions. *The Journal of Immunology* 2001a, 166: 2323-2332.
87. Gorbachev A.V., Dilulio N.A., Fairchild R.F. IL-12 Augments CD8<sup>+</sup> T cell development for contact hypersensitivity responses and circumvents anti-CD154 antibody-mediated inhibition. *The Journal of Immunology* 2001b, 167: 156-162.
88. Gorbachev A.V. i Fairchild R.L. CD4 T cells regulate CD8 T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *The Journal of Immunology* 2004, 172: 2286–2295.
89. Gorbachev A.V. i Fairchild R.L. Activated NKT cells increase dendritic cell migration and enhance CD8<sup>+</sup> T cell responses in the skin. *European Journal of Immunology* 2006, 36: 2494–2503.
90. Grabbe S., Steinbrink K., Steinert M., Luger T.A., Schwarz T. Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity. *The Journal of Immunology* 1995, 155: 4207–4217.
91. Grabbe S., Steinert M., Mahnke K., Schwartz A., Luger T.A., Schwarz T. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation* 1996, 98: 1158–1164.



92. Griess J.P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH: Wesely und Benedikt "Über einige Azoverbindungen." *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1879, 12: 426 – 428.
93. Griffiths C.E.M., Cumberbatch M., Tucker S.C., Dearman R.J., Andrew S., Headon D.R., Kimber I. Exogenous topical lactoferrin inhibits allergen-induced Langerhans cell migration and cutaneous inflammation in humans. *British Journal of Dermatology* 2001, 144: 715-725.
94. Grimaldeston M.A., Nakae S., Kalesnikoff J., Tsai M., Galli S.J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nature Immunology* 2007, 8: 1095–1104.
95. Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., Roncarolo M.G. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997, 389: 737-742.
96. Guan H., Zu G., Slater M., Elmetts C., Xu H. Gamma delta T cells regulate the development of hapten-specific CD8<sup>+</sup> effector T cells in contact hypersensitivity responses. *Journal of Investigative Dermatology* 2002, 119: 137-142.
97. Haley P.J. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 2003, 188: 49-71.
98. Hanneman K.K., Scull H.M., Cooper K.D., Baron E.D. Effect of topical vitamin D analogue on in vivo contact sensitization. *Archives of Dermatology* 2006, 142: 1332–1334.
99. Hartmann B., Staedler F., Hartmann N., Meingassner J., Firat H. Gene expression profiling of skin and draining lymph nodes of rats affected with cutaneous contact hypersensitivity. *Inflammation Research* 2006, 55: 322-334.
100. Hawrylowicz C.M. i O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 2005, 5: 271–283.

101. He D., Wu L., Kim H.K., Li H., Elmets C.A., Xu H. CD8<sup>+</sup> IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *The Journal of Immunology* 2006, 177: 6852–6858.
102. He D., Wu L., Kim H.K., Li H., Elmets C.A., Xu H. IL-17 and IFN- $\gamma$  mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *The Journal of Immunology* 2009, 183: 1463-1470.
103. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993, 11: 1026-1030.
104. Hoefakker S., van't Erve E.H.M., Boersma W.J.A., Notten W.R.F., van Joost Th., Claassen E. Enhanced IL-1 $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production in allergic contact dermatitis in human skin: an *in situ* immunohistochemical study. In: Romagnani S., Mosmann T.R., Abbas A.K. (eds.), *New advances on cytokine*. 1992, Serona Symposia Publications, Raven Press, pp. 334-340.
105. Honda T., Egawa G., Grabbe S., Kabashima K. (2012). Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 2013, 133: 303-315.
106. Hope J.C., Dearman R.J., Debicki R.J., Kimber I., Hopkins S.J. Interleukin-6 production by draining lymph node cells following primary contact sensitization: relationship to the proliferative response. *International Archives of Allergy and Immunology* 1994, 103: 378-383.
107. Hope J.C., Campbell F., Hopkins S.J. Deficiency of IL-2 or IL-6 reduces lymphocyte proliferation, but only IL-6 deficiency decreases the contact hypersensitivity response. *European Journal of Immunology* 2000, 30: 97–203.

108. Igyarto B.Z., Jenison M., Dudda J.C., Roers A., Müller W., Koni P.A., Campbell D.J., Shlomchik M.J., Kaplan D.H. Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and Langerhans cell-derived IL-10. *The Journal of Immunology* 2009, 183: 5085–5093.
109. Ishizaki K., Yamada A., Yoh K., Nakano T., Shimohata H., Maeda A., Fujioka Y., Morito N., Kawachi Y., Shibuya K., Otsuka F., Shibuya A., Takahashi S. Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *The Journal of Immunology* 2007, 178: 605-612.
110. Itano A.A., McSorley S.J., Reinhardt R.L., Ehst B.D., Ingulli E., Rudensky A.Y., Jenkins M.K. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 2003, 19: 47–57.
111. Jadassohn J. Zur Kenntnis der medikamentösen Dermatosen. In: Verhandlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 1895, Fünfter Congress, Graz, pp. 103-129.
112. Janković D., Kullberg M.C., Feng C.G., Goldszmid R.S., Collazo C.M., Wilson M., Wynn T.A., Kamanaka M., Flavell R.A., Sher A. Conventional T-bet<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Th1 cells are the major source of host protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of Experimental Medicine* 2007, 204: 273–283.
113. Jawdat D.M., Albert E.J., Rowden G., Haidl I.D., Marshall J.S. IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *The Journal of Immunology* 2004, 173: 5275–5282.
114. Jörundsson E., Press C.M., Ulvund M., Landsverk, T. Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the elicitation phase of dinitrochlorobenzene-induced contact hypersensitivity in lambs. *Veterinary Pathology Online* 1999, 36: 42-50.
115. Josefowicz S.Z., Lu L.F., Rudensky A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology* 2012, 30: 531-564.

116. Kalish R.S. i Johnson K.L. Enrichment and function of urushiol (poison ivy)-specific T lymphocytes in lesions of allergic contact dermatitis to urushiol. *The Journal of Immunology* 1990, 145: 3706-3713.
117. Kalish R.S., Wood J.A., LaPorte A. Processing of urushiol (poison ivy) hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 1994, 93: 2039.
118. Kaplan D.H., Jenison M.C., Saeland S., Shlomchik W.D., Shlomchik M. J. Epidermal Langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 2005, 23: 611–620.
119. Kaplan D.H., Igyártó B.Z., Gaspari A.A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology* 2012, 12: 114-124.
120. Kataranovski M. i Karadaglić Đ. Skin organ culture: a review. *Acta Dermatovenerologica APA* 1999, 8: 131-140.
121. Kataranovski M., Milojević G., Kandolf L., Milošević V. Skin-organ culture as an approach in evaluation of nitric oxide (NO) involvement in contact hypersensitivity expression. *Acta Dermatovenerologica Alpina Panonica et Adriatica* 2002a, 11: 3-10.
122. Kataranovski M., Kandolf-Sekulović L., Milosavljević I. Production of TNF- $\alpha$  by skin explants of dinitrochlorobenzene-challenged ears in rats: a model for the evaluation of contact hypersensitivity. *Vojnosanitetski pregled* 2002b, 59: 581-586.
123. Kehren J., Desvignes C., Krasteva M., Ducluzeau M.T., Assossou O., Horand F., Hahne M., Kägi D., Kaiserlian D., Nicolas J.F. Cytotoxicity is mandatory for CD8<sup>(+)</sup> T cell-mediated contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine* 1999, 189: 779–786.
124. Kimber I. i Weisenberger C.A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. *Archives of Toxicology* 1989, 63: 274-282.

125. Kimber I., Cumberbatch M., Humphreys M., Hopkins S.J. Contact hypersensitivity induces plasma interleukin 6. *International Archives of Allergy and Immunology* 1990, 92: 97-99.
126. Kimber I. i Dearman R.J. The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology* 1994, 93: 13-31.
127. Kimber I., Basketter D.A., Gerberick G.F., Dearman R.J. Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology* 2002, 2: 201-211.
128. Kish D.D., Li X., Fairchild R.L. CD8 T cells producing IL-17 and IFN- $\gamma$  initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *The Journal of Immunology* 2009, 182: 5949-5959.
129. Kish D.D., Volokh N., Baldwin W.M., Fairchild R.L. Hapten application to the skin induces an inflammatory program directing hapten-primed effector CD8 T cells interaction with hapten-presenting endothelial cells. *The Journal of Immunology* 2011, 186: 2117-2126.
130. Kitagaki H., Ono N., Hayakawa K., Kitazawa T., Watanabe K., Shiohara T. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *The Journal of Immunology* 1997, 159: 2484-2491.
131. Kitawaki T., Kadowaki N., Sugimoto N., Kambe N., Hori T., Miyachi Y., Nakahata T., Uchiyama T. IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *International Immunology* 2006, 18: 1789-1799.
132. Kobayashi Y. Langerhans cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens. *Immunology* 1997, 90: 496-501.
133. Kohler J., Hartmann U., Grimm R., Pflugfelder U., Weltzien H.U. Carrier-independent hapten recognition and promiscuous MHC restriction by CD4 T cells induced by trinitrophenylated peptides. *The Journal of Immunology* 1997, 158: 591-597.

134. Koller L.D. i Exon J.H. The rat as model for immunotoxicological assessment. In: Dean J., Luster M.I., Munso A.E., Amos H. (eds.), *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. 1985, New York, Raven Press, pp. 99-111.
135. Kondo S., Kooshesh F., Wang B., Fujisawa H., Sauder D.N. Contribution of the CD28 molecule to allergic and irritant-induced skin reactions in CD28<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of Immunology* 1996, 157: 4822–4829.
136. Kripke M.L., Munn C.G., Jeevan A., Tang J.M., Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *The Journal of Immunology* 1990, 145: 2833-2838.
137. Kumamoto Y., Denda-Nagai K., Aida S., Higashi N., Irimura T. MGL2<sup>+</sup> dermal dendritic cells are sufficient to initiate contact hypersensitivity in vivo. *PloS one* 2009, 4: e5619.
138. Kuper C.F., Stierum R.H., Boorsma A., Schijf M.A., Prinsen M., Bruijntjes J.P., Bloksma N., Arts J.H.E. The contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB) and respiratory allergy in the Th2-prone Brown Norway rat. *Toxicology* 2008, 246: 213-221.
139. Lachapelle J.M. Historical aspects. In: Rycroft R.J.G., Menné T., Frosch P.J., Lepoittevin P. (eds.), *Textbook of contact dermatitis*. 2009, Springer, Berlin, pp. 1-13.
140. Lalić N., Latković Z., Mostarica Stojković M., Lukić M.L. Experimental allergic uveitis in the rat: Cellular characteristics and strain differences in susceptibility to the induction. *Periodicum Biologorum* 1983, 85: 75–76.
141. Landsteiner K. i Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *The Journal of Experimental Medicine* 1935, 61: 643-656.
142. Lappin M.B., Dearman R.J., Norval M., Kimber I. Lack of association between interleukin-6 production by contact allergen-activated draining lymph node cells and lymphoproliferative activity. *American Journal of Contact Dermatitis* 1998, 9: 34-39.

143. Larsen J.M., Geisler C., Nielsen M.W., Boding L., Von Essen M., Hansen A.K., Skov L., Bonefeld C.M. (2007). Cellular dynamics in the draining lymph nodes during sensitization and elicitation phases of contact hypersensitivity. *Contact dermatitis* 2007, 57: 300-308.
144. Larsen J.M., Bonefeld C.M., Poulsen S.S., Geisler C., Skov L. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, 123: 486–492.
145. Larsen J.M., Bonefeld C.M., Poulsen S.S., Geisler C., Skov L. IL-23 and TH 17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009, 123: 486-492.
146. Levings M.K., Sangregorio R., Sartirana C., Moschin A.L., Battaglia M., Orban P.C., Roncarolo M.G. 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. *The Journal of Experimental Medicine* 2002, 196: 1335-1346.
147. Loser K., Mehling A., Loeser S., Apelt J., Kuhn A., Grabbe S., Schwarz T., Penninger J.M., Beissert S. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nature medicine* 2006, 12: 1372-1379.
148. Macatonia S.E., Edwards A.J., Knight S.C. Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 1986, 59: 509.
149. Magnusson B. i Kligman A.M. The identification of contact allergens by animal assays. The guinea pig maximization test. *Journal of Investigative Dermatology* 1969, 52: 268-276.
150. Martin S., Ortmann B., Pflugfelder U., Birsner U., Weltzien H.U. Role of hapten-anchoring peptides in defining hapten–epitopes for MHC-restricted cytotoxic T cells. Cross-reactive TNP- determinants on different peptides. *The Journal of Immunology* 1992, 149: 2569–2575.

151. Martin S.F., Dudda J.C., Delattre V., Bachtanian E., Leicht C., Burger B., Weltzien H.U., Simon J.C. Fas-mediated inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell priming results in dominance of type 1 CD8<sup>+</sup> T cells in the immune response to the contact sensitizer trinitrophenyl. *The Journal of Immunology* 2004, 173: 3178-3185.
152. Martin S.F., Dudda J.C., Bachtanian E., Lembo A., Liller S., Dürr C., Heimesaat M.M., Bereswill S., Fejer G., Vassileva R., Jakob T., Freudenberg N., Termeer C.C., Johner C., Galanos C., Freudenberg M.A. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine* 2008, 205: 2151-2162.
153. Martin S.F., Esser P.R., Weber F.C., Jakob T., Freudenberg M.A., Schmidt M., Goebeler M. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2011, 66: 1152-1163.
154. Martin S.F. Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology. *Experimental dermatology* 2012, 21: 382-389.
155. Martinon F., Mayor A., Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology* 2009, 27: 229–265.
156. Matsue H., Kambe N., Shimada S. Murine fetal skin-derived cultured mast cells: A useful tool for discovering functions of skin mast cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2009, 129: 1120-1125.
157. Maurer M., Seidel-Guyenot W., Metz M., Knop J., Steinbrink K. Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *The Journal of Clinical Investigation* 2003, 112: 432–439.
158. McFadden J.P. i Basketter D.A. Contact allergy, irritancy and ‘danger’. *Contact Dermatitis* 2000, 42: 123–127.
159. McGeachy M.J. i Cua D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 2008, 28: 445–453.



160. McLelland J. i Shuster S. Contact dermatitis with negative patch tests: the additive effect of allergens in combination. *British Journal of Dermatology* 1990, 122: 623-630.
161. Meng X., Sawamura D., Tamai K., Hanada K., Ishida H., Hashimoto I. Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating interleukin-10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin. *The Journal of Clinical Investigation* 1998, 101: 1462.
162. Mestas J. i Hughes C.C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology* 2004, 172: 2731-2738.
163. Miljković Đ., Stošić-Grujičić S., Marković M., Momčilović M., Ramić Z., Maksimović-Ivanić D., Mijatović S., Popadić D., Cvetković I., Mostarica-Stojković M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *Journal of Neuroscience Research* 2006, 84: 379-388.
164. Montes M., Rufer N., Appay V., Reynard S., Pittet M.J., Speiser D.E., Guillaume P., Cerottini J.C., Romero P., Leyvraz S. Optimum *in vitro* expansion of human antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive transfer therapy. *Clinical and Experimental Immunology* 2005, 142: 292-302.
165. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 2001, 19: 683–765.
166. Mosmann T.R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65: 55-63.
167. Mostarica-Stojković M., Petrović M., Lukić M.L. Resistance to the induction of EAE in AO rats: its prevention by the pre-treatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clinical and Experimental Immunology* 1982, 50: 311-317.

168. Mostarica-Stojković M., Vukmanović S., Lukić M.L. Correlation of IL 2 production and lymphoid tissue make-up in two inbred strains of rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1988, 237: 407-411.
169. Moussavi A., Dearman R.J., Kimber I., Kemeny D.M. Cytokine production by CD4 and CD8 T cells in mice following primary exposure to chemical allergens: evidence for functional differentiation of T lymphocytes in vivo. *International Archives of Allergy and Immunology* 1998, 116: 116-123.
170. Nagai H., Ueda Y., Ochi T., Hirano Y., Tanaka H., Inagaki N., Kawada K. Different role of IL-4 in the onset of hapten-induced contact hypersensitivity in BALB/c and C57BL/6 mice. *British Journal of Pharmacology* 2000, 129: 299-306.
171. Nakae S., Naruse-Nakajima C., Sudo K., Horai R., Asano M., Iwakura Y. IL-1 alpha, but not IL-1 beta, is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity. *International Immunology* 2001, 13: 1471-1478.
172. Nakae S., Komiyama Y., Nambu A., Sudo K., Iwase M., Homma I., Sekikawa K., Asano M., Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002, 17: 375-387.
173. Nakae S., Komiyama Y., Narumi S., Sudo K., Horai R., Tagawa Y., Sekikawa K., Matsushima K., Asano M., Iwakura Y. IL-1-induced tumor necrosis factor-alpha elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing IFN-gamma-inducible protein 10 in the elicitation phase of the contact hypersensitivity response. *International Immunology* 2003, 15: 251-260.
174. Nakane M., Pollock J.S., Klinghofer V., Basha F., Marsden P.A., Hokari A., Ogura T., Esumi H., Carter G.W. Functional expression of three isoforms of human nitric oxide synthase in baculovirus-infected insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995, 206: 511-517.

175. Nanishi F. i Battisto J.R. Induced suppression of the efferent phase of contact sensitivity in rats. *Cellular Immunology* 1990, 130: 378–388.
176. Navi D., Saegusa J., Liu F.T. Mast cells and immunological skin diseases. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 2007, 33: 144-155.
177. Nelson C.J., How T., Lysle D.T. Enhancement of the contact hypersensitivity reaction by acute morphine administration at elicitation phase. *Clinical Immunology* 1999, 93: 176-183.
178. Nestle F.O., Di Meglio P., Qin J.Z., Nickoloff B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 2009, 9: 679-691.
179. Nieuwenhuis E.E., Gillessen S., Scheper R.J., Exley M.A., Taniguchi M., Balk S.P., Strominger J.L., Dranoff G., Blumberg R.S., Wilson S.B. CD1d and CD1d-restricted iNKT-cells play a pivotal role in contact hypersensitivity. *Experimental Dermatology* 2005, 14: 250-258.
180. Nosbaum A., Vocanson M., Rozieres A., Hennino A., Nicolas J.F. Allergic and irritant contact dermatitis. *European Journal of Dermatology* 2009, 19: 325-332.
181. Novak N., Baurecht H., Schäfer T., Rodriguez E., Wagenpfeil S., Klopp N., Heinrich J., Behrendt H., Ring J., Wichmann E., Illig T., Weidinger S. Loss of function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *Journal of Investigative Dermatology* 2008, 128: 1430–1435.
182. Oez S., Platzer E., Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Blut* 1990, 60: 97-102.
183. O'Garra A. i Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Medicine* 2004, 10: 801–805.
184. O'Garra A., Barrat F.J., Castro A.G., Vicari A., Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Reviews* 2008, 223: 114–131.

185. O'Leary J.G., Goodarzi M., Drayton D.L., von Andrian U.H. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature Immunology* 2006, 7: 507-516.
186. Otsuka A., Kubo M., Honda T., Egawa G., Nakajima S., Tanizaki H., Kim B., Matsuoka S., Watanabe T., Nakae S., Miyachi Y., Kabashima K. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PLoS One* 2011, 6: e25538.
187. Peiser M. Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis. *Clinical and Developmental Immunology* 2013, doi: 10.1155/2013/261037.
188. Pennino D., Eyerich K., Scarponi C., Carbone T., Eyerich S., Nasorri F., Garovich S., Traidl-Hoffmann C., Albanesi C., Cavani A. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten non-specific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. *The Journal of Immunology* 2010, 184: 4880-4888.
189. Peszkowski M.J., Warfvinge G., Larsson Å. Allergic and irritant contact responses to DNFB in BN and LEW rat strains with different Th1/Th2 profiles. *Acta Dermato- Venereologica* 1994, 74: 371-374.
190. Petković V. Kontaktni alergijski dermatitis na očnim kapcima. *Medicinski časopis* 2011, 45: 21-26.
191. Petri B., Phillipson M., Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *The Journal of Immunology* 2008, 180: 6439-6446.
192. Piguet P., Grau G.E., Hauser C., Vassalli P. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *The Journal of Experimental Medicine* 1991, 173: 673-679.
193. Plitnick L.M., Loveless S.E., Ladics G.S., Holsapple M.P., Selgrade M.J., Sailstad D.M., Smialowicz R.J. Cytokine profiling for chemical sensitizers: application of the ribonuclease protection assay and effect of dose. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002, 179: 145-154.

194. Popov A., Mirkov I., Vasilijić S., Zolotarevski L., Kataranovski D., Kataranovski M. Impact of the magnitude of sensitization dose on the incidence and intensity of CHS to dinitrochlorobenzene (DNCB): insight from ear swelling and challenged-skin draining lymph node response in rats. *Journal of Immunotoxicology* 2012, doi: 10.3109/1547691X.2012.753960.
195. Pravica V., Ejodus L., Mostarica M., Stošić S., Lukić M.L. Resistance to multiple, low dose streptozotocin-induced diabetes in rats: dependence on RT6+ T cells. *Transplantation Proceedings* 1993, 25: 2835-2836.
196. Probst P., Kuntzlin D., Fleischer B. TH2-type infiltrating cells in nickel-induced contact dermatitis. *Cellular Immunology* 1995, 165: 134-140.
197. Prop J., Griffiths A., Hutchinson I.V., Morris P.J. Specific suppressor T cells in rats active in the afferent phase of contact hypersensitivity. *Cellular Immunology* 1986, 99: 73-84.
198. Ptak W., Rozycka D., Askenase P.W., Gershon R.K. Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine* 1980, 151: 362-375.
199. Rennert P.D., Hochman P.S., Flavell R.A., Chaplin D.D., Jayaraman S., Browning J.L., Fu Y.X. Essential role of lymph nodes in contact hypersensitivity revealed in lymphotoxin- $\alpha$ -deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* 2001, 193: 1227-1238.
200. Riemann H., Schwarz A., Grabbe S., Aragane Y., Luger T.A., Wysocka M., Kubin M., Trinchieri G., Schwarz T. Neutralization of IL-12 in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance. *The Journal of Immunology* 1996, 156: 1799-1803.
201. Ring S., Schafer S.C., Mahnke K., Lehr H.A., Enk A.H. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *European Journal of Immunology* 2006, 36: 2981-2992.

202. Rivas J.M. i Ullrich S.E. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *The Journal of Immunology* 1992, 149: 3865-3871.
203. Roncarolo G.M., Gregori S., Battaglia M., Bacchetta R., Fleischhauer K., Levings M.K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews* 2006, 212, 28-50.
204. Rowe A., Bunker C.B. Interleukin-4 and the interleukin-4 receptor in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 1998, 38: 36-9.
205. Ross R., Gillitzer C., Kleinz R., Schwing J., Kleinert H., Förstermann U., Reske-Kunz A.B. Involvement of NO in contact hypersensitivity. *International Immunology* 1998, 10: 61-69.
206. Roupe G. i Ridell B. The cellular infiltrate in contact hypersensitivity to picryl chloride in the mouse. *Acta Dermato-Venereologica* 1979, 59: 191-195.
207. Rustemeyer T., Ingrid M.W., van Hoogstraten B., von Blomberg B.M.E., Scheper R.J. Mechanisms in allergic contact dermatitis. In: Frosch P.J., Menné T., Lepoittevin J. (eds.), *Contact Dermatitis*. 2012, Springer, Berlin, pp. 11-43.
208. Saint-Mezard P., Rosieres A., Krasteva M., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J.F. Allergic contact dermatitis. *European Journal of Dermatology* 2004a, 14: 284-295.
209. Saint-Mezard P., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J.F. The role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *European Journal of Dermatology* 2004b, 14: 131-138.
210. Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takashi T., Nomura T. Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews* 2006, 212: 8–27.
211. Salerno A., Dieli F., Sireci G., Bellavia A., Asherson G.L. Interleukin-4 is a critical cytokine in contact sensitivity. *Immunology* 1995, 84: 404-409.

212. Salgame P., Abrams J.S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R.L., Bloom B.R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991, 254: 279-282.
213. Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999, 401: 708–712.
214. Santin A.D., Hermonat P.L., Ravaggi A., Bellone S., Pecorelli S., Roman J.J., Parham G.P., Cannon M.J. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8<sup>(+)</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Virology* 2000, 74: 4729-4737.
215. Saraiva M. i O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* 2010, 10: 170-181.
216. Saulnier M., Huang S., Aguet M., Ryffel B. Role of interferon- $\gamma$  in contact hypersensitivity assessed in interferon- $\gamma$  receptor deficient mice. *Toxicology* 1995, 102: 301-312.
217. Scharschmidt T.C., Man M.Q., Hatano Y., Crumrine D., Gunathilake R., Sundberg J.P., Silva K.A., Mauro T.M., Hupe M., Cho S., Wu Y., Celli A., Schmuth M., Feingold K.R., Elias P.M. Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009, 124: 496–506.
218. Scheynius A. i Tjernlund U. Human keratinocytes express HLA-DR antigens in the tuberculin reaction. *Scandinavian journal of immunology* 1984, 19: 141-147.
219. Scheynius A., Holmdahl R., Klareskog L. Effects on murine T helper cell proliferation by DTH activated syngeneic epidermal cells. *Immunology* 1986, 59: 379-382.
220. Scheynius A., Skoglund C., Johansson C., Holmdahl R., Van der Meide P.H. The rat as an experimental model for studies on immune regulating mechanisms in contact allergic reactions. *Acta Dermato-Venereologica Supplementum* 1988, 135: 54.

221. Schild H.O. The mechanism of contact sensitization. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1962, 14: 1-8.
222. Schmidt M., Raghavan B., Müller V., Vogl T., Fejer G., Tchaptchet S., Keck S., Kalis C., Nielsen P.J., Galanos C., Roth J., Skerra A., Martin S.F., Freudenberg M.A., Goebeler M. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology* 2010, 11: 814-819.
223. Schnuch A. i Carlsen B.C. Genetics and individual predispositions in contact dermatitis. In: Johansen J.D., Frosch P., Lepoittevin J., Contact Dermatitis. 2011, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 13-42.
224. Schwarz A., Beissert S., Grosse-Heitmeyer K., Gunzer M., Bluestone J.A., Grabbe S., Schwarz T. Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance. *The Journal of Immunology* 2000, 165: 1824-1831.
225. Scott A.E., Kashon M.L., Yucesoy B., Luster M.I., Tinkle S.S. Insights into the quantitative relationship between sensitization and challenge for allergic contact dermatitis reactions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002, 183: 66-70.
226. Sebastiani S., Albanesi C., De Pità O., Puddu P., Cavani A., Girolomoni G. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Archives of Dermatological Research* 2002, 293: 552-559.
227. Seidel-Guyenet W., Perschon S., Dechant N., Alt R., Knop J., Steinbrink K. Low zone tolerance induced by systemic application of allergens inhibits Tc1-mediated skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006, 117: 1170-1177.
228. Shevach, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology* 2002, 2: 389-400.



229. Shibata M., Sueki H., Suzuki H., Watanabe H., Ohtaki H., Shioda S., Nakanishi-Ueda T., Yasuhara H., Sekikawa K., Iijima M. Impaired contact hypersensitivity reaction and reduced production of vascular endothelial growth factor in tumor necrosis factor-alpha gene-deficient mice. *The Journal of Dermatology* 2005, 32: 523.
230. Simon J.C., Mosmann T., Edelbaum D., Schopf E., Bergstresser P.R., Cruz Jr P.D. *In vivo* evidence that ultraviolet B-induced suppression of allergic contact sensitivity is associated with functional inactivation of Th1 cells. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 1994, 10: 206-211.
231. Skapenko A., Kalden J.R., Lipsky P.E., Schulze-Koops H. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> precursors. *The Journal of Immunology* 2005, 175: 6107–6116.
232. Skoglund C., Scheynius A., Holmdahl R., Van der Meide P.H. Enhancement of DTH reaction and inhibition of the expression of class II transplantation antigens by *in vivo* treatment with antibodies against  $\gamma$ -interferon. *Clinical and Experimental Immunology* 1988, 71: 428-432.
233. Skoglund C., Scheynius A. Effects of interferon- $\gamma$  treatment of the cutaneous DTH reaction in rats. *Archives of Dermatological Research* 1990, 282: 318-324.
234. Smith K.A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988, 240: 1169-1176.
235. Soilleux E.J., Morris L.S., Leslie G., Chehimi J., Luo Q., Levroney E., Trowsdale J., Montaner L.J., Doms R.W., Weissman D., Coleman N., Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations *in situ* and *in vitro*. *Journal of Leukocyte Biology* 2002, 71: 445-457.
236. Steinbrink K., Sorg C., Macher E. Low zone tolerance to contact allergens in mice: a functional role for CD8<sup>+</sup> T helper type 2 cells. *The Journal of experimental medicine* 1996, 183: 759-768.

237. Streit M. Contact dermatitis: clinics and pathology. *Acta Odontologica* 2001, 59: 309-314.
238. Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* 2003, 3: 276-284.
239. Suto H., Nakae S., Kakurai M., Sedgwick J.D., Tsai M., Galli S.J. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *The Journal of Immunology* 2006, 176: 4102–4112.
240. Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000, 100: 655-669.
241. Szczepanik M., Akahira-Azuma M., Bryniarski K., Tsuji R.F., Kawikova I., Ptak W., Kiener C., Campos R.A., Askenase P.W. B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *The Journal of Immunology* 2003, 171: 6225–6235.
242. Takanami-Ohnishi Y., Amano S., Kimura S., Asada S., Utani A., Maruyama M., Osada H., Tsunoda H., Irukayama-Tomobe Y., Goto K., Karin M., Sudo T., Kasuya Y. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in contact hypersensitivity. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 37896–37903.
243. Tang A., Judge T.A., Nickoloff B.J., Turka L.A. Suppression of murine allergic contact dermatitis by CTLA4Ig. Tolerance induction of Th2 responses requires additional blockade of CD40-ligand *The Journal of Immunology* 1996, 157: 117–125.
244. Thornton A.M. i Shevach E.M. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *The Journal of Immunology* 2000, 164: 183-190.
245. Toebak M.J., Gibbs S., Bruynzeel D.P., Scheper R.J., Rustemeyer T. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* 2009, 60: 2-20.

246. Tomura M., Honda T., Tanizaki H., Otsuka A., Egawa G., Tokura Y., Waldmann H., Hori S., Cyster J.G., Watanabe T., Miyachi Y., Kanagawa O., Kabashima K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2010, 120: 883-893.
247. Traidl C., Jugert F., Krieg T., Merk H., Hunzelmann N. Inhibition of allergic contact dermatitis to DNCB but not to oxazolone in interleukin-4-deficient mice. *Journal of Investigative Dermatology* 1999, 112: 476-482.
248. Traidl C., Sebastiani S., Albanesi C., Merk H.F., Puddu P., Girolomoni G., Cavani A. Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell subsets against keratinocytes. *The Journal of Immunology* 2000, 165: 3058-3064.
249. Tsan M.F. i Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 2004, 76: 514-519.
250. Ulfgren A., Klareskog L., Lindberg M. An immunohistochemical analysis of cytokine expression in allergic and irritant contact dermatitis. *Acta Dermatovenereologica Stockholm* 2000, 80: 167-170.
251. Ulrich T.R., del Castillo J., Guo K.Z. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood* 1989, 73: 108-110.
252. Ulrich P., Grenet O., Bluemel J., Vohr H., Wiemann C., Grundler O., Suter W. Cytokine expression profiles during murine contact allergy: T helper 2 cytokines are expressed irrespective of the type of contact allergen. *Archives of Toxicology* 2001, 75: 470-479.
253. Valladeau J. i Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Seminars in Immunology* 2005, 17: 273-283.
254. Van Iperen H.P. i Beijersbergen van Henegouwen G.M. An animal model and new photosensitizers for photopheresis. *Photochemistry and Photobiology* 1993, 58: 571-574.

255. Van Iperen H.P. i Beijersbergen van Henegouwen G.M. Singlet oxygen producing photosensitizers in photoresis. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 1997, 38: 203-208.
256. Van Och F.M., Slob W., de Jong W.H., Vandebriel R.J., van Loveren H. A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins. *Toxicology* 2000, 146: 49-59.
257. Varani J., Perone P., Spahlinger D.M., Singer L.M., Diegel K.L., Bobrowski W.F., Dunstan R. Human skin in organ culture and human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) in monolayer culture for assessment of chemically induced skin damage. *Toxicologic Pathology* 2007, 35: 693-701.
258. Varona R., Villares R., Carramolino L., Goya I., Zaballos A., Gutiérrez J., Torres M., Martínez-A C., Márquez G. CCR6-deficient mice have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses. *The Journal of Clinical Investigation* 2001, 107: R37-R45.
259. Vasilev S., Gruden-Movsesijan A., Ilic N., Sofronic-Milosavljevic L.J. Strain difference in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection between Dark Agouti and Albino Oxford rats. *Veterinary parasitology* 2009, 159: 229-231.
260. Vocanson M., Hennino A., Rozieres A., Poyet G., Nicolas J.F. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2009, 64: 1699-1714.
261. Vukmanović S., Mostarica Stojković M., Lukić M.L. Experimental autoimmune encephalomyelitis in "low" and "high" Interleukin 2 producer rats: I Cellular basis of induction. *Cellular Immunology* 1989, 121: 237-246.
262. Walker D.B., Williams W.C., Copeland C.B., Smialowicz R.J. Persistent suppression of contact hypersensitivity, and altered T-cell parameters in F344

263. rats exposed perinatally to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology* 2004, 197: 57-66.
264. Wang B., Fujisawa H., Zhuang L., Kondo S., Shivji G.M., Kim C.S., Mak T.W., Sauder D.N. Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *The Journal of Immunology* 1997, 159: 6148-6155.
265. Wang H.W., Tedla N., Lloyd A.R., Wakefield D., McNeil P.H. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 1998, 102: 1617-1626.
266. Watanabe H., Unger M., Tuvel B., Wang B., Sauder D.N. Contact hypersensitivity: The mechanism of immune responses and T cell balance. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2002, 22: 407-412.
267. Watanabe H., Gaide O., Pétrilli V., Martinon F., Contassot E., Roques S., Kummer J.A., Tschopp J., French L.E. Activation of the IL-1 $\beta$ -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology* 2007, 127: 1956-1963.
268. Watanabe H., Gehrke S., Contassot E., Roques S., Tschopp J., Friedmann P.S., French L.E., Gaide O. Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization. *The Journal of Immunology* 2008, 180: 5826-5832.
269. Weber F.C., Esser P.R., Müller T., Ganesan J., Pellegatti P., Simon M.M., Zeiser R., Idzko M., Jakob T., Martin S.F. Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine* 2010, 207: 2609–2619.
270. Weedon D. The spongiotic reaction pattern. In: Weedon D. i Strutton G. (eds.), *Skin pathology*. 2002, Churchill Livingstone, Edinburg, pp. 94-110.

271. Weigmann B., Schwing J., Huber H., Ross R., Mossmann H., Knop J., Reske-Kunz A.B. Diminished contact hypersensitivity response in IL-4 deficient mice at a late phase of the elicitation reaction. *Scandinavian Journal of Immunology* 1997, 45: 308–314.
272. Weller R. Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. *Clinical and Experimental Dermatology* 2003, 28: 511–514.
273. Werfel T., Hentschel M., Kapp A., Renz H. Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4- producing allergen-specific T cells and restricted V  $\beta$  repertoire in nickel-mediated contact dermatitis. *The Journal of Immunology* 1997, 158: 2500–2505.
274. Wurtz O., Bajénoff M., Guerder S. IL-4-mediated inhibition of IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *International Immunology* 2004, 16: 501-508.
275. Xu H., Dilulio N.A., Fairchild R.L. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: IFN- $\gamma$  producing (Tc1) effector CD8<sup>+</sup> T cells and IL-4/IL-10 producing (Th2) negative regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1996, 183: 1001-1012.
276. Xu B., Aoyama K, Kitani A., Matsuyama T., Matsushita T. Expression of cytokine mRNAs in the draining lymph nodes following contact hypersensitivity in mice. *Toxicology Methods* 1997, 7: 137-148.
277. Xu H., Heeger P.S., Fairchild R.L. Distinct Roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8<sup>+</sup> Tc1 and regulatory CD4<sup>+</sup> Th2 cells for contact hypersensitivity. *The Journal of Immunology* 1997a, 159: 4217-4226.
278. Xu H., Banerjee A., Dilulio N.A., Fairchild R.L. Development of effector CD8<sup>+</sup> T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Immunology* 1997b, 158: 4721-4728.

279. Yagi R., Junttila I.S., Wei G., Urban J.F.Jr., Zhao K., Paul W.E., Zhu J. The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon- $\gamma$ . *Immunity* 2010, 32: 507-517.
280. Yao Y., Li W., Kaplan M.H., Chang C.H. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2005, 201: 1899-1903.
281. Yokozeki H., Ghoreishi M., Takagawa S., Takayama K., Satoh T., Katayama I., Takeda K., Akira S., Nishioka K. Signal Transducer and Activator of Transcription 6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine* 2000, 191: 995–1004.
282. Yokozeki H., Watanabe K., Igawa K., Miyazaki Y., Katayama I., Nishioka K.  $\gamma\delta$  T cells assist  $\alpha\beta$  T cells in the adoptive transfer of contact hypersensitivity to para-phenylenediamine. *Clinical and Experimental Immunology* 2001, 125: 351–359.
283. Zhang X. i Mosser D.M. Macrophage activation by endogenous danger signals. *The Journal of Pathology* 2008, 214: 161–178.
284. Zollner T.M., Igney F.H., Asadullah K. Acute and chronic models of allergic contact dermatitis: Advantages and limitations. In: Zollner T.M., Renz H., Asadullah K. (eds.), *Animal models of T cell-mediated skin diseases*. 2005, Springer, Berlin, pp. 255-275.

# Biografija

Aleksandra (Dragan) Popov Aleksandrov rođena je 2. septembra 1981. godine u Zrenjaninu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2000/2001. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija i isti završila marta 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,34. Diplomskim rad pod naslovom "Lokalni efekat ponovljene epikutane aplikacije varfarina", pod mentorstvom dr Milene Kataranovski, završila je sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Imunobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je upisala 2009/2010 godine, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9.9.

Aleksandra se 2008. godine zapošljava kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za ekologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije naziva "Ispitivanje ekotoksikoloških efekata ksenobiotika i biotičkih agenasa na populacije mišolikih glodara" (evidencioni broj 143038) pod rukovodstvom Prof. Dr Dragana Kataranovskog. Zvanje istraživač saradnik stiče septembra 2010. Aleksandra je trenutno angažovana na projektu Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije pod nazivom "Imunomodulatorni efekti ksenobiotika i biotičkih faktora životne sredine na populacije mišolikih glodara" (evidencioni broj 173039) pod rukovodstvom Prof. Dr Milene Kataranovski. Aleksandra je do sada učestvovala kao autor/koautor na 15 radova u časopisima sa SCI liste, i ima sedam saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i četiri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Aleksandra je aktivni član Društva imunologije Srbije i Biohemijskog društva Srbije.