KOMÓRKI NKT JAKO ELEMENT ŁĄCZĄCY ODPORNOŚĆ WRODZONĄ Z ODPORNOŚCIĄ NABYTĄ

NKT CELLS AS A CONNECTING ELEMENT BETWEEN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY

Lucyna KASZUBOWSKA, Anna PIOTROWSKA,
Kamila SIEDLECKA-KROPLEWSKA, Zbigniew KMIEĆ

Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Komórki NKT są rodzajem limfocytów T wyposażonych w receptor TCR oraz antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek NK. Rozpoznają antygeny lipidowe, pomijane przez inne limfocyty T, które prezentowane są przez cząsteczkę CD1d. Limfocyty NKT funkcjonują jako element odporności nieswoistej posiadając zdolność natychmiastowej odpowiedzi na stymulację antygenem. Produkując szerokie spektrum cytokin, regulują rozwijającą się odpowiedź swoistą i dlatego określane są jako element łączący odporność nieswoistą i swoistą. Populację komórek NKT tworzy kilka subpopulacji limfocytów o odmiennych właściwościach efektorowych, które wyodrębniono na podstawie budowy receptora TCR oraz ekspresji receptora powierzchniowego CD161. Zarówno sposób aktywacji komórek jak i ich lokalizacja wpływają na właściwości komórek NKT, które wykazują aktywność zarówno prozapalną, jak i przeciwzapalną, co zaobserwowano w chorobach o podłożu autoimmunologicznym. Regulatorowy charakter tych komórek sprawia, że odgrywają one istotną rolę także w procesach starzenia i nowotworzenia, pełniąc często funkcję komórek o charakterze ochronnym.

Słowa kluczowe: komórki NKT, α-GalCer, cząsteczka CD1d, odporność nieswoista, odporność swoista

Summary: Natural killer T cells (NKT cells) are T lymphocytes revealing the expression of both T-cell receptors (TCRs) and NK cell specific receptors on the cell surface. They recognize lipid antigens bound to CD1d molecules, which are not recognized by conventional T lymphocytes. NKT cells function in the innate immune responses being rapidly activated upon antigenic stimulation. They subsequently secrete large amounts of cytokines that in turn modulate the developing adaptive immune response. Therefore NKT cells are regarded to represent a subset of lymphocytes that bridge the innate and adaptive immune systems. NKT lymphocytes are divided into subpopulations according to the structure of their T-cell receptor and expression of the surface receptor CD161. NKT populations differ also in their effector functions. Both mode of activation and localization of NKT cells were shown to

affect their activities which may be described as pro-inflammatory or anti-inflammatory as observed in autoimmune diseases. Due to the regulatory properties of NKT cells they may play an important protective role in the processes of aging and carcinogenesis.

Key words: natural killer T cells, α-GalCer, CD1d molecule, innate immunity, adaptive immunity

Wykaz stosowanych skrótów: **AIH** – (ang. *AutoImmune Hepatitis*) – autoimmunologiczne zapalenie wątroby; **APC** – (ang. *Antigen Presenting Cell*) – komórka prezentująca antygen; **CTL** – (ang. *Cytotoxic T Lymphocyte*) – limfocyt T cytotoksyczny; **DC** – (ang. *Dendritic Cell*) – komórka dendrytyczna; **DN** – (ang. *Double Negative*) – fenotyp podwójnie negatywny; **FASL** – (ang. *Fas Ligand*) – białko przezbłonowe typu II, należące do rodziny TNF; **FOXP3** – (ang. *forkhead/winged helix transcription factor*) – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny białek FOX, specyficzny marker limfocytów Treg; **GM-CSF** – (ang. *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; **HNSCC** – (ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) – rak płaskonabłonkowy głowy i szyi; **ICOS** – (ang. ***I**nducible T-cell **COS**timulator*) – cząsteczka kostymulująca należąca do rodziny cząsteczek CD28, która ulega ekspresji na zaktywowanych komórkach T; **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **iNKT –** (ang. *Invariant NKT*) – komórka NKT posiadająca niezmienny receptor TCR; **LLT1** – (ang. *Lectin Like Transcript 1*) – transkrypt 1 podobny do lektyny; **LPC (**ang**.** *Lysophosphatidylcholine*) **–** lizofosfatydylocholina**; MAIT** cells (ang. *Mucosal Asscociated Invariant T cells)* **–** niezmienne komórki T związane z błonami śluzowymi; **MDSCs** – (ang. *Myeloid Derived Suppressor Cells*) – mieloidalne komórki supresorowe; **MIHC** – (ang. *Major Histocompatibility Complex*) – główny układ zgodności tkankowej; **MIP-1α** (ang. *Macrophage Inflammatory Protein 1α*) – czynnik produkowany przez makrofagi wywołujący lokalną odpowiedź zapalną *in vivo*; **MYCN** – (ang. *V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*) – protoonkogen należący do rodziny czynników transkrypcyjnych MYC; **NOD** – (ang. *Non-Obese Diabetic*) – mysi model cukrzycy typu1; **NOD-*scid*** – szczep mysi powstały przez skrzyżowanie myszy NOD z myszami SCID (ang. *Severe Combined Immunodeficiency*); **PBC** – (ang. *Primary Biliary Cirrhosis*) – pierwotna marskość żółciowa wątroby; **PBMC** – (ang. *Peripheral Blood Mononuclear* Cell) – jednojądrzasta komórka krwi obwodowej; **PD-1** – (ang. *Programmed cell Death protein 1*) – białko 1 programowanej śmierci komórki; **PRR** (ang. *Pattern-Recognition Receptors*) – receptory rozpoznające wzorce; **RANTES** – (*ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)* **–** chemokina β syntetyzowana przez limfocyty T; **STAT** – (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription)* – czynnik transkrypcyjny, transduktor sygnału i aktywator transkrypcji; **TAM** – (ang. *Tumor Associated Monocytes/Macrophages*) – monocyty/makrofagi towarzyszące nowotworowi; **TILs** – (ang. *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) – limfocyty infiltrujące nowotwór; **TCR** – (ang. *T Cell Receptor*) – receptor limfocytów T; **TGF** – (ang. *Transforming Growth Factor*) – transformujący czynnik wzrostu; **TLR** – (ang. *Toll Like Receptor*) – receptor toll-podobny; **TNF** – (ang. *Tumour Necrosis Factor*) – czynnik martwicy nowotworu; **vNKT** – (ang. *variant NKT*) – limfocyt NKT posiadający zmienny receptor TCR

WSTĘP

Komórki NKT pierwotnie opisywane były jako populacja limfocytów T posiadających na swojej powierzchni charakterystyczny dla limfocytów T receptor TCR oraz charakterystyczny dla komórek NK receptor NK1.1 czyli cząsteczkę CD161 [23, 25]. Obecnie uważa się, że komórki NKT to kilka subpopulacji limfocytów T

rozpoznających antygeny lipidowe i glikolipidowe prezentowane przez powierzchniową cząsteczkę CD1d, które na swojej powierzchni posiadają również receptory TCR i NK1.1 (CD161). Badania na myszach wykazały jednak, że receptory NK1.1 występują tylko na dojrzałych komórkach NKT i znikają z ich powierzchni po kilku dniach od momentu aktywacji [23].

Komórki NKT stanowią około 0.1% limfocytów krwi obwodowej [31]. Jest to heterogenna populacja limfocytów, która obejmuje zarówno komórki wykazujące ekspresję jak i brak ekspresji cząsteczek CD161, CD4 i CD8. Limfocyty NKT mogą posiadać także na powierzchni receptory charakterystyczne dla komórek NK: CD16 i CD56 [79]. Rodzaje receptorów powierzchniowych komórek NKT przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1. Receptory występujące na powierzchni komórek NKT
TABLE 1. Receptors present on the surface of NKT cells

Receptory obecne na powierzchni komórek NKT i ich funkcja	Literatura
CD161 – receptor lektynopodobny występujący na powierzchni komórek NK, aktywuje ścieżkę cytotoksyczną komórek NK, rozpoznaje lektynopodobną cząsteczkę LLT1	[42, 76]
Cząsteczki z rodziny Ly 49 – receptory lektynowe o charakterze aktywującym lub hamującym, rozpoznające klasyczne cząsteczki MHC I	[42, 76]
NKG2D – receptor aktywujący charakterystyczny dla komórek NK i limfocytów T CD8	[42]
CD24 – cząsteczka adhezji komórkowej	[26]
CD44 – powierzchniowa glikoproteina biorąca udział w oddziaływaniach międzykomórkowych, adhezji i migracji komórek; receptor kwasu hialuronowego	[26]
TCR – receptor limfocytów T, w komórkach NKT rozpoznaje antygeny lipidowe lub glikolipidowe prezentowane w obecności cząsteczki CD1d	[23]
CD3 – glikoproteina transbłonowa należąca do rodziny immunoglobulin, wchodzi w skład kompleksu TCR i uczestniczy w jego kaskadzie sygnalizacyjnej po związaniu liganda	[42]
CD16 – receptor aktywujący występujący na powierzchni komórek NK, wiąże się z fragmentem Fc przeciwciał IgG i uczestniczy w mechanizmie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC)	[79]
CD56 – glikoproteina należąca do rodziny immunoglobulin, izoforma cząsteczki adhezyjnej N-CAM, integryna wykazująca właściwości adhezji homotypowej	[79]
FASL – glikoproteina przezbłonowa należąca do rodziny białek TNF, zaangażowana w indukcję procesu apoptozy	[68]
CD40L – białko należące do rodziny białek TNF; pełni rolę cząsteczki kostymulującej w procesie aktywacji komórek APC	[68]

Komórki NKT CD4+ produkują cytokiny charakterystyczne zarówno dla odpowiedzi typu Th1 (IL-2, IFN-γ, TNF-α) jak i Th2 (IL-4, IL-10, IL-13). Natomiast komórki NKT CD4- wydzielają głównie cytokiny odpowiedzi typu Th1 i reprezentują fenotyp cytolityczny odgrywając istotną rolę w przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej odpowiedzi immunologicznej [78]. Różnice w profilu produkowanych cytokin dotyczą także ekspresji receptora NK1.1. Wykazano, że w grasicy subpopulacje $NK1.1^-$ produkują duże ilości IL-4 i niewiele IFN-γ, natomiast komórki $NKT1.1^+$ produkują mniej IL-4 i więcej IFN-γ [26].

Komórki NKT podlegają restrykcji CD1. Cząsteczka CD1 należy do grupy cząsteczek prezentujących antygeny, przypominających strukturą cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC I, ale w przeciwieństwie do nich, prezentuje limfocytom T antygeny lipidowe, a nie peptydowe [78]. Wynika to ze specyficznej struktury molekularnej CD1. Podobnie jak cząsteczki MHC I cząsteczka CD1 zbudowana jest z łańcucha ciężkiego α i β2-mikroglobuliny (β2M), ale miejsce wiązania antygenu ma w jej przypadku charakter hydrofobowy i tworzy charakterystyczne „rowki" lub „kieszenie", które dopasowują się do struktury przestrzennej łańcuchów węglowodorowych lipidów [78]. Obecnie znanych jest pięć izoform należących do trzech grup rodziny cząsteczek CD1 różniących się stopniem homologii sekwencji aminokwasów. Cząsteczki grupy pierwszej (CD1a, CD1b, CD1c) i grupy drugiej (CD1d) występują na powierzchni komórek i należą do cząsteczek prezentujących antygeny. Natomiast należące do trzeciej grupy cząsteczki CD1e pełnią funkcję białek opiekuńczych ułatwiających transport i wiązanie lipidów z cząsteczkami CD1b i CD1d. Wykazano, że u ludzi występują wszystkie izoformy cząsteczek CD1, natomiast u myszy i szczurów występuje tylko cząsteczka CD1d [3]. Cząsteczka CD1 ulega ekspresji przede wszystkim na powierzchni komórek prezentujących antygeny takich jak komórki dendrytyczne i limfocyty B. Natomiast cząsteczka CD1d ulega ekspresji także na powierzchni monocytów, makrofagów, tymocytów, hepatocytów, komórek nowotworowych [3].

Podobnie jak limfocyty T, komórki NKT różnicują się w grasicy, gdzie podlegają selekcji zarówno pozytywnej, jak i negatywnej. Selekcja pozytywna klasycznych komórek NKT zachodzi na podwójnie dodatnich tymocytach kory grasicy (CD4+CD8+), co jest charakterystyczne dla limfocytów T podlegających selekcji z udziałem nieklasycznych cząsteczek MHC klasy I [76]. Badania na myszach wykazały, że najważniejszym etapem w rozwoju komórek NKT jest wytworzenie w wyniku rekombinacji genów VDJ łańcucha β odpowiedniego, częściowo niezmiennego (ang. *semi-invariant*) receptora TCR, podlegającego restrykcji CD1d. U myszy pozbawionych genu CD1d w ogóle nie obserwowano występowania komórek NKT. Ponadto wykazano, że cząsteczka CD1d ulega ekspresji na tymocytach kory grasicy, a nie na nabłonkowych komórkach zrębu, jak ma to miejsce w przypadku selekcji limfocytów T podlegających restrykcji MHC [26].

Limfocyty NKT izolowane z krwi pępowinowej charakteryzują się podwyższoną ekspresją markera pamięci immunologicznej CD45RO w porównaniu z innymi limfocytami Tαβ, co wskazuje na fakt, że te komórki miały kontakt z antygenem jeszcze przed urodzeniem. Jest to wyjątkowa cecha, ponieważ inne komórki jednojądrzaste izolowane z krwi pępowinowej charakteryzują się silną ekspresją markera CD45RA i słabą ekspresją markera pamięci immunologicznej CD45RO, co stanowi typowy wzór ekspresji dla komórek naiwnych, charakterystyczny dla układu immunologicznego płodu. Aktywacja naiwnych limfocytów T wiąże się z utratą epitopu CD45RA, wzrostem ekspresji CD45RO i utratą cząsteczki CD62L, selektyny istotnej w procesie zasiedlania obwodowych narządów limfatycznych. Komórki NKT uzyskują więc fenotyp charakterystyczny dla komórek pamięci jeszcze przed urodzeniem, co świadczy o istotnej roli regulatorowej tych komórek jeszcze przed urodzeniem [80]. Wczesny kontakt z antygenem potwierdza także wysoka ekspresja CD25 na powierzchni komórek NKT izolowanych z krwi pępowinowej. Znamienny jest także fakt, że fenotyp pamięci komórek NKT noworodka jest podobny do fenotypu tych komórek izolowanych z krwi obwodowej osób dorosłych. U dorosłych jednak ekspresja CD62L ulega jeszcze dalszemu obniżeniu, a poziom ekspresji CD25 może być zróżnicowany, co świadczy o tym, że komórki NKT u osób dorosłych są nadal stymulowane [80].

KLASYFIKACJA KOMÓREK NKT

Klasyfikacja komórek NKT opiera się na różnicach w budowie łańcucha α w cząsteczce receptora TCR. Komórki NKT typu I, określane również jako klasyczne (ang. *classical*) lub niezmienne (ang. *invariant NKT,* iNKT) wykazują stałą, silnie konserwowaną ewolucyjnie budowę łańcucha α TCR (Vα14Jα18 u myszy i Vα24Jα18 u ludzi) oraz zmienną budowę łańcucha β TCR (Vβ8.2/Vβ7/Vβ2 u myszy i Vβ11 u ludzi) [26, 76] (tab. 2).

Początkowo stwierdzono, że populacja komórek iNKT rozpoznaje pewien specyficzny antygen należący do glikosfingolipidów: α-galaktozyloceramid (α-GalCer). Został on wyizolowany z bakterii rodzaju *Novosphingobium* kolonizujących gąbkę morską *Agelas Mauritianus*. Był to glikolipid, który naturalnie nie występuje i nie odgrywa żadnej biologicznej roli w komórkach ssaków, ale zauważono, że *in vivo* prowadzi do silnej aktywacji zarówno ludzkich jak i mysich komórek iNKT [64, 76]. Przez wiele lat próbowano wyjaśnić sens istnienia silnie konserwowanej populacji limfocytów T, która rozpoznaje antygeny pochodzące z tak specyficznego źródła, jakim są gąbki morskie. W końcu okazało się, że komórki NKT są aktywowane także przez szereg naturalnie występujących antygenów pochodzących z bakterii *Sphingomonas* (α-glikuronozyloceramidy)*, Borrelia burgdorferi* (*α*-galaktozylodiacyloglicerol)*, Streptococcus pneumoniae* (α-glukozylodiacyloglicerol).

TABELA 2. Klasyfikacja komórek NKT
TABLE 2. Classification of NKT cells

	NKT typu I (iNKT)	**NKT typu II (vNKT)**	**Komórki podobne do NKT (NKT-like)**
Restrykcja	CD1d	CD1d	MHC (MR1 – komórki MAIT)
Reaktywność z α-GalCer	+	-	-
Repertuar TCRα	Niezmienny Mysz: Vα14Jα18, Człowiek: Vα24Jα18	Zmienny, ale z przewagą Mysz: Vα3.2Jα9 lub Vα8	Zmienny (poza komórkami MAIT, gdzie jest niezmienny): Mysz TCRα: Vα19Jα33 Człowiek TCRα: Vα7.2Jα33
Repertuar TCRβ	Niezmienny Mysz: Vβ8.2, Vβ7 lub Vβ2 Człowiek: Vβ11	Zmienny, ale z przewagą Mysz: Vβ8	Zmienny (poza komórkami MAIT, gdzie jest niezmienny): Mysz: Vβ8, Vβ6 Człowiek: Vβ13, Vβ2
Ekspresja NK1.1 (CD161)	+/- *	+/-	+
Subpopulacje	Mysz: CD4+, CD4-CD8- Człowiek: CD4+, CD8+, CD4-CD8-	Mysz: CD4+, CD4-CD8-	CD4+, CD8+, CD4-CD8-

* + komórki dojrzałe wykazujące w spoczynku ekspresję danej cząsteczki, – komórki niedojrzałe lub niewykazujące po aktywacji ekspresji danej cząsteczki [23, 26]

Są to glikolipidy z przyłączoną resztą glikozylową w pozycji α (ang. *α-linked glycolipids*) i początkowo sądzono, że taka struktura jest kluczowa w rozpoznawaniu tych antygenów przez limfocyty NKT. W komórkach ssaków natomiast produkowane są głównie glikolipidy z resztą glikozylową przyłączoną w pozycji β (ang. *β-linked glycolipids)* [25, 27], co komplikowało poszukiwania antygenu endogennego dla tej populacji komórek. Na początku wydawało się, że dobrym kandydatem będzie izoglobotriheksozyloceramid (iGb3), na co wskazywały badania na myszach pozbawionych aktywnego genu dla β-heksozoaminidazy B – lizosomalnego enzymu odpowiedzialnego za degradację glikosfingolipidów i powstawanie iGb3 w lizosomach. Wstępne wyniki wykazywały wpływ iGb3 na rozwój i selekcję komórek NKT [84]. Jednak dalsze badania nie potwierdziły tych danych, ponieważ u myszy pozbawionych syntazy iGb3 nie zaobserwowano zaburzeń w powstawaniu i selekcji komórek NKT. Podważało to wcześniejsze wyniki dotyczące roli iGb3 w rozwoju NKT i problem antygenu endogennego dla komórek NKT pozostał przez

kilka lat niewyjaśniony [24]. Dopiero Brennan i współpracownicy [8] wykazali, że autoantygenem dla komórek NKT może być β-glukozyloceramid (β-GlcCer), glikosfingolipid obecny w tkance limfatycznej człowieka i myszy. Odkrycie to potwierdziły badania Pellicci i współpracowników, którzy wykazali z kolei, że receptor TCR komórek NKT może „naginać" glikolipidy z wiązaniem β do konformacji charakterystycznej dla glikolipidów z wiązaniem α i działać na zasadzie mimikry molekularnej [57, 60].

Populacja komórek NKT typu II określana jest również jako komórki vNKT (ang. *variant)* NKT. Posiada receptory TCR o większym stopniu różnorodności niż komórki NKT typu I, charakteryzujące się jednak przewagą pewnych kombinacji np. u myszy występuje głównie kombinacja Vα3.2Jα9 lub Vα8 i Vβ8 [23, 64]. Komórki te należą do populacji limfocytów podlegających restrykcji CD1d, ale nie rozpoznają antygenu α-GalCer, tylko inne antygeny hydrofobowe, np. sulfatyd (3-sulfo-galaktozyloceramid) i lizofosfatydylocholinę (LPC) [26]. Ostatnie badania wykazały, że vNKT mogą także wiązać pewne formy β-GlcCer, ale o innej długości i stopniu nasycenia łańcuchów acylowych niż komórki iNKT [27]. U myszy komórki vNKT stanowią mniej niż 5% populacji komórek NKT wątroby i w przeciwieństwie do iNKT znajdują się głównie w śledzionie i szpiku kostnym [64].

Zarówno u myszy jak i u człowieka limfocyty iNKT oraz vNKT podlegają restrykcji CD1d. U człowieka istnieją ponadto komórki NKT podlegające restrykcji cząsteczek CD1a, CD1b lub CD1c. Jest to bardzo zróżnicowana grupa komórek, ponieważ zaliczane są do niej limfocyty Tαβ i Tγδ, które nie posiadają ściśle określonego repertuaru TCR. Mogą to być komórki $CD4^+$, $CD8^+$ lub $CD4^-CD8^-$ (DN, ang. *double negative*). Jednak podobnie jak komórki iNKT podlegają szybkiej aktywacji, wykazują cytotoksyczność, produkują IFN-γ i wzmacniają aktywację komórek dendrytycznych [26].

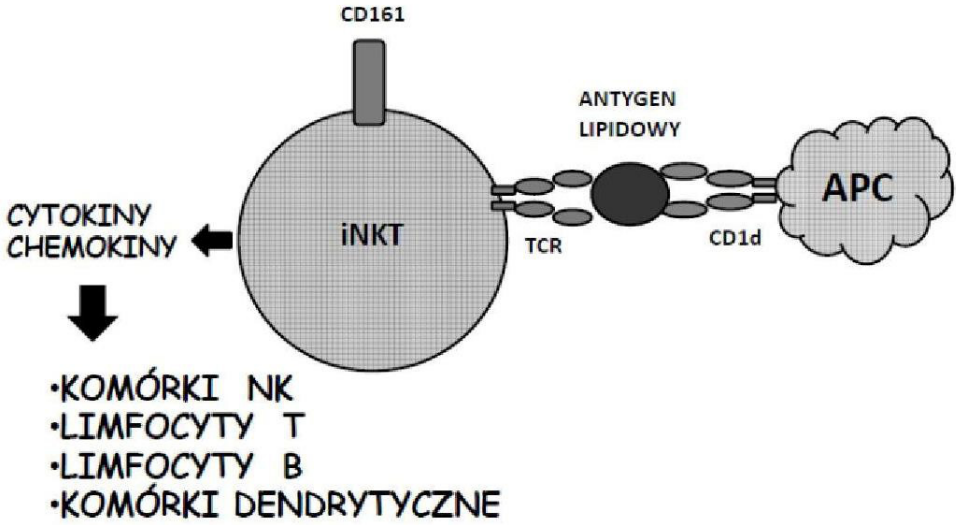
Zaobserwowano też występowanie populacji komórek podobnych do NKT (ang. *NKT-like cells),* która w przeciwieństwie do limfocytów NKT podlega restrykcji MHC (należą do niej komórki iNKT związane z błonami surowiczymi (ang. *Mucosal Associated Invariant T cells,* MAIT cells). Komórki należące do tej populacji występują zarówno u myszy jak i u człowieka i posiadają podobnie jak iNKT niezmienną budowę łańcucha TCRα (u myszy Vα19Jα33, a u człowieka Vα7.2Jα33) w połączeniu z bardzo ograniczonym zakresem kombinacji łańcuchów TCRβ (tab. 2) [26].

U myszy znaczna część komórek NKT po przejściu ścieżki rozwojowej w grasicy pozostaje w tym narządzie jako populacja limfocytów dojrzałych. Pozostała część limfocytów NKT zasiedla przede wszystkim wątrobę, tworząc tam nawet do 40% populacji limfocytów T [22]. W populacji komórek NKT zarówno w grasicy jak i wątrobie większość stanowią komórki iNKT (ponad 80%) [23]. W śledzionie, szpiku kostnym, węzłach chłonnych oraz we krwi obwodowej komórki NKT stanowią zwykle mniej niż 1% wszystkich limfocytów T [22]. Dystrybucja limfocytów NKT u ludzi jest słabiej poznana, choć wiadomo, że podobnie jak u myszy, najwię-

cej znajduje się w wątrobie, gdzie stanowią 1-10% populacji limfocytów T, przy czym w tym narządzie również większość stanowią komórki iNKT. W pozostałych narządach komórek NKT jest dużo mniej i tworzą nie więcej niż 1% populacji limfocytów T [22, 64]. Komórki iNKT tworząc najliczniejszą populację wśród komórek NKT są też najlepiej opisane w tej grupie komórek.

AKTYWACJA KOMÓREK iNKT

Komórki iNKT mogą zarówno stymulować jak i hamować odpowiedź immunologiczną, na co wywiera istotny wpływ sposób aktywacji tych komórek. Bezpośrednia aktywacja przebiega za pomocą egzogennego antygenu lipidowego lub glikolipidowego związanego z cząsteczką CD1d na powierzchni komórek APC (ryc. 1). Droga pośrednia prowadzi natomiast do aktywacji komórek NKT z udziałem agonistów receptorów TLR i cytokin produkowanych przez komórki dendrytyczne (IL-12, IL-18, IFN-α, IFN-β) po ich aktywacji z udziałem różnych ścieżek sygnalizacyjnych. Niekiedy pośrednia ścieżka aktywacji komórek NKT wymaga także prezentacji im endogennego antygenu glikolipidowego w kontekście CD1d na powierzchni komórek APC [76]. Ważnym odkryciem Brennana i współpracowników



RYCINA 1. Model bezpośredniej aktywacji komórek iNKT za pomocą egzogennego antygenu lipidowego lub glikolipidowego związanego z cząsteczką CD1d na powierzchni komórek APC
FIGURE 1. Model of the direct activation of iNKT cells exogenous lipid or glycolipid antygen bound to a CD1d molecule on the surface of APC cells

był fakt, że związanie liganda z receptorem TLR prowadzi do wzrostu produkcji β-GlcCer w komórkach APC. To prowadzi z kolei do kumulacji glikosfingolipidu i bardziej efektywnej jego prezentacji limfocytom NKT przez cząsteczkę CD1 podczas infekcji [8]. Okazało się, że prezentacja autoantygenów glikolipidowych limfocytom NKT jest niezbędna także w przypadku, gdy bakteria posiada glikolipid z wiązaniem w pozycji α [9]. Wyniki Brigla i współpracowników [9] nasunęły przypuszczenie, że istnieje kilka poziomów aktywacji limfocytów NKT. Przyłączenie liganda do receptora TLR może prowadzić do produkcji niewielkiej ilości β-GlcCer, który wiąże się do TCR komórek NKT, co w połączeniu z IL-12 wydzielaną przez komórki APC po stymulacji TLR wystarcza do produkcji IFN-γ przez zaktywowany limfocyt NKT. Natomiast związanie większej ilości β-GlcCer do TCR limfocytów NKT lub związanie obcego glikolipidu o silniejszym powinowactwie do receptora TCR NKT wywołuje silniejszą aktywację komórek NKT i produkcję szeregu cytokin, w tym IL-4 [27].

Proces aktywacji komórek iNKT *in vivo* badano na modelu mysim. Antygenem stymulującym był α-GalCer podawany drogą injekcji. Komórki iNKT ulegały aktywacji w ciągu kilku godzin, czego dowodem było pojawienie się na ich powierzchni cząsteczek CD69 i CD25 – markerów procesu aktywacji oraz produkcja szeregu cytokin, m.in. IL-2, IL-4, IFN-γ (tab. 3) [13, 56]. W zależności od rodzaju antygenu zaangażowanego w proces stymulacji komórek iNKT może przeważać inny profil wydzielanych przez nie cytokin: Th1 (IFN-γ, TNF-α), Th2 (IL-4, IL-13) lub typ mieszany [3]. Ciekawy wydaje się także fakt, że IL-4 i IFN-γ były wykrywane w komórkach iNKT już po 2 godzinach ekspozycji na α-GalCer, co mogło wynikać z konstytutywnej ekspresji mRNA dla wydzielanych cytokin [42]. Podwyższony poziom wydzielanych cytokin utrzymywał się przez kilka godzin w przypadku IL-4 i nawet do 72 godzin w przypadku IFN-γ, a następnie opadał [15, 76].

Jednocześnie po 6-18 godzinach od stymulacji cząsteczkami α-GalCer istotnemu obniżeniu ulegał poziom ekspresji TCR na powierzchni komórek iNKT, aby po 24-48 godzinach powrócić do pierwotnego stanu [76, 81]. Równolegle po 12-24 godzinach zmniejszał się także poziom ekspresji NK1.1 na powierzchni komórek iNKT i stan ten utrzymywał się nawet do 6 miesięcy [76, 81].

Badania na myszach wykazały także, że na wczesnym etapie procesu aktywacji komórki NKT gwałtownie proliferowały, co prowadziło do ekspansji tej populacji w śledzionie, a ich ilość zwiększała się 10-krotnie. Po aktywacji liczba komórek NKT wzrastała także 5-krotnie we krwi obwodowej, szpiku kostnym i węzłach chłonnych oraz 2-3-krotnie w wątrobie [15, 81]. Szczyt ekspansji limfocytów NKT przypadał na 3-4 dzień po stymulacji myszy α-GalCer, po czym liczba tych komórek spadała w czasie 6-10 dni do poziomu sprzed aktywacji wskutek apoptozy zależnej od proapoptotycznego białka Bim z rodziny białek Bcl-2 [55, 75].

TABELA 3. Profil cytokin i chemokin wydzielanych przez komórki iNKT po stymulacji za pośrednictwem receptora TCR
TABLE 3. Profile of cytokines and chemokines secreted by iNKT cells after stimulation via TCR receptor

Rodzaj i funkcja wydzielanych cytokin	Literatura
IFN-γ – główna cytokina prozapalna odpowiedzi typu Th1, wydzielana przez limfocyty T, NKT i komórki NK po stymulacji antygenem wirusowym	[13, 42, 63, 76]
IL-4 – cytokina przeciwzapalna odpowiedzi typu Th2, działa antagonistycznie do IFN-γ	[13, 42, 63, 76]
IL-2 – cytokina prozapalna, czynnik wzrostu dla limfocytów T i komórek NK	[42, 63, 76]
IL-3 – cytokina prozapalna, wpływa na proces hemopoezy w przebiegu procesu zapalnego	[76]
IL-5 – cytokina odpowiedzi typu Th2, działa synergistycznie z GM-CSF regulując dojrzewanie granulocytów kwasochłonnych i zasadochłonnych	[13, 42, 63, 76]
IL-6 – silnie pobudza procesy zapalne, uczestniczy w zwrotnym hamowaniu produkcji TNF	[42, 76]
IL-9 – cytokina odpowiedzi typu Th2, aktywuje komórki tuczne	[76]
IL-10 – czynnik hamujący wydzielanie cytokin prozapalnych	[13, 42, 63, 76]
IL-13 – cytokina odpowiedzi typu Th2, mediator stanu zapalnego związanego z reakcją alergiczną	[13, 42, 63, 76]
IL-17 – cytokina prozapalna, pobudza wydzielanie chemokin	[13, 42, 63, 76]
IL-21 – cytokina o właściwościach immunoregulacyjnych, zaangażowana w kontrolowanie reakcji alergicznych	[13, 42, 76]
TNF-α – jedna z najważniejszych cytokin prozapalnych i cytotoksycznych	[13, 42, 63, 76]
TGF-β – cytokina przeciwzapalna	[42]
GM-CSF – cytokina prozapalna, stymuluje krwiotworzenie, wzmaga cytotoksyczność komórek NK	[13, 42, 76]
Chemokiny wydzielane przez komórki NKT	
RANTES – wykazuje działanie prozapalne, aktywuje limfocyty T pamięci	[13, 42, 76]
MIP-1α – czynnik uwalniany przez makrofagi wywołujący lokalną odpowiedź zapalną	[13, 42, 76]
MIP-1β – czynnik uwalniany przez makrofagi wywołujący lokalną odpowiedź zapalną	[42]
Eotaksyna – silnie oddziałuje na granulocyty kwasochłonne, bierze udział w patogenezie alergii	[42]

Podobnie jak w przypadku innych komórek odporności wrodzonej odpowiedź wtórna iNKT na stymulację α-GalCer nie wykazywała obecności pamięci immunologicznej i była istotnie słabsza od odpowiedzi pierwotnej [76]. Dodatkowo w restymulowanych α-GalCer komórkach iNKT izolowanych z myszy po 3 dniach od pierwotnej stymulacji obserwowano zahamowanie proliferacji i produkcji cytokin, a taki stan utrzymywał się przynajmniej przez miesiąc [55]. Dalsze badania wykazały, że jest to przykład anergii immunologicznej, a istotną rolę w tym procesie odgrywają receptory PD-1(ang. P*rogrammed cell Death protein 1*) i ich ligandy PD-L1 i PD-L2. Należą one do inhibitorowych cząsteczek regulatorowych zaangażowanych w regulację odpowiedzi immunologicznej limfocytów T, a ich ekspresja wzrasta także na powierzchni aktywowanych komórek iNKT i utrzymuje się co najmniej przez miesiąc, przyczyniając się w ten sposób do powstania anergii związanej z brakiem reaktywności na podanie określonego antygenu [55, 56]. Okazało się także, że zjawisko anergii komórek iNKT skutecznie blokuje nie tylko wydzielanie cytokin, ale i proces apoptozy po aktywacji zarówno w przypadku komórek NK jak i NKT [28].

Zauważono także, że zaprezentowanie myszom α-GalCer na komórkach DC charakteryzujących się wysoką ekspresją cząsteczek kostymulujących (po wcześniejszej stymulacji in vitro) nie wywoływało zjawiska anergii w komórkach iNKT, natomiast podobna prezentacja α-GalCer na limfocytach B odznaczających się niskim poziomem ekspresji cząsteczek ko-stymulujących, prowadziła do zjawiska anergii u myszy [55]. Warto zaznaczyć, że zjawisko anergii występuje dosyć często podczas procesu aktywacji komórek iNKT. U myszy zaobserwowano je także podczas stymulacji różnymi antygenami bakteryjnymi [37], agonistami receptorów TLR [37] i sulfatydem, który jest czynnikiem stymulującym komórki vNKT [28]

Komórki iNKT charakteryzują się wysoką ekspresją granzymu B, perforyny i FasL, co świadczy o aktywności cytolitycznej tych komórek. Potwierdziły to badania in vitro, które wykazały, że komórki iNKT posiadają zdolność zabijania komórek APC prezentujących antygen w kontekście CD1d [42].

Badania na mysim modelu mięsaka wykazały, że komórki iNKT odgrywają rolę w kontrolowaniu i hamowaniu procesu nowotworowego. Aktywowane komórki iNKT produkują duże ilości IFN-γ, który aktywuje z kolei komórki NK i limfocyty cytotoksyczne CD8+, będące w rzeczywistości głównymi efektorami aktywności przeciwnowotworowej [3].

FUNKCJE KOMÓREK iNKT

W zależności od sposobu aktywacji, który może być bezpośredni lub pośredni, jak również siły sygnału oraz profilu cytokin znajdujących się w otoczeniu, komórki iNKT mogą wykazywać zarówno właściwości prozapalne, jak i przeciwzapalne.

Ponadto komórki iNKT pochodzące z różnych narządów wykazują nieco odmienne właściwości efektorowe, a więc także ich lokalizacja determinuje rodzaj odpowiedzi immunologicznej [76].

Komórki iNKT są zaangażowane w patomechanizmy różnego rodzaju infekcji, włączając infekcje wywoływane przez mikroorganizmy, które nie posiadają antygenów specyficznych dla komórek iNKT [5, 73]. W przypadku zakażeń wywołanych przez mikroorganizmy rozpoznawane przez limfocyty iNKT (*Novosphingobium, Ehrlichia, Borrelia burgdorferi)*, komórki te odgrywają rolę ochronną [76]. Zauważono jednak, że limfocyty iNKT mogą pełnić również rolę patogenną, tak jak w przypadku zakażenia *Chlamydia muridarum*, kiedy aktywacja komórek NKT zaostrza przebieg infekcji [32]. Komórki iNKT mogą przyczyniać się również do rozwoju posocznicy (sepsy), co związane jest z gwałtownym uwolnieniem szerokiego spektrum cytokin w odpowiedzi na stymulację antygenem bakteryjnym. Potwierdziły to badania wykonane na modelu mysim po inokulacji wysokim mianem bakterii *Novosphingobium* [43, 76].

Komórki iNKT regulują także proces kolonizacji błony śluzowej jelita przez mikroorganizmy komensalistyczne z jednej strony i mikroorganizmy patogenne z drugiej, wpływając w ten sposób na skład flory bakteryjnej jelita, co również wykazano w badaniach na myszach [51].

W badaniach na zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych wykazano, że komórki iNKT pełnią funkcję immunosupresyjną. Wyniki takie uzyskano u myszy typu NOD (eksperymentalny model cukrzycy typu I), w przebiegu autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego u myszy C57BL/6 (eksperymentalny model stwardnienia rozsianego), w modelu tocznia rumieniowatego układowego oraz reumatoidalnego zapalenia stawów [20, 76]. Z drugiej strony, istnieją takie modele chorób autoimmunologicznych, w których zaobserwowano patogenną rolę komórek iNKT, np. w indukowanym kolagenem zapaleniu stawów aktywowane limfocyty iNKT zaostrzają przebieg choroby produkując duże ilości IL-4 i IFN-γ. Cytokiny te hamują z kolei produkcję TGF-β1, czynnika supresorowego dla patogennych komórek Th1. Obniżony poziom tego czynnika wzmacnia zatem proces zapalny [12].

Wykazano również, że komórki iNKT pełnią funkcję ochronną podczas przeszczepów szpiku kostnego chroniąc biorcę przed rozwojem choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft-versus-host disease*) [61].

Właściwości prozapalne komórek iNKT zauważono z kolei w modelach niektórych chorób o podłożu zapalnym, takich jak astma, ostre i przewlekłe zapalenie wątroby, zapalenie okrężnicy, a także w doświadczalnej miażdżycy [77]. We wszystkich przypadkach cytokiny produkowane przez komórki iNKT aktywują inne rodzaje komórek układu immunologicznego uczestnicząc w patogenezie tych chorób [76].

Właściwości prozapalne limfocytów iNKT, a zwłaszcza ich zdolność do produkcji IFN-γ oraz aktywacji komórek NK i limfocytów T CD8 odgrywają istotną rolę w walce z nowotworami, co wykazano na eksperymentalnych modelach czerniaka, białaczki, chłoniaka, grasiczaka, raka płuc [69].

FUNKCJE KOMÓREK vNKT

Populacja limfocytów vNKT nie została jeszcze tak dobrze opisana jak populacja limfocytów iNKT, ale wydaje się, że pełni ona, podobnie jak komórki iNKT, istotną funkcję ochronną w chorobach o podłożu autoimmunologicznym. Potwierdziły to badania na modelach zwierzęcych cukrzycy typu I [16], autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (eksperymentalny model stwardnienia rozsianego) [30] i autoimmunologicznego zapalenia wątroby [28]. Zauważono, że w mysim modelu stwardnienia rozsianego ilość komórek vNKT w tkance nerwowej zwiększyła się kilkukrotnie w przeciwieństwie do komórek iNKT [30]. U pacjentów cierpiących na stwardnienie rozsiane i autoimmunologiczne zapalenie wątroby stwierdzono natomiast dużą ilość przeciwciał skierowanych przeciw sulfatydowi odpowiednio w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy krwi [3]. Aktywowane sulfatydem (endogennym glikolipidem) komórki vNKT mogą zostać wówczas zaangażowane w ochronę przed rozwojem autoagresji poprzez regulację funkcji efektorowych komórek iNKT za pośrednictwem komórek dendrytycznych [28]. W modelu zapalenia wątroby u myszy wykazano, że aktywacja komórek vNKT za pomocą sulfatydu może prowadzić do anergii komórek iNKT za pośrednictwem IL-12 produkowanej przez zaktywowane komórki dendrytyczne. Anergiczne komórki iNKT nie są wówczas w stanie efektywnie rekrutować do wątroby granulocytów obojętnochłonnych – ważnych mediatorów stanu zapalnego. Pełnią funkcję regulatorowych komórek T, co w rezultacie prowadzi do blokowania odpowiedzi immunologicznej i ochrony przed reakcją autoimmunologiczną [3, 28].

W przypadku odporności przeciwnowotworowej komórki iNKT i vNKT zachowują się w sposób przeciwstawny. Komórki iNKT pełnią funkcję przeciwnowotworową, natomiast komórki vNKT znoszą nadzór immunologiczny nad wzrostem nowotworu. Wykazano to na modelu mysim zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Jednoczesna stymulacja komórek iNKT i vNKT wykazała, że komórki vNKT hamują aktywację iNKT *in vitro* i znoszą efekt ochronny tych komórek *in vivo*. W przypadku nieobecności komórek iNKT efekt immunosupresyjny komórek vNKT nasila się, wskazując na fakt, że obecność komórek iNKT hamuje funkcję immunosupresyjną vNKT [1]. Komórki vNKT zaangażowane są więc w zjawisko negatywnej immunoregulacji, która stanowi problem w immunoterapii nowotworów [1]. Zjawisko immunosupresji w odporności przeciwnowotworowej związane

z populacją komórek vNKT wynika także z podwyższonej produkcji cytokin przeciwzapalnych (IL-13 i TGF-β) przez te komórki, co wykazano na mysim modelu chłoniaka B-komórkowego [62]. Natomiast już wcześniej wykazano, że TGF-β blokuje sprawowany przez limfocyty T cytotoksyczne nadzór immunologiczny nad wzrostem nowotworów i jest to zjawisko zależne od obecności komórek NKT [70]. Chang i współpracownicy zauważyli także podwyższony poziom komórek vNKT rozpoznających LPC (lizofosfatydylocholinę) i wydzielających IL-13 w krwi pacjentów chorych na szpiczaka [10]. Podobnie u pacjentów cierpiących na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*colitis ulcerosa)* stwierdzono podwyższony poziom komórek vNKT produkujących intensywnie IL-13 w blaszce właściwej błony śluzowej jelita [19].

ROLA KOMÓREK NKT W CHOROBACH AUTOIMMUNOLOGICZNYCH

Wyniki badań prowadzonych na gryzoniach wskazują, że komórki iNKT są kluczowymi regulatorami odpowiedzi immunologicznej w chorobach o podłożu autoimmunologicznym. Jednak nadal niewiele wiadomo o roli, jaką pełnią w podobnych chorobach u człowieka.

U pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) zaobserwowano istotnie niższą liczbę komórek iNKT w krwi obwodowej w porównaniu z osobami zdrowymi. Jednocześnie komórki te cechował obniżony potencjał proliferacyjny w odpowiedzi na stymulację α-GalCer, a liczba komórek iNKT odwrotnie korelowała z markerem zapalenia układowego, białkiem C-reaktywnym [58, 72]. Wykazano także, że niezmieniona liczba komórek iNKT w krwi obwodowej u pacjentów skarżących się na bóle stawów może wskazywać na brak zapalnego podłoża tych dolegliwości. Komórki iNKT mogą zatem odgrywać rolę w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów i stanowić dodatkowy biomarker przydatny w diagnostyce tej choroby [72].

Cukrzyca typu 1 jest schorzeniem o podłożu autoimmunologicznym, w którym dochodzi do selektywnego niszczenia produkujących insulinę komórek β wysp trzustki przez limfocyty T oraz inne komórki układu immunologicznego [33, 40, 53]. Badania na mysim modelu cukrzycy typu I (myszy NOD) wykazały, że u tych zwierząt obserwuje się zredukowaną o 30% liczbę komórek iNKT w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Ponadto komórki iNKT pochodzące od myszy NOD wykazywały osłabioną funkcję produkując niewielką ilość IL-4 po stymulacji receptora TCR oraz niewielką ilość IFN-γ po stymulacji za pomocą IL-12 [52]. Wzrost liczby komórek iNKT w wyniku transferu od zdrowych myszy (ang. *adoptive transfer*) lub po transgenezie znacząco obniżał występowanie przypadków cukrzycy typu 1 u myszy NOD. Podobny efekt ochronny był obserwowany po specyficznej stymula-

cji komórek iNKT egzogennym ligandem α-GalCer [40, 53]. Początkowo sądzono, że ochronny wpływ wywierany przez komórki iNKT związany był z indukcją odpowiedzi typu Th2, skierowanej przeciwko autoantygenom wysp trzustkowych. Jednak dalsze badania wykazały, że iNKT hamują różnicowanie limfocytów T w kierunku komórek efektorowych podczas ich dojrzewania (ang. *priming*) w trzustkowych węzłach chłonnych, wprowadzając je w stan anergii, dzięki czemu nie są w stanie niszczyć komórek β [4]. Biorąc pod uwagę podobieństwa w patogenezie cukrzycy typu I u ludzi i u myszy, próbowano także przenieść na ludzi zależność pomiędzy chorobą, a liczbą i stanem funkcjonalnym komórek iNKT. Jednak wyniki badań nie dały jak dotąd jednoznacznej odpowiedzi [40, 53].

Według ostatnich doniesień komórki vNKT także pełnią rolę ochronną w mysim modelu cukrzycy typu I (myszy NOD). Kadri i współpracownicy wykazali, że komórki CD4+ 24αβ NKT typu II (vNKT) hamują aktywność diabetogennych limfocytów T w myszach typu NOD [33]. Komórki te charakteryzuje niska ekspresja cząsteczek typowych dla komórek NK (Dx5/CD49b, Ly49G2, CD122), fenotyp charakterystyczny dla komórek poddanych wcześniejszej aktywacji (CD62L, CD45RB, $CD44^{hi}$, $CD69^{+}$), wysoka ekspresja cząsteczki CD95 i ICOS (ang. *Inducible T-cell COStimulator*) oraz wyższa produkcja cytokin Th1 (TNF-α, IFN-γ, IL-2) po aktywacji. Wykazano także, że funkcja regulatorowa komórek vNKT związana jest ze ścieżką ICOS/ICOS-L i PD-1/PD-1L (ang. *Programmed cell Death protein 1*). Zablokowanie jednej z tych ścieżek prowadziło do zniesienia mechanizmów regulatorowych komórek CD4+ 24αβ NKT typu II opartych głównie na zjawisku immunosupresji [33].

Natomiast w autoimmunologicznych chorobach wątroby komórki NKT wydają się pełnić głównie rolę prozapalną, co wykazano w doświadczeniach na zwierzęcym modelu autoimmunologicznego uszkodzenia wątroby (ang. A*utoimmune Hepatitis,* AIH) [64, 71]. W modelu AIH zapalenie wątroby jest indukowane po dożylnym podaniu konkanawaliny A, a proces imituje zapalenie wątroby zależne od komórek T. Stan zapalny przejawia się podwyższoną ekspresją FasL na powierzchni komórek NKT, które produkują IFN-γ i TNF-α. Prowadzi to do apoptozy hepatocytów, przy jednoczesnej aktywacji komórek T CD4+, które infiltrują wątrobę. W efekcie dochodzi do gwałtownego i ciężkiego uszkodzenia wątroby. Natomiast w przypadku braku komórek NKT, zarówno u myszy CD1d-/-, jak i TCR-Jα28-/-, nie dochodzi do rozwoju zapalenia wątroby indukowanego konkanawaliną A [71].

Podobne zjawisko zaobserwowano u pacjentów cierpiących na pierwotną marskość żółciową wątroby (ang. *Primary Biliary Cirrhosis*, PBC). W początkowym stadium PBC dochodzi do podwyższenia ekspresji CD1d na powierzchni komórek tworzących ścianę kanalików Heringa i komórek nabłonkowych małych przewodów żółciowych. Związane jest to z kumulacją komórek NKT w tej lokalizacji, czego nie obserwuje się u osób zdrowych [74]. Badania na mysim modelu PBC, w którym myszy stymulowano *in vivo* α-GalCer wykazały nasiloną odpowiedź

prozapalną i wzmożony napływ limfocytów T do przestrzeni bramno-żółciowych (wrotnych), połączony z silnym procesem niszczenia przewodów żółciowych. Natomiast u myszy Cd1d-/- w tym modelu obserwowano zmniejszony napływ limfocytów T do wątroby, któremu towarzyszył także mniejszy stopień uszkodzenia przewodów żółciowych [64].

Regulacyjna rola komórek NKT w przypadku schorzeń o podłożu autoimmunologicznym polega na rekrutacji i aktywacji kilku innych typów komórek immunoregulacyjnych, do których należą komórki Treg oraz niedojrzałe monocyty lub komórki supresorowe linii mieloidalnej [29, 50, 82]. Limfocyty Treg pełnią kluczową rolę w regulacji nadmiernej lub niekontrolowanej odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom własnym i obcym [64]. Niedojrzałe komórki mieloidalne, czyli komórki supresorowe wywodzące się z linii mieloidalnej (ang. *Myeloid Derived Suppresor Cells,* MDSCs) lub niedojrzałe monocyty, są heterogenną grupą komórek hematopoetycznych złożoną z prekursorów makrofagów, granulocytów oraz komórek dendrytycznych. Jest to grupa komórek zróżnicowana fenotypowo, ale identyfikowana dzięki wspólnej biologicznej roli polegającej na supresji proliferacji komórek T [21, 64].

Komórki NKT mogą regulować aktywację limfocytów Treg w sposób bezpośredni i pośredni. Regulacja bezpośrednia zależna jest od IL-2, pośrednia zaś związana jest z sekrecją dużych ilości cytokin, takich jak IFN-γ i IL-10 [64]. Mechanizm wzajemnego oddziaływania pomiędzy komórkami NKT i Treg został wyjaśniony stosunkowo niedawno przez Santodomingo-Garzon i współpracowników [63], chociaż zmiany ilościowe obejmujące obie populacje komórek u pacjentów cierpiących na PBC i AIH związane prawdopodobnie z patogenezą tych chorób udokumentowano już wcześniej [39, 83]. Prace Santodomingo-Garzon wykazały, że aktywowane wątrobowe komórki NKT kierują migracją komórek Treg do wątroby, które pełnią tam istotną rolę w powstawaniu i kontrolowaniu stanu zapalnego [63]. Komórki NKT po aktywacji za pomocą α-GalCer, zaczynają wydzielać IFN-γ, co prowadzi do podwyższenia ekspresji chemokiny CXCL10 na komórkach Kupffera, nabłonkowych komórkach przewodów żółciowych oraz hepatocytach. Limfocyty Treg wykazują natomiast ekspresję cząsteczki CXCR3, która jest receptorem dla CXCL10, co może stanowić podstawę mechanizmu rekrutacji komórek Treg do wątroby. Zarówno u myszy pozbawionych CD1d i IFN-γ, jak i po neutralizacji cząsteczki CXCL10 nie zaobserwowano kumulacji komórek Treg w wątrobie. [63].

Rola komórek MDSCs w schorzeniach autoimmunologicznych jest dużo słabiej poznana. Wiadomo, że w miejscu reakcji zapalnej tych komórek jest więcej i są one zdolne do hamowania proliferacji komórek T pomocniczych i cytotoksycznych poprzez indukcję apoptozy [36, 41]. Cząsteczka CD1d ulega konstytutywnej ekspresji na powierzchni komórek MDSCs, co umożliwia im oddziaływanie z komórkami NKT [29, 64]. Do tej pory nie badano jednak oddziaływań pomiędzy komórkami

MDSCs i NKT w zapaleniu wątroby. W mysim modelu ostrego uszkodzenia wątroby wykazano jedynie napływ niedojrzałych monocytów do tego narządu, jednak potencjalna rola supresyjna tych komórek nie była badana [34]. Wstępne doświadczenia prowadzone przez Santodomingo-Garzon wskazują, że aktywowane wątrobowe komórki NKT intensywnie rekrutują komórki MDSCs do wątroby, które hamują tam swoistą odpowiedź immunologiczną, między innymi poprzez hamowanie proliferacji komórek T CD4+ [64].

Aktywowane komórki NKT mogą wydzielać także prozapalną IL-17, która według ostatnich doniesień w narządowych chorobach autoimmunologicznych, takich jak RZS odgrywa nawet większą rolę niż IFN-γ wydzielany przez komórki Th1 [64]. Wstępne badania potwierdziły także jej prozapalną rolę w chorobach autoimmunologicznych wątroby i cukrzycy typu I [39, 59].

KOMÓRKI NKT W ODPOWIEDZI PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Badania nad rolą komórek NKT w odpowiedzi przeciwnowotworowej prowadzone były zarówno na modelu mysim, liniach komórkowych jak i materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów. Na mysim modelu czerniaka wykazano, że mechanizm aktywujący komórki NKT do silnej i długotrwałej swoistej odpowiedzi immunologicznej związany jest z krzyżową prezentacją przez komórki dendrytyczne glikolipidowego antygenu pochodzącego z komórek nowotworowych wcześniej opłaszczonych α-galaktozyloceramidem (α-GalCer). Tak więc początkowo niewidoczne dla układu immunologicznego komórki nowotworowe stawały się immunogenne w wyniku prezentacji krzyżowej antygenów glikolipidowych limfocytom NKT, co z kolei prowadziło do dojrzewania komórek dendrytycznych i indukowania długotrwałej odpowiedzi swoistej związanej z aktywnością komórek CD4+ i CD8+, dzięki której zwierzęta stawały się odporne na podawane podskórnie komórki nowotworowe i nie wykształcały guzów, a odporność utrzymywała się przez okres 6-12 miesięcy [66].

Na mysim modelu mięsaka wykazano z kolei, że komórki NKT mogą być zaangażowane w proces niszczenia nowotworu także bez egzogennej stymulacji. Zauważono, że mięsak rozwijał się szybciej u myszy pozbawionych komórek NKT, a zahamowanie jego rozwoju następowało po przeszczepie oczyszczonych komórek NKT pochodzących od zdrowych myszy typu dzikiego [22]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku mysiego modelu raka prostaty TRAMP (ang. *Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*). Większość myszy pozbawionych komórek iNKT wykazywała rozwój nowotworu, natomiast u 85% myszy, które posiadały komórki iNKT nowotwór nie rozwijał się [6].

Komórki NKT mogą wykazywać także działanie przeciwstawne, tzn. hamować regresję guza działając supresyjnie na przeciwnowotworowe limfocyty CD8+ w sposób zależny lub niezależny od IL-13, co wykazano na myszach pozbawionych genu STAT6, który koduje czynnik transkrypcyjny zaangażowany w ścieżkę sygnałową IL-13 [54].

Niektóre komórki nowotworowe posiadają na swojej powierzchni zarówno cząsteczki CD1d, jak i różnego typu epitopy glikolipidowe, które mogą być prezentowane limfocytom T podlegającym restrykcji CD1 [78]. Dotyczy to zwłaszcza komórek nowotworowych wywodzących się z linii komórek hematopoetycznych, raka prostaty i niektórych nowotworów neurologicznych [17]. Komórki nowotworowe mogą wówczas prezentować na swojej powierzchni endogenne antygeny glikolipidowe komórkom NKT, które po aktywacji zaczynają wydzielać IFN-γ i doprowadzają do lizy komórek nowotworowych z udziałem głównych efektorów aktywności przeciwnowotworowej: komórek NK i limfocytów cytotoksycznych CD8+ [3, 66]. W większości przypadków guzów litych komórki nowotworowe są jednak CD1d-ujemne (CD1d-) i nie mogą być bezpośrednim celem aktywności cytotoksycznej limfocytów iNKT [79].

Badania nad ekspresją genów zaangażowanych w proces nowotworowy w komórkach ludzkiej białaczki limfocytarnej wykonane metodą mikromacierzy wykazały z kolei, że ekspresja mRNA dla cząsteczek CD1c i CD1d ulegała wyraźnemu obniżeniu w procesie transformacji nowotworowej wskazując wyraźnie na zaangażowanie cząsteczki CD1 w proces obrony przeciwnotworowej [78].

W badaniach na mysim modelu nerwiaka wykazano natomiast, że pomimo braku ekspresji cząsteczki CD1d na komórkach guza, znajdowała się ona na powierzchni monocytów/makrofagów towarzyszących guzowi (ang. *Tumor Associated Monocytes/Macrophages,* TAM). [67]. Makrofagi TAM stanowią główne źródło IL-6, która stymuluje wzrost nerwiaka zarówno u myszy jak i człowieka [2]. Zaobserwowano również, że ekspresja markerów monocytarnych charakterystycznych dla komórek TAM (CD14, CD16, IL-6, IL-6R) odwrotnie korelowala z długotrwałym przeżywaniem bez objawów chorobowych pacjentów z nerwiakiem niezależnym od amplifikacji genu *MYCN* w stadium 4 choroby [67]. Makrofagi TAM prezentują krzyżowo limfocytom NKT glikolipidowe antygeny pochodzenia nowotworowego, dzięki czemu mogą być specyficznie przez te komórki rozpoznawane i zabijane w sposób zależny od obecności cząsteczki CD1d. Ogranicza to wzrost guza i wyjaśnia zależność pomiędzy infiltracją guza przez komórki NKT i dobrą prognozą w przypadku nerwiaka [44].

Komórki iNKT biorą również udział w aktywacji limfocytów Vγ9Vδ2-T, głównej subpopulacji limfocytów T γδ. W ludzkiej krwi obwodowej stanowią około 5% komórek PBMC. Jest to frakcja prozapalnych limfocytów wykazujących aktywność przeciwnowotworową. Komórki Vγ9Vδ2-T po aktywacji są zdolne do zabijania komórek guzów litych różnego pochodzenia, w tym raka płaskonabłonkowego głowy i szyi,

czerniaka, raka okrężnicy i raka piersi [7, 14]. Badania prowadzone nad tą specyficzną populacją limfocytów T wykazały, że zaktywowane za pomocą α-GalCer komórki iNKT pobudzają przeciwnowotworową funkcję komórek Vγ9Vδ2-T poprzez produkcję TNF-α. Aktywacja komórek iNKT zależna od komórek dendrytycznych prezentujących α-GalCer wpływa również na istotny wzrost ekspresji cząsteczki CD107a na komórkach Vγ9Vδ2-T, co związane jest ze zdolnością tych komórek do degranulacji. Proces jest zależny od TNF-α produkowanego przez zaktywowane komórki iNKT i nie obserwowano go po neutralizacji tej cytokiny [65]. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że zastosowanie łączonych ligandów aktywujących zarówno limfocyty iNKT, jak i komórki Vγ9Vδ2-T, może stanowić podstawę immunoterapii przeciwnowotworowej, wykorzystującej efekt wzmocnienia cytotoksycznych właściwości limfocytów Vγ9Vδ2-T [65].

Badania nad zastosowaniem komórek NKT w immunoterapii przeciwnowotworowej wkroczyły obecnie w fazę badań klinicznych. W badaniach obejmujących grupę pacjentów cierpiących na raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma,* HNSCC) wykazano, że niski odsetek komórek iNKT krążących we krwi obwodowej oznaczany przed rozpoczęciem radioterapii korelował w istotny sposób z częstością nawrotów nowotworu i niską przeżywalnością [47]. Pacjenci ze znacząco obniżoną w porównaniu z grupą kontrolną liczbą komórek iNKT w krwi obwodowej bardzo słabo odpowiadali na stosowaną u nich radioterapię [47]. Wydaje się, że odtworzenie populacji limfocytów iNKT u tych pacjentów, poprzez namnożenie komórek *ex vivo*, mogłoby stanowić rodzaj immunoterapii adjuwantowej w przypadku HNSCC. Określenie ilości komórek iNKT w krwi obwodowej tych pacjentów może dostarczyć także łatwo dostępnego kryterium prognostycznego oraz wskazać grupę pacjentów kwalifikujących się do immunoterapii [47].

W przypadku nie-drobnokomórkowego raka płuc prowadzone są prace nad stymulacją komórek iNKT za pomocą syntetycznego antygenu α-GalCer prezentowanego na komórkach APC. Jest to I-II faza badań klinicznych, w których wstępnie stwierdzono, że dożylne podanie pacjentom jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) hodowanych najpierw w obecności IL-2 oraz GM-CSF, a następnie poddanych stymulacji α-GalCer było dobrze przez nich tolerowane. Zaobserwowano indukcję odpowiedzi immunologicznej zależnej od komórek iNKT. Zwiększona liczba komórek produkujących IFN-γ, związana ze stymulacją komórek PBMC antygenem α-GalCer, istotnie korelowała z wydłużonym średnim czasem przeżycia [48]. Jedno z najnowszych doniesień Nagato i współpracowników dotyczące terapii pacjentów z rakiem płuc pokazuje, że przedoperacyjne dożylne podawanie chorym komórek APC stymulowanych przedtem α-GalCer, wpływa na znamienny wzrost liczby komórek iNKT wśród limfocytów infiltrujących nowotwór (*ang. Tumor Infiltrating Lymphocytes,* TIL) oraz wzmożoną produkcję IFN-γ przez komórki TIL stymulowane α-GalCer. Stymulacja prowadzi do aktywacji komórek iNKT i ich napływu do mikrośrodowiska nowotworu [49].

KOMÓRKI NKT W PROCESIE STARZENIA

Niewiele jak dotąd wiadomo na temat wpływu procesu starzenia na populację komórek iNKT u ludzi. Badania Jinga i współpracowników wykazały znaczący spadek liczby limfocytów iNKT w krwi obwodowej zdrowych osób starszych w porównaniu z grupą kontrolną osób młodych [31]. Spadek liczby komórek iNKT nie był jednak spowodowany zachodzącymi z wiekiem zmianami w liczebności i składzie populacji i subpopulacji limfocytów T. Nie zaobserwowano także znaczących różnic związanych z płcią badanych osób. Zauważono natomiast zależne od wieku zmiany w składzie populacji komórek iNKT: z wiekiem widoczny był wzrost liczby limfocytów CD4+ iNKT, spadała natomiast liczba komórek CD4/CD8 DN -iNKT (ang. *double negative*). Przyczyną może być obniżenie zdolności proliferacyjnej komórek iNKT w procesie starzenia, na co wskazują wyniki doświadczeń przeprowadzone *in vitro* na komórkach PBMC izolowanych z krwi obwodowej seniorów i osób młodych, które stymulowane były następnie α-GalCer [31]. Aktywowane komórki CD4+ iNKT produkują IL-4 i inne cytokiny odpowiedzi Th2 o charakterze przeciwzapalnym, natomiast komórki CD4/CD8 DN-iNKT po aktywacji wydzielają głównie cytokiny odpowiedzi Th1 o charakterze prozapalnym. Stąd w procesie starzenia obserwuje się przesunięcie profilu wydzielanych cytokin w kierunku względnej przewagi cytokin odpowiedzi Th2 [18, 35]. Towarzyszące procesowi starzenia widoczne przesunięcie w profilu cytokin może stanowić jeden z mechanizmów kompensujących obserwowany spadek całkowitej liczby komórek iNKT u seniorów [31].

U myszy większość komórek NKT pozostaje w grasicy jako populacja limfocytów dojrzałych, natomiast pozostała część zasiedla przede wszystkim wątrobę [22]. Ponieważ w procesie starzenia grasica ulega atrofii, coraz większą rolę zaczynają odgrywać komórki NKT znajdujące się poza grasicą, przede wszystkim w wątrobie. Zarówno w grasicy jak i wątrobie większość stanowią komórki iNKT (ponad 80%) [23], stąd badania nad procesem starzenia dotyczą głównie tej populacji NKT. Liczba komórek iNKT w wątrobie zmniejsza się wraz z wiekiem zarówno u ludzi, jak i u myszy. Osłabieniu ulega również cytotoksyczność limfocytów iNKT oraz zdolność do produkcji cytokin [45]. Komórki iNKT po stymulacji IL-12 charakteryzuje wzrost cytotoksyczności i produkcji cytokin zarówno odpowiedzi Th1 (IFN-γ) jak i Th2 (IL-4). Badania na modelu mysim wykazały jednak, że u starych myszy komórki iNKT posiadające receptor TCRαβ charakteryzują się obniżoną cytotoksycznością i osłabioną produkcją IFN-γ zarówno bez jak i po stymulacji IL-12. Podobne zjawisko zaobserwowano także u ludzi [46]. Spadek produkcji IFN-γ wpływał także na osłabienie zdolności do aktywacji komórek NK przez komórki NKT, co przejawiało się obniżoną cytotoksycznością komórek NK [45].

Współdziałanie komórek NK i NKT staje się istotne zwłaszcza w warunkach słabej indukcji cytokin odpowiedzi nieswoistej (np. IL-12, IFN-α/β) podczas infekcji bakteryjnej lub wirusowej [46]. Limfocyty NKT należą do ważnych komórek efektorowych mechanizmów obronnych organizmu, a utrata tej funkcji związana z procesem starzenia powoduje osłabienie odpowiedzi immunologicznej zarówno nieswoistej jak i swoistej, co w rezultacie może prowadzić do rozwoju chorób związanych z wiekiem [45]. Okazało się jednak, że stulatkowie posiadają porównywalną z młodszymi osobami liczbę komórek iNKT TCRαβ, a komórki te charakteryzuje dobrze zachowana aktywność cytotoksyczna oraz zdolność do produkcji IFN-γ. Podobną zależność zaobserwowano u bardzo starych myszy [45].

Komórki NKT posiadające na powierzchni receptor TCRγδ odgrywają także istotną rolę w procesie modelowania odpowiedzi immunologicznej zarówno swoistej jak i nieswoistej w procesie starzenia [45]. Zasiedlają głównie wątrobę i stanowią tylko 2-4% całej populacji NKT. Wykazano, że ich aktywność ulega osłabieniu z wiekiem, natomiast jest dobrze zachowana u stulatków, o czym świadczy obecność na powierzchni cząsteczki aktywującej CD69 oraz ich odporność na apoptozę indukowaną ligandem Fas [11]. Potwierdzają to badania nad komórkami NKT pochodzącymi od starych myszy. Zaobserwowano tam również spadek liczebności populacji komórek NKT γδ w wątrobie, ich osłabioną cytotoksyczność oraz obniżoną produkcję IFN-γ. Wszystkie te funkcje były natomiast dobrze zachowane, a nawet lepiej rozwinięte u bardzo starych zwierząt. Komórki NKT, a zwłaszcza NKT γδ wydają się zatem odgrywać istotną rolę w procesie „zdrowego" starzenia (ang. *healthy ageing*, *succesful ageing*) [46].

Mechanizm zaangażowany w modelowanie funkcji komórek NKT w bardzo podeszłym wieku może być także ściśle związany z biodostępnością jonów cynku, zależną od homeostazy metalotionein [45]. Podobna zależność występuje również w przypadku komórek NK, ponieważ zarówno w komórkach NK jak i NKT cynk wydaje się być niezbędny dla zachowania cytotoksyczności i produkcji IFN-γ na odpowiednim poziomie podczas procesu starzenia [46].

PODSUMOWANIE

Komórki NKT to grupa limfocytów „konserwowanych ewolucyjnie" o określonej, niezmiennej budowie łańcucha α TCR i bardzo ograniczonej liczbie kombinacji łańcucha β TCR, które pod względem rozpoznawania antygenów przypominają receptory PRR (ang. *Pattern-Recognition Receptors*) odporności wrodzonej. Limfocyty NKT rozpoznają tylko pewną grupę antygenów lipidowych i glikolipidowych prezentowanych przez cząsteczkę CD1d. Funkcjonalnie przypominają komórki odpor-

ności wrodzonej, ponieważ po aktywacji wykazują zdolność do wywołania szybkiej odpowiedzi efektorowej i prawie natychmiastowej produkcji cytokin dzięki konstytutywnej ekspresji mRNA cytokin. Wykazują także wysoki poziom ekspresji granzymu B, perforyny i FasL, co świadczy o ich funkcji cytolitycznej. Komórki NKT regulują aktywność szeregu innych komórek układu immunologicznego takich jak komórki NK, limfocyty T pomocnicze i cytotoksyczne, makrofagi, limfocyty B, granulocyty kwasochłonne i obojętnochłonne, komórki dendrytyczne, limfocyty Treg, Tγδ [42]. Oddziaływania komórek NKT z innymi komórkami układu odpornościowego odbywają się na drodze bezpośrednich kontaktów z udziałem receptorów CD40-CD40L, OX40-OX40L oraz za pośrednictwem wydzielanych cytokin. Komórki NKT pełnią zatem ważną funkcję regulatorową i immunomodulacyjną [53]. Podobnie jak w przypadku innych komórek odporności wrodzonej wtórna odpowiedź na stymulację antygenem nie wykazuje cech charakterystycznych dla obecności zjawiska pamięci immunologicznej i jest wyraźnie słabsza od odpowiedzi pierwotnej [76].

Rola limfocytów NKT nie została prawdopodobnie jeszcze do końca wyjaśniona, bo dopiero niedawno wykryto glikosfingolipid (β-GlcCer), który spełnia funkcję antygenu endogennego dla tych komórek. Jego poziom wzrasta w czasie infekcji, co prowadzi do aktywacji komórek iNKT. Niedawno wykazano, że mechanizm aktywacji komórek NKT związany jest ściśle z receptorami TLR, które są błonowymi receptorami należącymi do PRR (ang. *Pattern-Recognition Receptors*) [8]. Rozpoznają tzw. wzorce molekularne, czyli specyficzne struktury molekularne będące komponentami patogennych mikroorganizmów, które nie występują u kręgowców i odgrywają istotną rolę w odporności wrodzonej. Komórki iNKT uznawane są za istotne ogniwo łączące odporność wrodzoną z odpornością nabytą, ponieważ rozpoznają tylko specyficzne, określone struktury (obce lub własne glikolipidy) z udziałem receptorów TCR (o ograniczonej zmienności), stanowiących narzędzie charakterystyczne dla odporności nabytej. Określane są jako limfocyty odporności wrodzonej (ang. *innate lymphocytes*) [8] i stanowią element łączący odporność nieswoistą i swoistą (ang. *bridging innate and adaptive immunity*) [76].

Komórki NKT rozpoznają grupę specyficznych antygenów lipidowych i glikolipidowych, pomijanych przez konwencjonalne limfocyty T. Mogą także ulegać aktywacji bez udziału obcego antygenu glikolipidowego poprzez zwiększenie ekspresji własnych autoantygenów (β-GlcCer) po związaniu antygenu bakteryjnego z receptorem TLR. Znamienny jest także fakt, że procesom starzenia, nowotworzenia i autoagresji towarzyszy spadek liczebności populacji komórek NKT. Odkrycie endogennego antygenu (β-GlcCer) dla tych ważnych limfocytów odporności wrodzonej wskazuje na konieczność dalszych badań, które wyjaśniłyby rolę β-GlcCer w patogenezie chorób autoimmunologicznych i nowotworowych, także pod kątem immunoterapii z zastosowaniem tego glikosfingolipidu [27].

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, projekt N N404 597640

LITERATURA

[1] Ambrosino E, Terabe M, Halder RC, Peng J, Takaku S, Miyake S, Yamamura T, Kumar V, Berzofsky JA. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulationg tumor immunity: A new immunoregulatory axis. J Immunol 2007; **179**: 5126-5136.

[2] Ara T, Song L, Shimada H, Keshelava N, Russell HV, Metelitsa LS, Groshen SG, Seeger RC, Declerck YA. Interleukin-6 in the Bone Marrow Microenvironment Promotes the Growth and Survival of Neuroblastoma Cells. Cancer Res 2009; **69**: 329-337.

[3] Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct Natural Killer T cells subsets Influences Immune Response to self and foreign antigens. J. Cell. Physiol. 2009; **218**: 246-250.

[4] Beaudoin L, Laloux V, Novak J, Lucas B, Lehuen A. NKT cel1s inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. Immunity 2002; **17**: 725-736.

[5] Behar SM, Porcelli SA. CD1-restricted T cells in host defense to infectious diseases. Curr Top Microbiol Immunol 2007; 314:215-250.

[6] Bellone M, Ceccon M, Grioni M, Jachetti E, Calcinotto A, Napolitano A, Freschi M, Casorati G, Dellabona P. iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells. PLoS ONE 2010; **5**: e8646.

[7] Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. Curr Opin Immunol 2006; **18**: 539-546.

[8] Brennan PJ, Tatituri RVV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, Gadola SD, Hsu F-F, Besra GS, Brenner MB. Invariant natural killer T cells recognize lipid self-antigen induced by microbial danger signals. Nat Immunol 2011; **12**: 1202-1211.

[9] Brigl M, Tatituri RVV,Watts GFM, Bhowruth V, Leadbetter EA, Barton N, Cohen NR, Hsu F-F, Besra GS, Brenner MB. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. J. Exp. Med. 2011; **208**: 1163-1177.

[10] Chang DH, Deng H, Matthews P, Krasovsky J, Ragupathi G, Spisek R, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for Cd1d-restricted T cells in human cancer. Blood 2008; **112**: 1308-1316.

[11] Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. Exp Gerontol 2002; **37**: 205-211.

[12] Coppieters K, Dewint P, Van Benden K, Jacques P, Seeuws S, Verbruggen G, Deforce D, Elewaut D. NKT cells: manipulable managers of joint inflammation. Rheumatology 2007; **46**: 565-571.

[13] Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, Mcnab Fw, Pitt La, Mckenzie Bs, Berzins Sp, Smyth Mj, Godfrey Di. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing $CD4^{-}NK1.1^{-}$ NKT cell population. Proc Natl Acad Sci 2008; **105**: 11287-11292.

[14] Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennuona J, Mosnier JF, Scotet E, Bonneville M, Jotereau F. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. J Immunol 2005; **175**: 5481-5488.

[15] Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Hammond KJL, Hayakawa Y, Sidobre S, Keating R, Kronenberg M, Smyth MJ, Godfrey DI. Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. J. Immunol 2003; **171**: 4020-4027.

[16] Duarte N, Stenström M, Campino S, Bergman M-L, Lundholm M, Holmberg D, Cardell SL. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells. J. Immunol 2004; **173**: 3112-3118.

[17] Exleyma, Lynch L, Varghese B, Nowak M, Alatrakchi N, Balk SP. Developing understanding of the roles of CD1d-restricted T cell subsets in cancer: reversing tumor-induced defects. Clinical Immunology 2011; **140**: 184-195.

[18] Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scruti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. Mech Ageing Dev 2007; **128**: 92-105.

[19] Fuss IJ, Strober W. The role of IL-13 and NKT cells in experimental and human ulcerative colitis. Mucosal Immunol 2008; **Suppl 1**: S31-33.

[20] Gabriel CL, Wu L, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cell-based therapy of autoimmune diseases. Curr Immunol Rev 2010; **6**: 88-101.

[21] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 2009; **9**: 162-174.

[22] Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. The Journal of Clinical Investigation. 2004; **114**: 1379-1388.

[23] Godfrey DI, Macdonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol 2004; **4**: 231-237.

[24] Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. Nat Rev Immunol 2007; **7**: 505-518.

[25] Godfrey DI, Rossjohn J. New ways to turn on NKT cells. J. Exp. Med. 2011; **208**: 1121-1125.

[26] Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. Nature Immunology. 2010; **11**: 197-206.

[27] Godfrey DI, Pellicci DG, Rossjohn J. Beta-testing NKT cell self-reactivity. Nat Immunol 2011; **12**: 1135-1137.

[28] Halder RC, Aguillera C, Maricic I, Kumar V. Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. J Clin Invest 2007; **117**: 2302-2312.

[29] Hedge S, Fox L, Wang X, Gumperz JE. Autoreactive natural killer T cells: promoting immune protection and immune tolerance trough varied interactions with myeloid antigen-presenting cells. Immunology 2010; **130**: 471-483.

[30] Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. J Exp Med 2004; **199**: 947-957.

[31] Jing Y, Gravestein S, Chaganty NR, Chen N, Lyerly KH, Joyce S, Deng Y. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. Experimental Gerontology 2007; **42**: 719:732.

[32] Joyee AG, Qiu H, Wang S, Fan Y, Bilenki L, Yang X. Distinct NKT cell subsets are induced by different *Chlamydia* species leading to differential adaptive immunity and host resistance to the infections. J Immunol 2007; **178**: 1048-1058.

[33] Kadri N, Korpos E, Gupta S, Briet C, Lofbom L, Yagita H, Lehuen A, Boitard C, Holmberg D, Sorokin L, Cardell SL. CD4+ type II NKT cells mediate ICOS and programmed death-1-dependent regulation of type 1 diabetes. J Immunol 2012; **188**: 3138-3149.

[34] Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, Merad M, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. Hepatology 2009; **50**: 261-274.

[35] Kaszubowska L, Ślebioda Tj, Foerster J, Kmieć Z. Znaczenie komórek NK w procesie starzenia fizjologicznego. Postępy Biologii Komórki 2012; **39**: 123-137
[36] Kerr EC, Ravaney BJ, Copland DA, Dick AD, Nicholson LB. Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations. J Autoimmun 2008; **31**: 354-561.
[37] Kim S, Lalani S, Parekh VV, Vincent TL, Wu L, Van Kaer L. Impact of bacteria on the phenotype, functions, and therapeutic activities of invariant NKT cells in mice. J Clin Invest 2008; **118**: 2301-2315.
[38] Kopeć-Szlęzak J. Biologia komórek dendrytycznych. Onkol Pol 2008; **11**: 106-110.
[39] Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W, Moritoki Y, Ansari AA, Kemper C, Price J, Atkinson JP, Coppel RL, Gershwin ME. Hepatic IL-17 responses in human and murine biliary cirrhosis. J Autoimmun 2009; **32**: 43-51.
[40] Lehuen A, Diana J, Zaccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. Nat Rev Immunol 2010; **10**: 501-513.
[41] Marhaba R, Vitacolonna M, Hildebrand D, Baniyash M, Freyschmidt-Paul P, Zoller M. Importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. J Immunol 2007; **179**: 5071-5081.
[42] Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. Curr Opin Immunol 2008; **20**: 358-368.
[43] Mattner J, Debord KR, Ismail N, Goff RD, Cantu CI, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Buetler B, Teyton L, Savage Pb, Bendelac A. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. Nature 2005; **434**: 525-529.
[44] Metelitsa LS. Anti-tumor potential of type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative tumors in humans. Clin Immunol 2011; **140**: 119-129.
[45] Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Malavolta M. NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins. J Clin Immunol 2009; **29**: 416-425.
[46] Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT functions in immunosenescence. Ageing Cell 2004; **3**: 177-184.
[47] Molling JW, Langius JAE, Langendijk JA, Leemans CR, Bontkes HJ, Van Der Vliet HJJ, Von Blomberg ME, Scheper RJ, Van Den Eertwegh AJM. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. J Clin Oncol 2007; **25**: 862-868.
[48] Motohashi S, Nagato K, Kunii N, Yamamoto H, Yamasaki K, Okita K, Hanaoka H, Shimizu N, Suzuki M, Yoshino I, Taniguchi M, Fujisawa T, Nakayama T. A phase I-II study of α-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. J Immunol 2009; **182**: 2492-2501.
[49] Nagato K, Motohashi S, Ishibashi F, Okita K, Yamasaki K, Moriya Y, Hoshino H, Yoshida S, Hanaoka H, Fujii S, Taniguchi M, Yoshino I, Nakayama T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after α-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. J Clin Immunol 2012; **32**: 1071-1081.
[50] Natarajan S, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells: potential for regulation and therapy of liver auto- and alloimmunity. Immunobiology 2010; **215**: 698-703.
[51] Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Lindenbergh D, Willemsen R, Kaser A, Simons-Oosterhuis Y, Brugman S, Yamaguchi K, Ishikawa H, Aiba Y, Koga Y, Samsom JN, Oshima K, Kikuchi M, Escher JC, Hattori M, Onderdonk Ab, Blumberg Rs. Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice. J Clin Invest 2009; **119**: 1241-1250.

[52] Novak J, Griseri T, Beaudoin L, Lehuen A. Regulation of type 1 diabetes by NKT cells. Int Rev Immunol 2007; **26**: 49-72.
[53] Novak J, Lehuen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. Cytokine 2011; **53**: 263-270.
[54] Ostrand-Rosenberg S, Clements VK, Terabe M, Park JM, Berzofsky JA, Dissanayake SK. Resistance to metastatic disease in STAT6-deficient mice requires hemopoietic and nonhemopoietic cells and is IFN-γ dependent. J Immunol 2002; **169**: 5796-5804.
[55] Parekh VV, Wilson MT, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Wu L,Wang C-R, Joyce S, Van Kaer L. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. J Clin Invest 2005; **115**: 2572-2583.
[56] Parekh VV, Lalani S, Van Kaer L. The in vivo response of invariant natural killer T cells to glicolipid antigens. Int Rev Immunol. 2007; **26**: 31-48.
[57] Pei B, Vela JL, Zajonc D, Kronenberg M. Interplay between carbohydrate and lipid in recognition of glycolipid antigens by natural killer T cells. Ann N Y Acad Sci. 2012; **1253**: 68-79.
[58] Parietti V, Chifflot H, Sibilia J, Muller S, Monneaux F. Rituximab treatment overcomes reduction of regulatory iNKT cells in patients with rheumatoid arthritis. Clin Immunol 2010; **134**: 331-339.
[59] Piekarski R, Szewczyk L**.** Rola limfocytów Th17 w cukrzycy typu 1. Pediatr. Endocrinol. 2011; **10**: 61-68.
[60] Pellicci DG, Clarke AJ, Patel O, Mallevaey T, Beddoe T, Le Nours J, Uldrich AP, Mccluskey J, Besra GS, Porcelli SA, Gapin L, Godfrey DI, Rossjohn J. Recognition of β-linked self-glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. Nat Immunol. 2011; **12**: 827-833.
[61] Pillai AB, George TI, Dutt S, Teo P, Strober S. Host NKT cells can prevent graft-versus-host disease and permit graft antitumor activity after bone marrow transplantation. J Immunol 2007; **178**: 6242-6251.
[62] Renukaradhya GJ, Khan MA, Vieira M, Du W, Gervay-Hague J, Brutkiewicz RR. Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. Blood 2008; **111**: 5637-5645.
[63] Santodomingo-Garzon T, Han J, Le T, Yang Y, Swain MG. Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor-3-positive regulatory T cells to the liver in mice. Hepatology 2009; **49**: 1267-1276.
[64] Santodomingo-Garzon T, Swain MG. Role of NKT cells in autoimmune liver disease. Autoimmunity Reviews. 2011; **10**: 793-800.
[65] Schneiders FL, De Bruin RCG, Santegoets SJAM, Bonneville M, Scotet E, Scheper RJ, Verheul HMW, De Gruijl TD, Van Der Vliet HJ. Activated iNKT cells promote Vγ9Vδ2-T cell anti-tumor effector functions through the production of TNF-α. Clin Immunol 2012; **142**:194-200.
[66] Shimizu K, Kurosawa Y, Taniguchi M, Steinman RM, Fujii S. Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with α-galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell-mediated immunity via dendritic cells. JEM 2007; **204**: 2641-2653.
[67] Song L, Asgharzadeh S, Salo J, Engell K, Wu H, Sposto R, Ara T, Silverman AM, Declerck YA, Seeger RC, Metelitsa LS.Vα24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor -associated macrophages. J Clin Invest 2009; **119**: 1524-1536.
[68] Swain G. Hepatic NKT cells: friend or foe? Clinical Science 2008; **114**: 457-466.
[69] Terabe M, Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity. Adv Cancer Res 2008; **101**: 277-348.
[70] Terabe M, Matsui S, Park J-M, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul We, Berzofsky JA. Transforming Growth Factor-β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted cells block cytotoxic T lymphocyte–mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. J Exp Med. 2003; **198**: 1741-1752.

[71] Tiegs G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. *Z* Gastroenterol 2007; **45**: 63-70.
[72] Tudhope SJ, Von Delwig A, Falconer J, Pratt A, Woolridge T, Wilson G, Isaacs JD, Ng WF. Profound invariant natural killer T-cell deficiency in inflammatory arthritis. Ann Rheum Dis 2010; **69**: 1873-1879.
[73] Tupin E, Kinjo T, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. Nat Rev Immunol 2007; **5**: 405-417.
[74] Ueno Y, Moritoki Y, Shimosegawa T, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis: what we know and what we want to know about human PBC ans spontaneous PBC mouse models. J Gastroenterol 2007; **42**: 189-195.
[75] Uldrich AP, Nadine Y. Crowe NY, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Zhan Y, Lew AM, Bouillet P, Strasser A, Mark J. Smyth MJ, Godfrey DI. NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction and hypo-responsiveness to further antigenic challenge. J Immunol. 2005; **175**: 3092-3101.
[76] Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. Cell Tissue Res. 2011; **343**: 43-55.
[77] Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. Curr Opin Immunol 2007; **19**: 354-364.
[78] Vincent MS, Gumperz JE, Brenner MB. Understanding the function of CD1-restricted T cells. Nat Immunol 2003; **4**: 517-523.
[79] Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. Nat Rev 2012; **12**: 239-252.
[80] Vliet HJJ, Nishi N, Gruijl TD, Blomberg BME, Eertwegh AJM, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. Blood 2000; **95**: 2440-2442.
[81] Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, Singh AK, Stanic AK,Wang C-R, Joyce S, Wick MJ, Van Kaer L. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. PNAS 2003; **100**: 10913-10918.
[82] Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. Tissue Antigens 2009; **73**: 535-545.
[83] Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, Suzuki K. Interleukin-17 as a new marker of severity of acute hepatic injury. Hepatol Res 2007; **37**: 248-254.
[84] Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Levery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. Science 2004; **306**: 1786-1789.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 02.06.13
Przyjęto: 30.10.13
Lucyna Kaszubowska
Katedra i Zakład Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk
e-mail: lkras@gumed.edu.pl