

INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Zespół Kliniczno-Badawczy Epigenetyki Człowieka
Zespół Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej

mgr Marta Cąkała-Jakimowicz

**ODPOWIEDŹ KOMÓREK
REGIONALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH SZCZURA
NA PIERWOTNE I WTÓRNE ZAKAŻENIE SKÓRY
*STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor:
Prof. dr hab. n. med. Waldemar Lech Olszewski

Warszawa 2016

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi
Panu Profesorowi dr hab. n. med. Waldemarowi Lechowi Olszewskiemu
za zaufanie, cenne uwagi
oraz dyskusję merytoryczną zagadnień
dotyczących niniejszej pracy*

*dziękuję
Pani Profesor dr hab. n. med. Monice Puzianowskiej – Kuźnickiej
za pomoc, życzliwość
oraz dodatkową mobilizację do pracy*

*dziękuję również
Koleżankom **Ewie Stelmach** oraz **Oldze Buyanowskiej**
za pomoc techniczną przy wykonywaniu doświadczeń*

*szczególnie dziękuję
Rodzicom, Mężowi oraz moim **Bliskim**
za wsparcie, cierpliwość oraz wiarę we mnie*

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	8
ABSTRACT.....	12
1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA NA TEMAT TOPOGRAFII KOMÓREK WĘZŁA CHŁONNEGO ORAZ ICH ODPOWIEDZI NA ANTYGENY.....	15
1.1. Struktura i funkcja węzła chłonnego.....	15
1.2. Odpowiedź komórek regionalnego węzła chłonnego na pierwotną stymulację antygenem pochodzącym z tkanek obwodowych.....	18
1.2.1. Zasiedlanie węzła chłonnego przez komórki dendrytyczne.....	19
1.2.2. Zasiedlanie węzła chłonnego przez limfocyty T i B.....	22
1.2.3. Zasiedlanie węzła chłonnego przez monocyty i neutrofile.....	23
1.2.4. Odpowiedź komórek strefy brzeżnej węzła chłonnego na antygen.....	24
1.2.5. Odpowiedź komórek grudek węzła chłonnego na antygen.....	25
1.2.6. Odpowiedź komórek strefy przykorowej węzła chłonnego na antygen.....	27
1.3. Pamięć immunologiczna.....	29
1.3.1. Limfocyty B pamięci.....	30
1.3.2. Komórki plazmatyczne.....	32
1.3.3. Limfocyty T pamięci.....	34
1.4. Odpowiedź komórek regionalnego węzła chłonnego na wtórną stymulację antygenem pochodzącym z tkanek obwodowych.....	35
1.4.1. Odpowiedź limfocytów B pamięci i komórek plazmatycznych na restymulację antygenową.....	35
1.4.2. Odpowiedź limfocytów T pamięci na restymulację antygenową.....	37
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY.....	40
3. MATERIAŁY I METODY.....	47
3.1. Zwierzęta doświadczalne.....	47
3.2. Metoda zakażenia bakteriami.....	47
3.3. Określenie zmian ilościowych poszczególnych supopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych metodą cytometrii przepływowej.....	48
3.3.1. Izolacja komórek.....	48
3.3.2. Znakowanie immunocytochemiczne komórek.....	49
3.4. Barwienie immunohistochemiczne skrawków podkolanowych węzłów	

chłonnych.....	52
3.5. Określenie zmian ilościowych poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych w programie Microimage.....	55
3.6. Analiza statystyczna.....	55
4. WYNIKI.....	57
4.1. Liczba komórek (w 10 ⁶) w podkolanowych węzłach chłonnych.....	57
4.2. Masa (w g) podkolanowych węzłów chłonnych.....	58
4.3. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych, ocenione w cytometrze przepływowym.....	59
4.4. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w poszczególnych strefach podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage.....	64
4.4.1. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie brzeżnej węzłów.....	66
4.4.2. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w grudkach chłonnych węzłów.....	72
4.4.3. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie przykorowej węzłów.....	76
4.4.4. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie rdzennej węzłów.....	81
5. DYSKUSJA	86
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	106
7. WNIOSKI.....	109
8. PIŚMIENNICTWO.....	110
9. TABELĘ WYNIKÓW.....	123
10. SPIS TABEL.....	129
11. SPIS RYCIN.....	130

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

APO-1/FAS/CD95 (apoptosis antigen 1/FAS receptor/cluster of differentiation 95)- antigen 1 apoptozy/ białko Fas/kompleks różnicowania 95, receptor śmierci

BCL-2 (B cell lymphoma 2)- chłoniak z komórek B 2

BCR (B cell receptor)- receptor limfocytów B

BLIMP-1 (B lymphocyte induced maturation protein 1)- białko regulujące końcowe dojrzewanie limfocytów B i granulocytów- monocytów

CCL1 (chemokine (CC motif) ligand 1)- białko chemotaktyczne wydzielane przez aktywowane limfocyty T; przyciąga monocyty, komórki NK, niedojrzałe komórki B i komórki dendrytyczne

CCL2/MCP-1 (chemokine (CC motif) ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1)-białko chemotaktyczne dla monocytów-1

CCL3/MIP-1 α (chemokine (CC motif) ligand 3/monocyte chemoattractant protein-1 α /macrophage inflammatory protein1 α)- białko zapalne makrofagów 1 α

CCL4/MIP-1 β (chemokine (CC motif) ligand 4/macrophage inflammatory protein 1 β)- białko zapalne makrofagów 1 β

CCL17/TARC (thymus and activation regulated chemokine/chemokine (C-C motif) ligand 17)- chemokina regulowana przez grasicę i aktywację

CCL18/DC-CK1 (chemokine (C-C motif) ligand 18/DC-derived CC chemokine 1)- chemokina 1 komórek dendrytycznych

CCL19/ELC/MIP-3 β (chemokine (C-C motif) ligand 19/EBI1 ligand chemokine/macrophage inflammatory protein-3 β)- białko zapalne makrofagów 3 β

CCL21/SLC/6Ckine (chemokine (C-C motif) ligand 21/exodus-2/secondary lymphoid-tissue chemokine)- chemokiny wtórnych organów limfoidalnych

CCL22/MDC (chemokine (C-C motif) ligand 22/macrophage derived cytokine)- cytokina wyrażana przez makrofagi i komórki dendrytyczne

CCR, CXCR (chemokine(motif CC)receptor)-receptory dla chemokin z grupy CC i CXC

CD (cluster of differentiation)- kompleks różnicowania, symbol z odpowiednią cyfrą oznaczający struktury powierzchniowe komórek, głównie leukocytów

CpG (—C—phosphate—G—)/housekeeping genes- odcinki promotorów, dinukleotydy

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4)- antigen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T

CXCL9/MIG (chemokine (C-X-C motif) ligand 9/monokine induced by gamma interferon)- monokina indukowana przez interferon gamma

CXCL12/SDF1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1)- czynnik pochodzenia stromalnego 1

CXCL13/BLC (chemokine (C-X-C motif) ligand 13/B lymphocyte chemoattractant) -chemoatraktant limfocytów B

DC-SIGN/SIGNR-1(dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) nieintegryna swoista dla komórek dendrytycznych chwytająca ICAM-3

DNA (deoxyribonucleic acid)- kwas deoksyrybonukleinowy

Fc (fragment crystallizable)- krystalizujący fragment przeciwciała

FCS (fetal calf serum)- surowica cielęca

FITC (fluorescein isothiocyanate)- izotiocyanian fluoresceiny

Foxp-3 (forkhead box P3)- gen kodujący białko z rodziny Fox

GITR (glucocorticoid- induced TNFR- related)- białko związane z receptorem indukowanym glukokortykoidem

GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor)- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

Gr1(Ly6/G) (lymphocyte antigen 6 complex, locus G)- antygen różnicowania szpikowego

αδT naiwne epidermalne limfocyty T

HLA (human leukocyte antigen system)- ludzki układ zgodności tkankowej

HLA-DR (human leukocyte antigen class II)- ludzkie antygeny zgodności tkankowej klasy II

ICAM-1/CD54 (intercellular adhesion molecule 1)- cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1

Ig immunoglobulina (przeciwciało)

IgA przeciwciało klasy IgA

IgD przeciwciało klasy IgD

IgG przeciwciało klasy IgG

IgM przeciwciało klasy IgM

IL interleukina

iNOS (inducible nitric oxide synthase)- indukowana syntaza tlenku azotu

kDa kilodalton

LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1)- antygen 1 związany z czynnością limfocytów

LPS (lipopolysaccharide)- lipopolisacharyd, składnik ścian drobnoustrojów gram ujemnych

LSAB 2AP streptawidyna biotyna system- alkaliczna fosfataza, system wizualizacji

LT β /TNF β (lymphotoxin β , tumor necrosis factor β)- limfotoksyna β , czynnik martwicy nowotworu β

LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial receptor-1)- receptor 1 dla śródbłonka naczyń limfatycznych

L1CAM/CAML1/CD171 (neuronal cell adhesion molecule)- cząsteczka adhezji komórkowej komórek nerwowych

MARCO (macrophage receptor with collagenous structure)- receptor makrofagów o strukturze kolagenu

MHC-I (major histocompatibility complex class I)- główny układ zgodności tkankowej klasy I

MHC-II (major histocompatibility complex class II)- główny układ zgodności tkankowej klasy II

NK (natural killer cells)- komórki naturalnie zabijające

Notch białko receptorowe odgrywające rolę w utrzymaniu i rozwoju komórek mięśni gładkich

PAMP (patogen associated molecular patterns)- molekularne wzorce związane z patogenami

PD1/PDCD1/CD279 (programmed cell death protein 1)- białko 1 zaprogramowanej śmierci komórki

PECAM-1/CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1)- cząsteczka adhezji komórkowej płytkowo-śródbłonkowej 1

STRESZCZENIE

WSTĘP: Skóra kończyn dolnych człowieka znajduje się w ciągłym kontakcie z otaczającą materią, bogatą w mikroorganizmy oraz substancje chemiczne. Jest ona pokryta włącznie z gruczołami łojowymi, potowymi oraz mieszkami włosowymi saprofityczną florą bakteryjną. Florę tę tworzy wiele szczepów, jednak najczęstszymi są bakterie należące do ziarenkowców, a wśród nich *Staphylococcus epidermidis*. Drobnoustroje te nie są patogenne dopóki zasiedlają swoją niszę fizjologiczną. Urazy otwarte, częste infekcje skóry i tkanki podskórnej oraz wynikające z nich przewlekłe zapalenie są przyczyną zmian w początkowych naczyniach limfatycznych oraz pniach limfatycznych zbierających limfę. W zaawansowanym stadium ma miejsce zwłóknienie naczyń limfatycznych i węzłów chłonnych prowadzące do zastoju limfy i obrzęku limfatycznego. Brak drenażu chłonnego powoduje, że bakterie normalnie zasiedlające powierzchnię skóry, jej gruczoły i mieszki włosowe oraz te, które przeniknęły do tkanek głębokich stają się patogenne, prawdopodobnie wskutek zmiany środowiska chemicznego. Nie mogą one być odtransportowane i namnażają się w tkance. Na nagromadzone w tkankach bakterie odpowiadają regionalne węzły chłonne rekrutacją monocytów i limfocytów z krwi oraz fagocytozą. W węzłach powstają także komórki pamięci immunologicznej, co jest częścią normalnej odpowiedzi na obce antygeny. Nie została dotychczas poznana reakcja węzłów chłonnych na szczepy bakteryjne „fizjologicznie” zasiedlające skórę człowieka, a w szczególności kończyn dolnych. Nie wydaje się, aby ewolucyjnie wytworzyła się tolerancja gdyż klinicznie obserwuje się długotrwałe zapalenia skóry własnymi gronkowcami. Nie wiadomo dokładnie jakie fenotypy komórkowe są rekrutowane z krwi i dojrzewają w węzłach, a także czy i jak długa może być wytworzona pamięć immunologiczna na antygeny danych szczepów, pozwalająca na przynajmniej krótkotrwałą odporność.

CEL PRACY: Celem pracy było zbadanie odpowiedzi komórek regionalnych węzłów chłonnych szczura na wybrany gatunek bakterii: *Staphylococcus epidermidis* zasiedlający skórę kończyn dolnych człowieka, a w szczególności: prześledzenie zmiany fenotypów komórek węzłów po pierwotnym i wtórnym

zakażeniu, sprawdzenie czy w węzłach wytwarzane są klony komórek T i B pamięci oraz regulatorowe (supresorowe) limfocyty T.

GRUPY EKSPERYMENTALNE: Wyszczególniono następujące grupy badawcze: grupy z zakażeniem podskórnym pierwotnym oraz wczesną (1 dzień po ostatnim podaniu zawiesiny bakterii) i późną (21 dni po ostatnim podaniu zawiesiny bakterii) izolacją materiału, grupa z zakażeniem podskórnym wtórnym.

MATERIAŁY I METODY: Zawiesinę bakterii *S. epidermidis* lub roztwór soli fizjologicznej podawano szczurom podskórnie w grzbiet kończyny tylnej. Wyizolowane podkolanowe węzły chłonne ważono, przeliczano ilość komórek na gram tkanki węzła, a następnie oceniano zmiany odsetka subpopulacji komórkowych w węzłach metodą cytometrii przepływowej oraz w programie Microimage na skrawkach wybarwionych immunohistochemicznie.

Fenotypy komórek podkolanowych węzłów chłonnych oznaczano przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko: limfocytom T, monocytom i granulocytom (W3/13+), pomocniczym limfocytom T i makrofagom (W3/25+), cytotoksycznym limfocytom T (OX8+), limfocytom B (B+, OX12+, OX33+), komórkom dendrytycznym (OX62+), makrofagom (ED1+), granulocytom (HiS48+), komórkom wykazującym obecność białka ICAM-1 (CD54+), PECAM-1 (CD31+), MHC klasy II (OX6+), komórkom szpikowym i tymocytom (OX7+), limfocytom T regulatorowym (CD4+CD25+), limfocytom B pamięci (CD19+CD27+), limfocytom T pamięci pomocniczym (CD4+CD45RC-CD62L+/-) oraz limfocytom T pamięci cytotoksycznym (CD8+CD45RC-CD62L+/-).

WYNIKI: Po pierwotnym zakażeniu skóry *Staphylococcus epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału zaobserwowano istotne zwiększenie **liczby komórek** w podkolanowych węzłach chłonnych oraz **masy węzłów** w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym skóry liczba komórek w węzłach pozostawała na poziomie podobnym do tych po zakażeniu pierwotnym. Masa węzłów natomiast była statystycznie niższa od tej po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału.

W ocenie cytometrycznej, po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek wyrażających następujące białka: OX8, ED1, CD54.

Zmniejszył się natomiast odsetek komórek W3/25+ w porównaniu do kontroli. W okresie 3 tygodni od zakażenia pierwotnego zwiększył się istotnie udział komórek (CD4+CD45RC-) oraz komórek (CD8+CD45RC-CD62L-). Po zakażeniu wtórnym skóry wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek: W3/13+, OX8+, ED1+, (CD19+CD27+), (CD4+ CD45RC- CD62L-), (CD8+CD45RC-). Zmniejszył się natomiast odsetek populacji limfocytów B, komórek OX7+, OX62+, OX6+, CD54+, (W3/13+OX6+) oraz (W3/25+OX6+). Nie zaobserwowano ilościowych zmian subpopulacji komórek (CD4+CD25+) po zakażeniu pierwotnym i wtórnym skóry *S. epidermidis*.

W ocenie morfometrycznej w programie Microimage, po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału, w strefie brzeżnej węzłów wykazano istotne zwiększenie odsetka komórek: W3/13+, W3/25+, OX8+, B+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ oraz CD54+ w porównaniu do kontroli. Wykazano ponadto zmniejszenie udziału procentowego komórek CD31+. W grudkach zaobserwowano zwiększenie udziału procentowego komórek wyrażających białka: W3/13, W3/25, ED1, CD31, OX7, HiS48, OX6 i CD54. W strefie przykorowej węzłów wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek: W3/13+, W3/25+, OX8+, B+, OX62+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ oraz CD54+. W strefie rdzennej węzłów po zakażeniu pierwotnym zaobserwowano istotne zwiększenie udziału procentowego komórek: W3/13+, W3/25+, OX8+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ oraz CD54+.

W grupie po zakażeniu wtórnym skóry w strefie brzeżnej węzłów wykazano zwiększenie udziału procentowego komórek CD54+ w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym. Zmniejszył się natomiast odsetek komórek wyrażających białka: OX62, ED1, CD31 oraz HiS48 w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału. W grudkach chłonnych wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek CD54+ w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym oraz zmniejszenie odsetka komórek CD31+ w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału. W strefie przykorowej węzłów zaobserwowano zmniejszenie udziału procentowego komórek OX62+ w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym oraz komórek W3/25+, CD31+ i OX7+ w porównaniu do grupy po

zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału. W strefie rdzennej wykazano zmniejszenie odsetka komórek W3/25+, OX62+ i OX7+ oraz zwiększenie udziału procentowego komórek OX8+ w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI: Pierwotne zakażenie skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału spowodowało zwiększenie liczby komórek, ale nieistotną ilościową zmianę proporcji poszczególnych populacji. Mogłoby to świadczyć, iż organizacja komórkowa węzła jest przygotowana ewolucyjnie na przyjęcie antygeny bakteryjnego ze skóry, a odpowiedź polega głównie na zwiększonej rekrutacji z krwi fenotypów obecnych w węzle już przed zakażeniem.

Wtórne zakażenie skóry *S. epidermidis* nie spowodowało zwiększenia masy i liczby komórek węzłów ponad wartości obserwowane po zakażeniu pierwotnym. Charakteryzowało się natomiast obniżeniem odsetka poszczególnych populacji biorących udział w pierwotnym rozpoznaniu bakterii *S. epidermidis*. Nie wykazano zwiększenia liczebności limfocytów T regulatorowych. Natomiast zaobserwowano istotne zwiększenie udziału procentowego populacji komórek B i T pamięci immunologicznej. Można przypuszczać, iż komórki te uruchamiały szybką odpowiedź humoralną w postaci produkcji przeciwciał specyficznych dla antygeny bakteryjnego poznanego w czasie pierwotnego zakażenia.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Skin of human lower limbs remains in a permanent contact with the environment rich in microorganisms and chemicals. It is colonized together with its appendices as sebaceous and sweat glands and hair follicles by saprophytic bacterial flora. Skin flora contains a number of strains, among them the most frequent are *cocci*, with most frequent *Staphylococcus epidermidis*. *S. epidermidis* remains as non-pathogenic until it has penetrated tissues and created a niche for itself. Human feet undergo frequent bacterial infections bringing about changes in the initial lymphatics and collecting lymphatic trunks. In chronic bacterial inflammation of skin and subcutaneous tissue lymphatic endothelial cells become damaged what results in obliteration of their lumen. Moreover, lymph nodes lose lymphoid elements and eventually become fibrotic. This brings about in course of time tissue fluid/lymph stasis and development of lymphatic edema. Lack of lymphatic drainage causes accumulation of bacteria that colonized deep tissues. They can not be transported away and multiply locally. Presence of a large bacterial load in tissues evokes reaction of regional lymph nodes, expressed as recruitment in nodes of cohorts of monocytes and lymphocytes mainly from blood. In nodes clones of memory lymphocytes arise what is a normal response to recognized foreign antigens. It remains still unclear which cellular subtypes are recruited from the blood and mature in the nodes, and for how long can the memory immune response to skin bacterial strains persist.

AIM: To investigate the response of regional lymph nodes cells to *Staphylococcus epidermidis* colonizing normal human lower limb and in particular to follow changes in the cell phenotypes after the primary and secondary infection and investigating whether lymph nodes produce T and B cell memory clones and regulatory T lymphocytes (suppressors).

EXPERIMENTAL GROUPS: Primary subcutaneous infection with early (1 day after last bacterial injection) and late (21 days after last bacterial injection) material harvesting, secondary subcutaneous infection.

MATERIALS AND METHODS: A suspension of *S. epidermidis* was administered subcutaneously in the dorsum of rat hind paws, popliteal lymph

nodes were harvested and weighted, the number of cells per gram of node and changes in percentage of subpopulations were measured by flow cytometry and in Microimage technique on tissue sections.

The phenotypes of cells popliteal lymph nodes were determined using antibodies directed against: T lymphocytes, monocytes and granulocytes (W3/13+), helper T lymphocytes and macrophages (W3/25+), cytotoxic T lymphocytes (OX8+), B lymphocytes (B+, OX12+, OX33+), dendritic cells (OX62+), macrophages (ED1+), granulocytes (HiS48+), cells showing the presence of ICAM-1 (CD54+), PECAM-1 (CD31+), MHC class II (OX6+) cells of the marrow and thymocytes (OX7+), regulatory T lymphocytes (CD4+ CD25+), memory B cells (CD19+ CD27+), memory T lymphocytes helper (CD4+ CD45RC- CD62L+/-) and memory cytotoxic T lymphocytes (CD8+ CD45RC- CD62L+/-).

RESULTS: Following the primary infection of paw skin with *Staphylococcus epidermidis* in the group of early harvesting (7 days) a significant increase in **number of node cells** and node **mass** was observed. After the secondary infection, the number of node cells did not increase over that of after primary infection.

On cytometry, in the group of primary infection with early harvesting a significant increase in the percentage of cells expressing OX8, ED1, CD54 antigens was observed. There was a decrease in percentage of W3/25+ cells. During a 3 weeks period after primary infection a significant increase in percentage of (CD4+ CD45RC-) and (CD8+ CD45RC- CD62L-) cells was seen. After secondary infection, a significant increase in percentage of W3/13+, OX8+, ED1+, (CD19+ CD27+), (CD4+ CD45RC- CD62L-), (CD8+ CD45RC-) could be observed. There was a decrease in percentage of B lymphocytes, cells OX7+, OX62+, OX6+, CD54+, (W3/13+ OX6+) and (W3/25+ OX6+). No quantitative changes in cell CD4+ CD25+ were seen after primary and secondary skin infection.

In the Microimage pictures after primary skin infection in the group of early harvesting the node marginal zone showed a significant increase in the percentage of W3/13+, W3/25+, OX8+, B+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ and CD54+ cells. There was reduction in the percentage of CD31+ cells. In the follicles increase in percentage of cells expressing W3/13, W3/25, ED1, CD31, OX7, HiS48, OX6 and CD54 was observed. In the paracortical zone, a significant increase of W3/13+,

W3/25+, OX8+, B+, OX62+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ and CD54+ and in the medullary area of W3/13+, W3/25+, OX8+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ and CD54+ was noticed.

After the secondary skin infection the marginal zone of nodes showed increase in percentage of CD54+ cells, compared to the groups of primary infection. Decreased percentage of cells expressing OX62, ED1, CD31 and HiS48, compared to the early primary infection was observed. In the follicles, a significant increase in percentage of CD54+ cells as compared to the groups of primary infection and reduced percentage of CD31+ cells as compared to the group after primary infection with early harvesting was found. The paracortical zone had a decrease of percentage of OX62+ cells compared to groups of primary infected and W3/25+, CD31+, OX7+ compared to the early primary infection. The medullary area showed decrease in percentage of W3/25+, OX62+ and OX7+ and increasing of OX8+ cells compared to the early primary infection.

CONCLUSIONS: Primary skin infection with *S. epidermidis* in the group of early (7 days) node cell harvesting brought about an increase in the total number of cells but negligible quantitative differences in the proportion of subsets. This could indicate that the internal cellular evolutionarily developed organization of a lymph node is prepared to rapidly eliminate bacterial antigen drained from skin and that this response is mainly based on phenotypes already delivered to the node before infection.

The secondary skin infection did not increase the cell mass and their number over the values observed after primary infection. There was a decrease in the percentage of individual populations involved in the initial recognition of *S. epidermidis*. An increase in the number of regulatory T cells could not be observed. In contrast, a significant increase in the percentage of the B and T memory cells was found. It may be possible that memory cells initiated the humoral immune response of production of antibodies specific for the bacterial antigen used for its elimination.

1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA NA TEMAT TOPOGRAFII KOMÓREK WĘZŁA CHŁONNEGO ORAZ ICH ODPOWIEDZI NA ANTYGENY

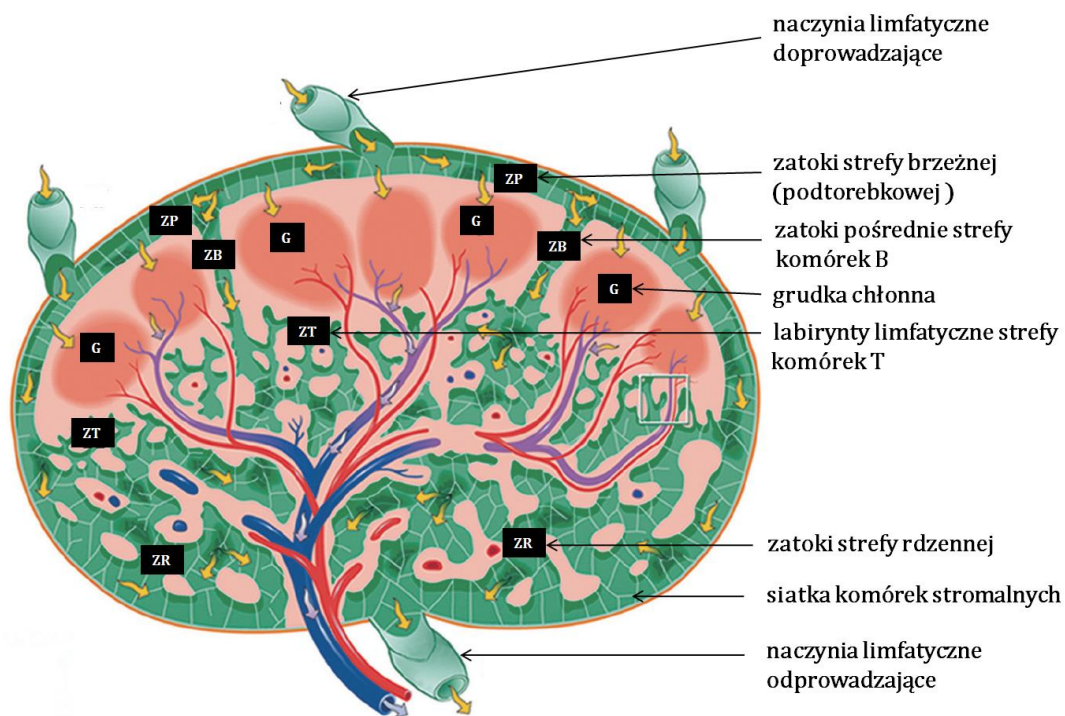
1.1. Struktura i funkcja węzła chłonnego

Pierwotna adaptacyjna odpowiedź immunologiczna na różne typy antygenów oraz szczepionki inicjowana jest w regionalnych węzłach chłonnych, drenujących miejsca obwodowe, fizjologicznie ekspozowane na antygen (Hickman, 2008).

Węzły chłonne są zorganizowanymi strukturami należącymi do wtórnych (obwodowych) narządów limfoidalnych, mającymi na celu pozyskiwanie antygenów transportowanego z miejsc obwodowych do komórek rezydencjalnych węzła. Komórki te są wysoko wyspecjalizowane w pozyskiwaniu, przetwarzaniu i prezentacji antygenów limfocytom. Naczynia limfatyczne doprowadzające dostarczają antygeny obecne w limfie do komórek strefy brzeżnej węzła. Antygeny mogą również przemieszczać się przez węzły za pośrednictwem wyspecjalizowanych kanałów, kontaktując się z wieloma typami komórek, zanim ostatecznie opuszczą węzeł drogą naczyń limfatycznych odprowadzających (Hickman, 2008).

W węzłach chłonnych szczeniura wyróżniono trzy różniące się funkcjonalnie rodzaje komórek (Fossum, 1983):

- komórki limfoidalne do których należą limfocyty,
- komórki zrębowe (stromalne), do których należą komórki śródbłonkowe naczyń limfatycznych, krwionośnych oraz komórki siateczki (fibroblasty, retikulocyty) tworzące zrąb wewnątrz węzła,
- komórki nielimfoidalne, niestromalne: makrofagi, granulocyty i komórki dendrytyczne.



Ryc. 1. Schemat węzła chłonnego szczura przedstawiający drogi przepływu limfy (zielony kolor), naczynia tętnicze (czerwony kolor) i żyłne (fioletowy kolor- włósczki żyłne wysłane wysokimi komórkami śródbłonna). Żółte strzałki wskazują kierunek przepływu limfy przez węzeł (Ohtani, 2012).

Ohtani, (2012) opisał strukturę węzła limfatycznego szczura na podstawie obserwacji w mikroskopie konfokalnym, uwidocznioną przy użyciu znacznika fluorescencyjnego TRITC (tetramethylrhodamine), badając jego rozprzestrzenianie się w czasie (Ryc. 1). Fluoresceina napływała najpierw drogą naczyń limfatycznych doprowadzających do zatoki strefy brzeżnej węzła (ZP). Następnie rozprzestrzeniała się kolejno w śródmiaższowych przestrzeniach strefy korowej powierzchniowej (strefa komórek B, ZB), labiryntach limfatycznych strefy korowej głębokiej (strefa przykorowa, grasiczozależna, strefa komórek T, ZT) docierając ostatecznie do zatok rdzennych węzła (ZR). Podwójne znakowanie fluoresceiną TRITC i FITC (fluorescein isothiocyanate) uwidoczniało małe, śródmiaższowe powierzchnie zatok rdzennych i sznury rdzenne z obecnymi naczyniami krwionośnymi.

Wizualizacja w mikroskopie skaningowym (Ohtani, 2003; 2008; 2012) potwierdziła istnienie porów na powierzchni zatoki brzeżnej węzła, które są

elementem graniczącym ze śródmiaższową powierzchnią strefy komórek B (Ryc. 1). Duże powiększenie labiryntów limfatycznych w strefie przykorowej węzła wskazywało na obecność w niej gęsto upakowanych limfocytów, które posiadają możliwość przedostawania się do wnętrza tunelu labiryntu. W strefie przykorowej widoczne były również włóścizki żyłne wysłane wysokimi komórkami śródbłonka (HEV- high endothelial venules) i otoczone dużą liczbą limfocytów. Zatoki rdzenne węzła wysłane były siatką komórek stromalnych graniczących ze śródbłonkiem limfatycznym, otaczającym sznury rdzenne bogate w limfocyty. Limfocyty toczyły się w świetle włóścizek żylnych, a następnie przylegały do powierzchni śródbłonka limfatycznego penetrując go i ostatecznie docierając do miąższu węzła. W miąższu węzła poruszały się w kierunku labiryntów limfatycznych penetrując ich śródbłonek (Ohtani, 2012).

Opisano (Ward, 2006), (Fossum, 1983) lokalizację głównych subpopulacji komórkowych w niezmiennych węzłach chłonnych szczura w skrawkach wybarwionych immunohistochemicznie przy użyciu przeciwciał monoklonalnych oraz ocenionych w mikroskopie elektronowym. W zatokach strefy brzeżnej węzłów wykazano makrofagi zatokowe o silnych właściwościach fagocytarnych oraz komórki welonowate. Makrofagi zatokowe wykazywały obecność białka ED1. W korze powierzchniowej zlokalizowano komórki, których cytoplazma wypełniona była ciemnymi, dużymi ziarnistościami oraz lipidami i resztkami jąder komórkowych. Grudki chłonne zlokalizowane w strefie korowej powierzchniowej węzłów, bogate były w limfocyty B wykazujące na swej powierzchni obecność immunoglobulin (IgM) oraz antygenów MHC klasy II. W obwodowej części grudek chłonnych obecne były komórki dendrytyczne nie wykazujące obecności MHC klasy II, a w centrach rozrodczych komórki dendrytyczne wykazujące obecność antygenów klasy II. W obrębie grudek chłonnych zaobserwowano również makrofagi brzeżne będące zróżnicowaną grupą komórek o właściwościach fagocytarnych, a także makrofagi ośrodków rozmnażania grudek charakteryzujące się zawartością resztek komórkowych w cytoplazmie i bogactwem enzymów lizosomalnych. Strefa przykorowa węzłów bogata była w limfocyty T wykazujące obecność następujących białek: CD3, W3/13, W3/25, OX8, a także splatające się komórki dendrytyczne wykazujące obecność białek MHC klasy II. W strefie

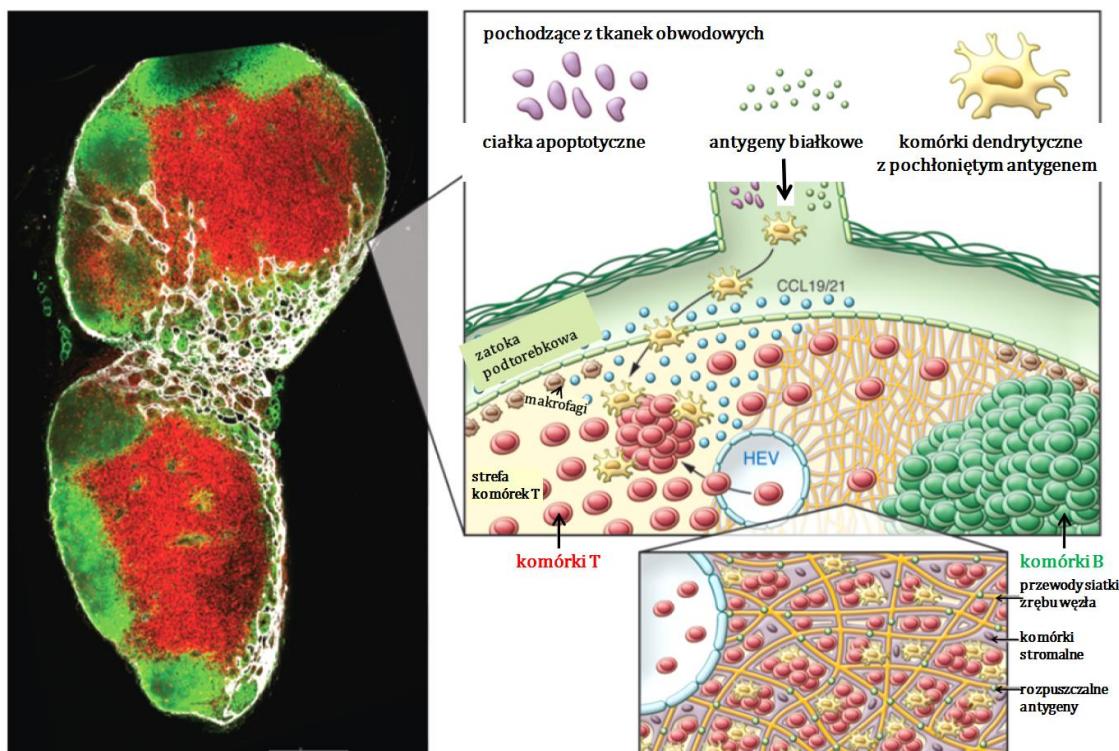
rdzennej węzła wykazano komórki plazmatyczne wykazujące na swej powierzchni obecność immunoglobulin (IgM) oraz komórki z licznymi granulami i sfagocytowanymi resztkami komórek w cytoplazmie.

Mikrośrodowisko i prawidłowa architektura węzłów chłonnych jest niezbędna do indukcji odpowiedzi limfocytów T (Junt, 2008). Macpherson (2004, 2006) wykazał u myszy hodowanych w sterylnych warunkach laboratoryjnych strefy B i T węzłów chłonnych bardzo ubogie w komórki, co wiązało się z osłabieniem reakcji na zakażenie. Mikrośrodowisko węzłów chłonnych u noworodków również jest ubogie w komórki. Wzbogacają je natomiast odpowiedzi na antygeny pochodzące ze szczepionek. Słabe stany zapalne mogą być korzystne dla formowania mikroarchitektury węzłów chłonnych i wywoływania ich reakcji (Siegrist, 2001).

1.2. Odpowiedź komórek regionalnego węzła chłonnego na pierwotną stymulację antygenem pochodzącym z tkanek obwodowych

W celu wypełnienia swej roli we wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej węzły chłonne drenujące miejsca zakażone muszą rekrutować i przyciągać leukocyty z krwi oraz tkanek obwodowych. Istnieją dwie drogi napływu komórek do regionalnych węzłów chłonnych: droga naczyń krwionośnych prowadząca przez włóśniczki żyłne wysłane wysokimi komórkami śródbłonna (HEV) oraz droga naczyń limfatycznych doprowadzających (Ryc. 2).

Podczas zapalenia akumulacja limfocytów w drenujących węzłach chłonnych znacząco wzrasta, natomiast ich wyjście drogą naczyń limfatycznych odprowadzających przejściowo jest zablokowane. Te dwie indukowane zapaleniem zmiany zwiększają prawdopodobieństwo przechwytywania antygeny przez tę część limfocytów T, która wykazuje na swej powierzchni obecność specyficznego dla danego antygeny receptora TCR (Card, 2014).



Ryc. 2. Schemat przedstawiający drogi przenikania różnego typu antygenów do drenującego węzła chłonnego. Z lewej strony widoczny skrawek węzła chłonnego myszy z obecными limfocytami B B220+ w grudkach chłonnych (zielony kolor), limfocytami T CD3e+ w strefie przykorowej (czerwony kolor) oraz naczyniami limfatycznymi LYVE-1+ (biały kolor). Z prawej strony schemat wędrówki małych antygenów oraz tych pochłoniętych przez komórki dendrytyczne drogą naczyń limfatycznych doprowadzających do zatoki podtorebkowej węzła, bogatej w wyspecjalizowane makrofagi. Chemokiny CCL19 oraz CCL21 obecne na komórkach śródbłonka limfatycznego odgrywają znaczącą rolę w zasiedlaniu węzła przez komórki dendrytyczne wiążąc się z CCR7 na ich powierzchni. Naiwne i regulatorowe limfocyty T charakteryzują się obecnością receptora CCR7 na swej powierzchni i wchodzą do węzła częściej przez włóscizki żyłne (HEV) niż naczynia limfatyczne. W strefie B przewody siatki zrębu węzła wzbogacone grudkowymi komórkami dendrytycznymi umożliwiają limfocytom B dostęp do małych antygenów, które przedostały się do zatoki podtorebkowej węzła (Card, 2014).

1.2.1. Zasiedlanie węzła chłonnego przez komórki dendrytyczne

W układzie odpornościowym skóry szczególne miejsce zajmują komórki Langerhansa, stanowiące populację komórek dendrytycznych występujących w dolnych warstwach naskórka i w niewielkiej liczbie w skórze właściwej (Chomiczewska, 2009).

W skórze właściwej dodatkowo zidentyfikowano kilka podtypów komórek dendrytycznych: skórne komórki dendrytyczne zwane też śródmięszowymi wyrażające białko CD11b+, zapalne komórki dendrytyczne, plazmacytoidalne komórki dendrytyczne i komórki dendrytyczne wytwarzające TNF- α i iNOS (Chomiczewska, 2009).

Komórki Langerhansa rozpoznają antygeny głównie za pomocą lektyn typu C, receptorów TLR (Toll like receptor), receptorów dla immunoglobulin Fc (Valladeau, 2005). Internalizują drobnoustroje i inne makromolekuły obcego pochodzenia poprzez fagocytozę i endocytozę z udziałem różnych receptorów lub makropinocytozę bez udziału receptorów. Lektyny typu C są receptorami rozpoznającymi wzorce – PRR (pattern recognition receptor), wiążącymi sekwencje wodorowęglanowe pochodzenia drobnoustrojowego (Ebner, 2004). W odpowiedzi na peptydoglikan wytwarzana jest przez nie IL-10. Ma ona za zadanie przeciwdziałać rozwojowi immunizacji w stosunku do bakterii Gram (+) stanowiących florę fizjologiczną (Flacher, 2006).

Funkcja skórnych komórek Langerhansa stała się ostatnio tematem dość kontrowersyjnym. Niektóre badania wskazują bowiem, że ich rzeczywistą rolą nie jest stymulacja immunologiczna, lecz immunoregulacja. Wykazano, że w mechanizmie tolerancji w stosunku do skórnej bakteryjnej flory fizjologicznej ważną rolę odgrywa niska ekspresja TLR, Fc γ RIIa oraz CD32 na komórkach Langerhansa i związana z tym ich słaba odpowiedź na produkty bakteryjne, w przeciwieństwie do silnej aktywacji śródmięszowych komórek dendrytycznych przez te same ligandy. Ponadto wykazano, że osłabione przetwarzanie z udziałem białek MHC klasy II bakterii saprofitycznych prowadzi do zmniejszenia wzbudzenia specyficznych antygenowo naiwnych komórek T CD4+ oraz osłabionej restymulacji limfocytów pamięci T CD4+ (Van der Aar, 2013).

Dojrzewanie komórki dendrytycznej jest procesem niezbędnym do inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Zaobserwowano zwiększoną migrację komórek dendrytycznych do regionalnych węzłów chłonnych podczas infekcji. Pula skórnych komórek dendrytycznych w czasie zapalenia jest bogatsza również dzięki zwiększonej rekrutacji monocytów zapalnych, które następnie mogą się różnicować w kierunku komórek dendrytycznych (Teijeira, 2014).

Komórki dendrytyczne wychwytyują antygeny w tkankach obwodowych, transportują je do regionalnych węzłów chłonnych i prezentują limfocytom T. Efektem prezentacji jest powstanie limfocytów efektorowych, które migrują do tkanek docelowych i wywierają swoistą odpowiedź immunologiczną (Jakóbisiak, 2007).

Bardzo istotnym białkiem uczestniczącym w procesie migracji komórek dendrytycznych, wychwytywaniu przez nie antygeny, oddziaływaniu tych komórek z makrofagami, a także w modulowaniu ekspresji cytokin oraz zmian w układzie naczyniowym jest PECAM-1. Innymi białkami uczestniczącymi w procesie transmigracji komórek dendrytycznych przez komórki śródbłonna limfatycznego są: VCAM-1, ICAM-1, CD99 oraz L1CAM (Teijeira, 2014).

Kissenpfennig (2005; 2006) wykazał, że komórki Langerhansa docierają do węzłów chłonnych wolniej niż śródmiąższowe komórki dendrytyczne. Komórkom Langerhansa potrzeba 4 dni, natomiast śródmiąższowym komórkom dendrytycznym wystarczą 2 dni. Jest to spowodowane prawdopodobnie koniecznością utraty połączeń z keratynocytami przez komórki Langerhansa. Ponadto, te dwa podtypy komórek dendrytycznych zasiedlają różne regiony węzłów chłonnych. Wykazano, że komórki Langerhansa jako komórki prezentujące antygen wywołują przede wszystkim odpowiedź immunologiczną typu komórkowego, podczas gdy inne podtypy komórek dendrytycznych raczej odpowiedź typu humoralnego. Komórki Langerhansa stymulują rozwój cytotoksycznych limfocytów T CD8+ oraz pomocniczych T CD4+, zarówno o profilu Th1, jak i Th2. Stymulują również powstanie swoistych limfocytów T pamięci, natomiast nie są zdolne do wywołania transformacji limfocytów B w komórki plazmatyczne syntetyzujące IgM (Chomiczewska, 2009).

Poza znaczącą rolę w procesie prezentacji antygeny, zidentyfikowano dodatkową funkcję komórek dendrytycznych wewnątrz drenującego węzła chłonnego. Komórki dendrytyczne konstytutywnie gromadzą się w węzłach wpływają na regulację fenotypu wysokich komórek śródbłonna limfatycznego oraz zdolności tego wyspecjalizowanego łożyska naczyniowego do rekrutacji limfocytów (Girard, 2012; Moussion, 2011). Aktywacja receptora limfotoksyny β umiejscowionego na komórkach żyłek pozawłosowatych przez komórki

dendrytyczne wykazujące obecność limfotoksyny wzbudzała ekspresję białek odpowiedzialnych za migrację komórkową, przyczyniając się w ten sposób do zasiedlania węzłów przez limfocyty drogą krwionośną (Moussion, 2011).

1.2.2. Zasiedlanie węzła chłonnego przez limfocyty T i B

Limfocyty T wyrażające na swej powierzchni receptor CCR7 oraz L-selektynę (CD62L) wpływają do drenującego węzła chłonnego przez żyłki pozawłosowate wysłane wysokimi komórkami śródbłonna w strefie przykorowej węzła (Card, 2014; Boyman, 2009), (Ryc. 2). Połączenie receptora CCR7 z chemokina CCL21 przyczynia się do polaryzacji integryn na powierzchni limfocytów T, które wiążą się z białkami ICAM-1 i VCAM-1 wyrażanymi na powierzchni siatki komórek zrębu węzła (fibroblasty, retikulocyty) i dzięki temu komórki T migrują przez strefę przykorową węzła (Aebischer, 2014; Woolf, 2007).

Podwyższona ekspresja receptora CCR7 jest głównym wyznacznikiem migracji efektorowych i regulatorowych komórek T do naczyń limfatycznych doprowadzających podczas ostrego stanu zapalnego. Zależna od receptora CCR7 migracja limfocytów T do naczyń chłonnych jest słabsza w przypadku przewlekłego zapalenia (Aebischer, 2014). System przewodów siatki zrębu węzła ogrywa istotną rolę w regulacji migracji i przeżycia limfocytów T. Szczególnie ważną rolę pełnią chemokiny CCL19 i CCL21, ponieważ ich obecność związana jest z wyznaczeniem strefy przykorowej węzła i wzmacnia ruchliwość limfocytów T w tej strefie węzła (Card, 2014; Forster, 2008). Białko CCL21 wiążąc komórki, promuje ich ruch na powierzchni siatki zrębu węzła (Woolf, 2007). CCL19 jest transportowana kanałami przewodów zrębu do włóściczek żylnych i przez to sprzyja rekrutacji naiwnych komórek T do węzła. Ułatwia to kontakt limfocytów T z komórkami siatki zrębu przez co komórki T są podtrzymywane przy życiu (Card, 2014). CCL19 produkowana przez komórki dendrytyczne przyciąga chemotaktycznie naiwne limfocyty T (Teijeira, 2014). Splatające się komórki dendrytyczne posiadające antygen na swej powierzchni formują siatkę, wzdłuż której przemieszczają się limfocyty T. Limfocyty T swoiste dla danego antygeny zostają zatrzymane w strefie przykorowej węzła chłonnego i rozpoczynają

intensywną proliferację. Limfocyty T po rozpoznaniu antygeny ulegają aktywacji i charakteryzują się ekspresją receptora powierzchniowego CXCR5 dla chemokiny BLC/CXCL13. Dzięki temu chemotaktycznemu oddziaływaniu zostają przyciągnięte do grudki chłonnej węzła (Pepper, 2011).

Limfocyty B, które wykazują ekspresję receptora CXCR5 na swej powierzchni również wnikają do węzła chłonnego głównie przez żyłki pozawłosowate wysłane wysokimi komórkami śródbłonna w strefie przykorowej węzła chłonnego. Przyciągane są do grudek chłonnych przez chemokinę BLC wytwarzaną przez stromalne komórki grudek chłonnych, retikularne komórki strefy brzeżnej grudek oraz grudkowe komórki dendrytyczne (Cyster, 2010). Po dotarciu do grudki limfocyty B tworzą w przeciągu kilku dni ośrodki rozmnażania. Proces ten wymaga obecności limfocytów T pomocniczych. Limfocyty B, które dotarły do grudek proliferują i na ich powierzchni pojawia się receptor CCR7 dla chemokin SLC i ELC wytwarzanych w strefie grasiczozależnej węzła. Dzięki temu chemotaktycznemu oddziaływaniu limfocyty T i B zbliżają się do siebie tuż przy granicy grudki chłonnej (Baldazzi, 2009). Komórki T i B poruszają się przypadkowo w określonych strefach węzła (limfocyty T w strefie przykorowej, a limfocyty B w grudce). W przypadku braku antygeny tworzą one niewidoczną granicę na brzegu grudki węzła (Cahalan, 2006; Cyster, 2010).

1.2.3. Zasiedlanie węzła chłonnego przez monocyty i neutrofile

Rezydujące w tkankach makrofagi po rozpoznaniu antygenów fagocytują je, a następnie wydzielają chemokiny ułatwiające rekrutację neutrofilii i monocytów do miejsca infekcji. Aktywowane neutrofile przyciągają na drodze chemotaksji inne neutrofile i monocyty. Miejscowe makrofagi tworzą skupienia z zapalnymi neutrofilami, monocytami oraz innymi makrofagami. Ta kooperacja komórkowa stanowi istotną część odpowiedzi przeciwbakteryjnej.

Neutrofile są głównymi komórkami efektorowymi wrodzonej odporności wobec patogenów zewnątrzkomórkowych (Silva, 2010). Docierają do drenujących węzłów chłonnych drogą naczyń limfatycznych doprowadzających oraz drogą krwionośną na drodze chemotaksji. Wykazano, że neutrofile po aktywacji uwalniają ziarniste białka i chromatynę, tworząc włókna zewnątrzkomórkowe

wiążące bakterie Gram (+), Gram (-) i niszcząc w ten sposób czynniki wirulencji bakterii. Włókna te są formą wrodzonej odpowiedzi immunologicznej wiążącą mikroorganizmy i zapobiegającą ich rozprzestrzenianiu się (Chtanova, 2008).

Monocyty są komórkami układu immunologicznego odgrywającymi istotną rolę w odpowiedzi przeciwko różnego rodzaju drobnoustrojom. Uczestniczą w gojeniu się tkanek, ale również w procesie niszczenia tkanek podczas zapalenia (Shi, 2011). Monocyty najpierw przechodzą przez tkanki objęte zapaleniem wychwytyjąc antygen, a następnie migrują do regionalnych węzłów chłonnych drogą naczyń limfatycznych doprowadzających lub poprzez naczynia krwionośne zależnie od ekspresji L selektyny (CD62L) i receptora CCR7. Wybór drogi napływu jest zależny od rodzaju immunizującego drobnoustroju (Sallusto, 2010). Zakażenie tkanek obwodowych powoduje uwolnienie chemokiny CCL2 (MCP-1) i skierowanie jej drogą limfy doprowadzającej do zatoki brzeżnej drenujących węzłów chłonnych. Następnie chemokina ta przemieszczana jest kanałami przewodów zrębu węzła do luminalnej powierzchni włóściczek żylnych obecnych w strefie przykorowej węzła (Schi, 2011; Palframan, 2001). Interakcje monokiny CXCL9 (MIG) z receptorem CXCR3 na powierzchni aktywowanych monocytów przyczynia się do przejścia monocytów przez komórki śródbłonna naczyń pozawłosowatych do wnętrza węzła chłonnego (Janatpour, 2001).

1.2.4. Odpowiedź komórek strefy brzeżnej węzła chłonnego na antygen

Obecne w zatokach limfatycznych strefy brzeżnej węzła chłonnego migrujące komórki dendrytyczne mają zdolność eliminacji mikroorganizmów oraz martwych szczątków komórkowych. Komórki te transportują i (lub) przetwarzają antygeny, aby je następnie zaprezentować limfocytom T lub B (Teijeira, 2014). Zatoki węzła limfatycznego zasiedlone są również przez rezydujące makrofagi, które tworząc spójną warstwę uczestniczą w filtracji patogenów (Card, 2014), (Ryc. 2). Na wewnętrznej powierzchni zatoki w strefie brzeżnej węzła rezydują makrofagi metalofilne charakteryzujące się ekspresją białka CD169. Komórki te bogate są w struktury rozpoznające glikoproteiny drobnoustrojów oraz mają zdolność wyłapywania immunokompleksów powstałych na skutek opsonizacji patogenu przeciwciałami o niskim powinowactwie, powstałymi podczas

pierwotnej odpowiedzi immunologicznej lub przeciwciałami o wysokim powinowactwie powstałymi podczas wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Makrofagi te są zdolne do wiązania następujących drobnoustrojów: *Lactobacillus spp.*, *Brucella abortus*, *Listeria spp.*, *Candida albicans*, *Leishmania donovani* i niektóre wirusy. Komórki te wyłapując patogeny z limfy same mogą ulec zainfekowaniu i mogą stać się rezerwuarem dla replikujących się drobnoustrojów (Cyster, 2010; Junt, 2008).

Innym subtypem makrofagów rezydujących w zatoce brzeżnej są makrofagi posiadające na swej powierzchni receptory zmiatacze (scavenger receptors) typu 1, czyli MARCO. Komórki te uczestniczą w wyłapywaniu patogenów typu: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium* (Kraal, 2000). Makrofagi obecne w strefie brzeżnej wyrażające receptory zmiatacze pomagają w utrzymaniu mikroarchitektury wtórnych narządów limfatycznych i uczestniczą w generacji grasicznie niezależnej odpowiedzi limfocytów B (Chen, 2005).

Rezydujące makrofagi i migrujące komórki dendrytyczne mogą działać sekwencyjnie. Jeśli komórka makrofagalna aktywuje antygenowo-specyficzne limfocyty niezwłocznie po infekcji bakteryjnej, sama może zostać zakażona. W wyniku tego jej zdolność do podtrzymywania ekspansji limfocytów może zostać osłabiona. Wówczas komórki dendrytyczne, które napłynęły z obwodu podtrzymują klonalną ekspansję miejscowych aktywowanych limfocytów T i B (Itano, 2003).

Istnieje wiele dróg, którymi patogeny mogą przedostawać się do wtórnych narządów limfatycznych. Jednak strefy bogate w makrofagi i komórki dendrytyczne nazwane zostały centrami antybakteryjnej odpowiedzi immunologicznej. Stanowią bowiem miejsce, w którym przecinają się następujące procesy: filtracja patogenu, produkcja mediatorów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i prezentacja antygeny limfocytom (Junt, 2008).

1.2.5. Odpowiedź komórek grudek węzła chłonnego na antygen

Poniżej strefy brzeżnej węzła limfatycznego znajduje się strefa komórek B określana często jako kora powierzchniowa otoczona makrofagami (Ryc. 2).

Limfocyty B w tym regionie zorganizowane w agregaty tworzą grudki limfatyczne i charakteryzują się ekspresją następujących białek: CD21, CD23, IgM i IgD. Grudki limfatyczne bogate są również w grudkowe komórki dendrytyczne wyrażające na swej powierzchni białka uczestniczące w przyleganiu komórek do siebie: VCAM-1 i ICAM-1 oraz receptory dla fragmentów Fc przeciwciał (Aguzzi, 2014). Po ekspozycji na antygen w grudkach tworzą się ośrodki rozmnażania zawierające proliferujące limfocyty B na siatce grudkowych komórek dendrytycznych. Proces formowania ośrodków rozmnażania w grudkach limfatycznych węzła jest bardzo istotny podczas rozwoju humoralnej odpowiedzi immunologicznej na T zależne antygeny. Są one miejscem dojrzewania powinowactwa do antygeny i generacji długotrwałych komórek B pamięci (Manser, 2004).

Limfocyty B przechwytyją małe rozpuszczalne antygeny z limfy doprowadzającej, która wypełnia zatokę brzezną węzła i przenoszą je do grudek chłonnych (Card, 2014; Pape, 2007). Duże antygeny i immunokompleksy prezentowane są grudkowym limfocytom B przez makrofagi zatoki brzeżnej węzła. Makrofagi te są zdolne do przechwytywania i zatrzymywania na swej powierzchni antygeny 72 godziny po jego wstępnej ekspozycji. Komórki dendrytyczne z receptorem CD-SIGN obecne w strefie brzeżnej węzła chłonnego również przechwytyją i przechowują na swej powierzchni antygeny (Phan, 2007; Carrasco, 2007; Junt, 2007). Wykazano to u myszy z deficytem mysich homologicznych komórek DC-SIGN, u których nie udało się zwiększyć humoralnej odpowiedzi na infekcję *Streptococcus pneumoniae* (Koppel, 2005).

Główną rolą makrofagów strefy brzeżnej węzła jest prezentacja antygeny grudkowym limfocytom B, która przebiega w trzech niezależnych stadiach. Bezpośrednio po pojawieniu się antygeny makrofagi strefy brzeżnej szybko kumulują duże antygeny, np. te znajdowane w immunokompleksach z przeciwciałami lub z fragmentami Fc przeciwciał lub całe bakterie i przetrzymują je na swej powierzchni. Zakumulowane antygeny prezentowane są w postaci nienaruszonej grudkowym limfocytom B. Grudkowe antygenowo specyficzne komórki B charakteryzują się zredukowaną migracją w ściśle określonym momencie i tworzą stabilne kontakty z makrofagami zatoki brzeżnej. Limfocyty B antygenowo specyficzne mogą również przejmować antygen w postaci

nienaruszonej z powierzchni rezydujących lub migrujących komórek dendrytycznych w pobliżu włóściczek żylnych strefy przykorowej węzła. Natomiast komórki B, które swoiście rozpoznały antygen w ośrodku rozmnażania przechwytyują go poprzez immunoglobuliny powierzchniowe z powierzchni komórki dendrytycznej grudki. Komórki te migrują do strefy jasnej szczytowej, w której pojawia się coraz więcej aktywowanych w węzle limfocytów T pomocniczych. Ta kierunkowa migracja komórek B zależna jest od gradientu chemokiny CCL21. Wykazano, że koncentracja CCL21 zmniejsza się od strony strefy przykorowej węzła w kierunku grudki w pasie 100 μm . Ostatecznie powstają limfocyty B pamięci oraz komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała (Cyster, 2010; Cahalan, 2006).

1.2.6. Odpowiedź komórek strefy przykorowej węzła chłonnego na antygen

Strefa przykorowa węzła chłonnego, znana jako strefa komórek T lub kora głęboka jest gęsto zasiedlona przez limfocyty T CD4+, T CD8+ i splatające się komórki dendrytyczne. Limfocyty T charakteryzują się zdolnością migracji w strefie przykorowej w połączeniu z siatką komórek zrębu węzła (Card, 2014; Batista, 2009). W mysich węzłach chłonnych wyróżniono i określono na podstawie ekspresji białek powierzchniowych około sześć subpopulacji komórek dendrytycznych. Zbadano następujące białka: CD4, CD8 α , CD11b, CD11c, CD205, B220, MHC-I i Gr1. Komórki CD11b+ skoncentrowane były w powierzchniowej warstwie strefy przykorowej, aby z łatwością przechwytywać patogeny z zatoki brzeżnej węzła. Komórki CD8 α + wywodzące się od naskórkowych komórek Langerhansa i plazmacytoidalne komórki dendrytyczne wyrażające L-selektynę rozproszone były na całej powierzchni strefy przykorowej węzła (Rescigno, 2002).

Do spotkania komórki dendrytycznej z limfocytym T specyficznym dla danego antygeny w strefie przykorowej węzła chłonnego dochodzi dzięki dużej szybkości w poruszaniu się komórek T oraz morfologii komórki dendrytycznej, która pomimo powolności posiada daleko sięgające wypustki. Umożliwia to wysoką powtarzalność i szansę spotkań tych komórek z innymi. W ciągu 1 godziny zaobserwowano od 500 - 5000 limfocytów T CD4+ i około 500 limfocytów T CD8+ przy jednej komórce dendrytycznej, która związała na obwodzie antygen (Cahalan,

2006). Komórka dendrytyczna ma zdolność prezentacji antygenów jednocześnie za pomocą białek MHC klasy I i II. Kiedy przetworzony antygen znajdzie się na powierzchni komórki prezentowany jest w kontekście MHC klasy I i może być rozpoznawany przez TCR limfocytów T CD8+. Prezentacja z udziałem MHC klasy I ma istotne znaczenie w odporności przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym. Prezentacja antygeny z udziałem białek MHC klasy II przyczynia się do rozwoju swoistej odpowiedzi odpornościowej. Podstawą jest więc oddziaływanie komórki prezentującej antygen z limfocytym T pomocniczym CD4+. W wyniku polaryzacji dochodzi do wytworzenia limfocytów T pomocniczych CD4+ typu 1, 2 i 17, które następnie różnicują się w kierunku limfocytów T efektorowych pamięci. Natomiast aktywowane limfocyty T pomocnicze grudkowe oraz te będące prekursorami limfocytów T centralnych pamięci w wyniku interakcji z komórkami B stają się centralnymi komórkami T pamięci (Pepper, 2011).

W procesie aktywacji limfocytów T w strefie przykorowej węzła limfatycznego uczestniczą również komórki T regulatorowe o fenotypie CD4+CD25+. Wyrażają one na swej powierzchni czynnik transkrypcyjny Foxp-3, białka: CTLA-4, GITR, CD45RO, CD122, HLA DR, PD1, Notch, OX40, CD103, a także L-selektynę i receptor CCR7, co umożliwia im zdolność gromadzenia się w regionalnych węzłach chłonnych i dalszego rozprzestrzeniania się (Jagła, 2007).

Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+ wydzielają: IL-10, TGF- β , IL-4, natomiast nie produkują IL-2. Są komórkami biorącymi udział w wytwarzaniu tolerancji na antygeny poprzez hamowanie funkcji komórek T CD4+ i T CD8+, makrofagów, komórek dendrytycznych i komórek NK. Limfocyty T CD4+CD25+ wykazują działanie supresorowe w stosunku do neutrofilii. Traktowane LPS-em powodują apoptozę neutrofilii. Hamują tylko funkcje komórek wcześniej nie zaktywowanych. Kontrolują w ten sposób odpowiedź przeciwważną i zapobiegają szkodliwym skutkom reakcji zapalnej. Wpływają negatywnie na kooperację komórek efektorowych z komórkami prezentującymi antygen i zapobiegają ich migracji. Pomimo tego odpowiadają na infekcje bakteryjne, wirusowe, grzybicze, pierwotniakowe. Biorą udział w obronie przeciwnowotworowej organizmu, a także immunologicznej po szczepieniach

ochronnych. Uczestniczą w powstawaniu limfocytów T pamięci (Śledź-Gawrońska, 2010).

Tang, (2006) zaobserwował, że limfocyty T regulatorowe hamowały lub zmniejszały stabilne oddziaływania pomiędzy komórką dendrytyczną z pochłoniętym antygenem a limfocytom T pomocniczym CD4+. Dodatkowo nie zwiększały się interakcje pomiędzy komórkami T regulatorowymi a limfocytami T pomocniczymi podczas supresji. Często limfocyty T CD4+CD25+ najpierw wchodzi w interakcje z komórkami dendrytycznymi hamując ich zdolności do tworzenia długotrwałych kontaktów z limfocytami T pomocniczymi. Obserwacje Tang, (2006) i Tadokoro, (2006) wykazały, że limfocyty T regulatorowe mogą zakłócać istniejące kontakty pomiędzy komórką dendrytyczną a limfocytom T pomocniczym, skracając czas trwania stymulacji limfocytów T pomocniczych. Doprowadzają w ten sposób do częściowo nieudanej aktywacji i zabezpieczenia przed uszkodzeniem tkanki.

Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+ pochodzące zarówno z grasicy, śledziony jak i węzłów chłonnych szczura wyrażają białka OX40 i CD86. Markery te jednak nie określają aktywności regulacyjnej tych komórek, tylko ich stan aktywacji. Dodatkowo większość szczurzych komórek T regulatorowych CD4+CD25+ wyraża białko CD80, co odróżnia je od komórek CD4+CD25-. Innymi białkami wyrażanymi na powierzchni komórek T regulatorowych szczura są: CTLA-4, GITR, czynnik transkrypcyjny Foxp-3, a także receptory chemokinowe CCR8 i CCR5 (Leigh, 2004).

1.3. Pamięć immunologiczna

Zadaniem układu immunologicznego jest obrona oraz utrzymywanie homeostazy organizmu poprzez kontrolowanie antygenów zarówno wnikających do ustroju, jak i tych, które są w nim produkowane (Jasiulewicz, 2011). Po ekspozycji na działanie patogenu lub szczepionki wykształca on pamięć immunologiczną, która polega na przygotowaniu do sprawnej, wielokrotnej odpowiedzi i obrony przed powtórnie wnikającym patogenem (Bevan, 2011).

Pamięć immunologiczna jest wynikiem klonalnej ekspansji i różnicowania antygenowo specyficznych limfocytów T i B, które ostatecznie utrzymują się przez

cały okres życia (Bevan, 2011). Od tych komórek zależy rozpoznanie antygeny oraz reakcja mająca na celu jego neutralizację. Jedną z form tej aktywności neutralizującej potencjalny patogen jest produkcja przeciwciał przez limfocyty B. Przeciwciała występują w formie związanej na powierzchni komórek B pełniąc funkcję ich receptorów lub znajdują się w postaci wolnej w płynach ustrojowych, biorąc udział w odpowiedzi typu humoralnego (Jasiulewicz, 2011).

Limfocyty pamięci natychmiast migrują do tkanek obwodowych zabezpieczając je i zwiększając wtórną odpowiedź na antygeny we wtórnych narządach limfatycznych. W systemie limfocytów B funkcje te są spełniane przez różne typy komórek. W pamięci reaktywnej pośredniczą komórki B pamięci, które proliferują i różnicują się do plazmocytołów w odpowiedzi na wtórną stymulację antygenową. W pamięci zabezpieczającej pośredniczą plazmocyty, które produkują przeciwciała (Tangye, 2009).

Podobny podział funkcji zaobserwowano w systemie limfocytów T. W zależności od przyjętego modelu, w pamięci reaktywnej pośredniczą centralne limfocyty T pamięci, które gromadzą się w strefie przykorowej wtórnych narządów limfoidalnych. Nie wykazują one funkcji efektorowych lub wykazują je w minimalnym stopniu i są zdolne do proliferacji i różnicowania w kierunku komórek efektorowych w odpowiedzi na stymulację antygenową. W pamięci obronnej pośredniczą efektorowe limfocyty T pamięci, które migrują do zakażonych tkanek i tam natychmiast wykazują działanie efektorowe (Sheridan, 2011).

Dzięki istnieniu zjawiska pamięci immunologicznej, odpowiedź wtórna rozwija się nie tylko szybciej, ale jest bardziej efektywna. Wytwarzanie i stężenie przeciwciał osiąga wyższe wartości, odpowiedź ta trwa dłużej, a wydzielane przeciwciała są bardziej dopasowane do antygeny (Tangye, 2009).

1.3.1. Limfocyty B pamięci

Komórki B pamięci powstają w trakcie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Różnią się od wykazujących tę samą swoistość limfocytów B pierwotnych (dziewiczych), które nie uczestniczyły jeszcze w odpowiedzi immunologicznej zwiększoną liczebnością, większym powinowactwem BCR do

antygeny, większą ilością białek MHC klasy II, łatwiej ulegają aktywacji, dłużej żyją i inaczej krążą w organizmie. Limfocyty B pamięci są większe i wykazują obecność takich białek jak: CD80, CD86 i CD95 oraz niższy poziom białka CD23 w porównaniu do limfocytów B dziewiczych (Tangye, 2009).

Obukhanych, (2006) wykazał, że u myszy T niezależna odpowiedź typu II na bakteryjne wielocukry prowadzi do ekspansji komórek B pamięci wyróżniających się obniżoną ekspresją białek: CD21 i CD23.

Ludzkie limfocyty B pamięci identyfikowane są głównie dzięki ekspresji białka CD27 (Yoshida, 2010). Komórki B CD27+ zlokalizowane są w strefie brzeżnej i ośrodkach rozmnażania grudek wtórnych narządów limfatycznych. Spośród limfocytów B IgM+ IgD+ obecnych we krwi i strefie brzeżnej tylko CD27+ charakteryzują się mutacjami we fragmencie genu kodującego Ig. Zmienność klas syntetyzowanych przeciwciał zachodzi częściej wśród komórek B CD27+ niż CD27-. Limfocyty B CD27+ po aktywacji wydzielają bardziej efektywnie przeciwciała niż komórki B CD27-. Komórki B krwi pępowinowej nie wyrażają białka CD27, natomiast odsetek komórek B CD27+ w krwi wzrasta wraz z wiekiem (Xiao, 2004). Limfocyty B pamięci CD27+IgM+ odgrywają bardzo istotną rolę w odpowiedzi na wielocukry pochodzące od drobnoustrojów otoczkowych wywołujących odpowiedź T-niezależną. Komórki te w znaczący sposób przyczyniają się do wtórnej odpowiedzi immunologicznej zarówno u człowieka jak i u gryzoni. Większość komórek B IgM+CD27+ wytwarzana jest w sposób zależny od istnienia ośrodków rozmnażania. Komórki te stanowią heterogenną populację limfocytów B, które pełnią wyspecjalizowane funkcje w różnych stadiach rozwoju (Tangye, 2009).

Agematsu, (2000) opisał proces rozwoju komórek B pamięci CD27+ w ośrodkach rozrodczych grudek wtórnych narządów limfatycznych u człowieka. Naiwne limfocyty B CD27- poprzez związanie białka CD40 z antygenem CD154 wyrażanym na powierzchni komórek T pomocniczych podlegały somatycznym hipermutacjom i oligoklonalnej ekspansji. W trakcie tych procesów wzrastała ekspresja białka CD27 na powierzchni niektórych komórek B, dzięki czemu różnicowały się w kierunku limfocytów B pamięci. Białko CD70 na powierzchni aktywowanego limfocyty T łącząc się z CD27 na komórce B pamięci wzmacniało

proces generacji plazmocytów zdolnych do produkcji przeciwciał. Po stymulacji *in vivo* przez *Staphylococcus aureus* w obecności IL-2, ludzkie limfocyty B CD27+ w przeciwieństwie do tych CD27- podlegały bardzo szybkiej aktywacji, różnicowały się do plazmocytów i były zdolne do produkcji wysokiego poziomu przeciwciał: IgA, IgM i IgG (Agematsu, 1997; Nagumo, 1998).

Charakterystycznym białkiem wyrażanym na aktywowanych limfocytach B jest CD19. Jest ono obecne już na wczesnych progenitorowych komórkach B i pozostaje na powierzchni tych komórek przez wszystkie stadia ich dojrzewania (Veneri, 2009). Białko CD19 jest niezbędne do procesu proliferacji aktywowanych limfocytów B w strefie grudkowych komórek dendrytycznych w ośrodkach rozrodczych wtórnych narządów limfatycznych. Wykazano, że myszy z deficytem CD19 charakteryzowały się upośledzoną zdolnością do tworzenia ośrodków rozmnażania oraz wadliwymi oddziaływaniami limfocytów B z grudkowymi komórkami dendrytycznymi (Carter, 2008).

1.3.2. Komórki plazmatyczne

Dojrzałe limfocyty B pamięci lub komórki plazmatyczne (plazmocyty) zdolne do produkcji przeciwciał wyrażają następujące białka powierzchniowe: CD27, CD138, CD38 i CD19, natomiast nie wyrażają: CD10, CD20, CD117 i CD56 (Avery, 2005).

Komórki produkujące przeciwciała wytwarzano *in vitro* w hodowli ludzkich limfocytów B pamięci z komórkami stromalnymi szpiku kostnego lub aktywowanymi limfocytami T (Veroino, 1992; Merville, 1995) ze stymulantami pochodzącymi od komórek T, czyli białkiem CD40L, IL-2 i IL-10 (Arpin, 1995; Tangye, 2003) lub grudkowymi komórkami dendrytycznymi i białkiem CD40L, IL-2, IL-4 i IL-10 (Choe, 1998; Jung, 2000).

Pomimo, że proces różnicowania limfocytów B pamięci w kierunku komórek plazmatycznych jest oparty na ekspresji białka CD38, zależny od IL-10 i związany ze wzrostem częstotliwości podziałów komórkowych, to mniej niż 50 procent komórek B wyrażało białko CD38, a pozostałe komórki produkujące przeciwciała stanowiła populacja CD38-. Dlatego uznano, że fenotyp CD38+ nie identyfikuje ostatecznie komórek produkujących przeciwciała. Wykazano wysoką

ekspresję białka CD27 na różnicujących się komórkach B pamięci powstałych na drodze zależnej od obecności IL-10, związanej z podziałami komórek. Komórki produkujące przeciwciała określane są na podstawie podwyższonej ekspresji CD27 na aktywowanych limfocytach B pamięci, niezależnie od poziomu ekspresji CD38. Hodowla limfocytów B pamięci CD27+ z białkiem CD70 lub czynnikiem aktywacji limfocytów B pochodzącym z rodziny TNF przyczynia się do wzrostu ekspresji białka CD38 na powierzchni tych komórek oraz zwiększonej produkcji przeciwciał. Aktywowane komórki B pamięci CD27+CD38+ odpowiadają na chemotaktyczne działanie chemokiny CXCL12 podobnie do pierwotnych komórek plazmatycznych (Avery, 2005).

Subpopulacja limfocytów CD27+CD38- jest fenotypowo bardzo zbliżona do komórek CD27+CD38+ i ma identyczną zdolność do produkcji przeciwciał. Jednak stymulacja czynnikiem aktywacji limfocytów B wywiera na nie słabszy wpływ w porównaniu z komórkami CD38+. Limfocyty CD38+ proliferują częściej od komórek CD38- co kwalifikuje je do grupy tzw. późnych plazmoblastów. Komórki CD27+CD38- produkują więcej przeciwciał klasy IgM w porównaniu do komórek CD27+CD38+ (Avery, 2005). Populacja komórek B CD38- produkująca przeciwciała, która wydaje się być prekursorem komórek CD38+ została zidentyfikowana w ludzkich migdałkach (Arce, 2004).

Ludzkie komórki produkujące przeciwciała odpowiadają opisanym mysim komórkom plazmatycznym pozbawionym ekspresji CD138 (Kallies, 2004; Underhill, 2003). Mogą być one zidentyfikowane na podstawie ekspresji białka CD27, natomiast poziom ekspresji białka CD38 różnicuje je na wczesne (CD38-) i późne (CD38+) plazmoblasty. Późne plazmoblasty wytworzone w tkankach limfoidalnych ostatecznie migrują do szpiku kostnego, jelita i czerwonej miazgi śledziony jako długo przeżywające komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała (Avery, 2005).

Huggins, (2007) wykazał, że zarówno naiwne limfocyty B CD19+CD27- jak i komórki B pamięci CD19+CD27+ pochodzące z krwi obwodowej, immunizowane fragmentami CpG bakteryjnego DNA z sekwencyjnymi krokami podejmowanymi w celu uzyskania T-niezależnej aktywacji, różnicowały się w kierunku komórek plazmatycznych CD138+. Obie subpopulacje komórek B charakteryzowały się

wysoką ekspresją TLR-9 i nabywały fenotyp charakterystyczny dla komórek plazmatycznych: CD19^{niska}CD20^{niska}CD27+CD38+HLADR^{niska}. Plazmocyty wytworzone z komórek B pamięci CD27+ wyrażały przede wszystkim IgG, natomiast te uzyskane z komórek CD27- IgM (Huggins, 2007).

1.3.3. Limfocyty T pamięci

Limfocyty T pamięci charakteryzują się większą zdolnością oczyszczania z obcych antygenów w porównaniu do komórek T naiwnych. Receptory wiążące antygen limfocytów T naiwnych i pamięci charakteryzują się podobnym powinowactwem do antygeny. Wyrażają jednak różny poziom niektórych cząsteczek powierzchniowych, np. różne formy fosfatazy tyrozynowej CD45, która bierze udział w aktywacji limfocytów. Limfocyty T pamięci człowieka, w przeciwieństwie do komórek T naiwnych, wyrażają niski poziom cząsteczki CD45RA i wysoki CD45RO (Gołąb, 2002). W obwodowej limfie człowieka znajduje się więcej limfocytów CD45RO niż we krwi (Olszewski, 1995).

Limfocyty T pamięci charakteryzują się wysoką ekspresją białek powierzchniowych: CD2, VLA i CD11a, które uczestniczą w przyleganiu do komórek prezentujących antygen. Dzięki temu komórki T pamięci łatwiej ulegają aktywacji, szybciej proliferują i wydzielają więcej cytokin. Do pobudzenia limfocytów T pamięci niezbędny jest tylko sygnał przez pobudzenie receptora TCR, a w mniejszym stopniu potrzebna jest kostymulacja przez białko CD28. Subpopulacja tych komórek posiada receptory dla białek MHC klasy I, które przekazują sygnał hamujący aktywację. Prawdopodobnie receptory te chronią limfocyty pamięci przed śmiercią indukowaną przez aktywację i uczestniczą w zapewnieniu im długowieczności. Zaobserwowano dłuższe przeżycie limfocytów T pamięci z receptorem TCR o większej specyficzności antygenowej (Gołąb, 2002).

Bazując na ekspresji białek uczestniczących w przyleganiu komórek oraz receptorów immunoglobulinowych występujących po zakażeniu wywołanym patogenem, określono dwie różne subpopulacje limfocytów T pamięci CD4+ lub CD8+. Centralne limfocyty T pamięci wykazują obecność na swej powierzchni białek: CD62L i CCR7, dzięki którym z łatwością napływają do wtórnych narządów limfatycznych. Lokalizacja w węzłach chłonnych przyczynia się do ich kluczowej

roli w protekcji odpowiedzi immunologicznej. Efektorowe komórki T pamięci nie wyrażają na swej powierzchni białek: CD62L i CCR7 i obecne są głównie w tkankach obwodowych (Pepper, 2011).

Laouar, (2008) opisał metodę wytwarzania centralnych komórek T pamięci CD8+ *in vitro*. Stymulowane antygenem limfocyty T CD8+ hodowano w obecności IL-15. Po 7 dniach wyrażały one wysoki poziom białek: CD44, CD62L i CCR7. *In vivo* komórki te miały zdolność długiego przeżywania i w bardzo krótkim czasie wywoływały antygenowo specyficzną odpowiedź immunologiczną. Komórki te migrowały do wszystkich wtórnych narządów limfatycznych. Migracja ta zachodziła przez żyłki pozawłosowate (HEV) i była zależna od ekspresji L-selektyny (CD62L).

1.4. Odpowiedź komórek regionalnego węzła chłonnego na wtórną stymulację antygenem pochodzącym z tkanek obwodowych

Receptory limfocytów B podobnie jak receptory limfocytów T i wolne przeciwciała łączą się specyficznie z antygenami, co uruchamia w tych komórkach kaskadę zdarzeń prowadzącą do ich aktywacji. Dzięki procesowi opsonizacji z udziałem przeciwciał, komórki żerne (np. makrofagi) z łatwością pochłaniają i trawią antygeny. Przeciwciała uczestniczą w aktywacji układu dopełniacza, neutralizują toksyny, wirusy oraz mają zdolność blokowania adhezyn bakteryjnych. Umożliwiają także uruchomienie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał i związanej z degranulacją komórek NK. Jest to ważna funkcja stanowiąca ochronę przed niektórymi patogenami, ale także nowotworami (Jasiulewicz, 2011).

1.4.1. Odpowiedź limfocytów B pamięci i komórek plazmatycznych na restymulację antygenową

Generacja wtórnej odpowiedzi limfocytów B zachodzi dzięki interakcji z antygenem utrzymywanym w formie immunokompleksów obecnych na grudkowych komórkach dendrytycznych (Aguzzi, 2014). Jednak Anderson, (2006) udowodnił, że ten antygen nie jest niezbędny do utrzymania odpowiedniej ilości limfocytów B pamięci i wydajnej wtórnej odpowiedzi immunologicznej.

Utrzymanie odpowiedzi komórek B pamięci jest niezależne od rodzaju immunizującego antygeny i jego formy. Myszy pozbawione możliwości produkcji przeciwciał nie wykazują również depozytów antygenów w formie immunokompleksów na grudkowych komórkach dendrytycznych. Charakteryzują się jednak normalną odpowiedzią ośrodków rozmnażania i wszystkich procesów zachodzących podczas wtórnej odpowiedzi komórek B (Obukhanych, 2006).

Odpowiedź limfocytów B sklasyfikowana została jako T-zależna lub T-niezależna, odpowiednio od zaangażowania limfocytów T pomocniczych w produkcji przeciwciał. T-zależnymi antygenami są białka przetwarzane i prezentowane z udziałem białek MHC klasy II antygenowo pokrewnym komórkom T pomocniczym (Obukhanych, 2006). T-zależne antygeny wywołują odpowiedź komórek B pamięci w T zależnych ośrodkach rozrodczych wtórnych narządów limfatycznych. W ośrodkach rozmnażania wtórnych narządów limfatycznych indukowanych w późnych etapach odpowiedzi T-zależnej może zachodzić selekcja pozytywna komórek B pamięci o wysokim powinowactwie do antygeny oraz selekcja negatywna autoreaktywnych komórek B pamięci, z dużej puli komórek powstałych podczas ostrej fazy odpowiedzi. Selekcja może zachodzić poprzez interakcje z grudkowymi komórkami dendrytycznymi tworzącymi siatkę, komórkami T pomocniczymi, które mogą nawet hamować indukcję, lub poprzez formowanie jasnej i ciemnej strefy wyspecjalizowanej do promowania proliferacji komórek B, hypermutacji i różnicowania. W rezultacie powstaje mało, ale o bardzo wysokiej specyficzności klonów komórek B pamięci, pozwalając strefom pamięci jednocześnie być w posiadaniu efektywnej immunogenności w stosunku do szerokiej rangi patogenów, przy użyciu minimalnej liczby komórek B. W fazie końcowej powstają wtórne komórki produkujące przeciwciała (Manser, 2004).

Jeżeli układ immunologiczny ma doczynienia z antygenem T-niezależnym, wówczas komórki B samodzielnie aktywują się poprzez wiązanie tego antygeny z wieloma przeciwciałami na swojej powierzchni (Gołąb, 2009). T-niezależne antygeny podzielone zostały na dwa typy - I i II. Do antygenów T-niezależnych typu I należą CpG bakteryjnego DNA i LPS pochodzący od bakterii Gram (-). Wywołują one aktywację limfocytów B poprzez TLR. T-niezależne antygeny typu II, do których należy np. *Streptococcus pneumoniae*, wiążą się z receptorem na

powierzchni komórki B (BCR) i indukują antygenowo specyficzną odpowiedź komórek B (Obukhanych, 2006). T-niezależne antygeny typu II wywołują silną i długoterminową pierwotną odpowiedź związaną z produkcją przeciwciał u myszy. Stymulują produkcję komórek plazmatycznych na zewnątrz grudek chłonnych, które prawdopodobnie krótko przeżywają z powodu nie wykształconych do końca ośrodków rozmnażania (Garcia de Vinuesa, 1999). Nie jest do końca zbadane, czy T-niezależne antygeny typu II odpowiedzialne są za wytwarzanie komórek B pamięci.

Obukhanych, (2006) wykazał u myszy, że T niezależna odpowiedź typu II jest związana z wytwarzaniem limfocytów B pamięci i wtórna stymulacja wielocukrami pochodzącymi od bakterii *Streptococcus pneumoniae* przyczynia się do produkcji antygenowo specyficznego przeciwciała klasy IgG.

Badania na ludzkich komórkach B wykazały, że głównym markerem i mediatorem wtórnej odpowiedzi aktywowanych limfocytów B na obcy antygen jest białko CD27. Stymulacja CD27 na komórkach B przez antygen CD28 na limfocytach T pomocniczych umożliwia formowanie ośrodków rozrodczych i promuje ekspansję centroblastów (Xiao, 2004).

Mysie limfocyty B będące w stadium centroblastów charakteryzują się ekspresją białka CD27. Uczestniczy ono w formowaniu ośrodków rozmnażania w grudkach wtórnych narządów limfatycznych, różnicowaniu w kierunku plazmacytów oraz produkcji przeciwciał. Ekspresja białka CD27 na komórkach B CD19+ w węzłach chłonnych myszy jest bardzo wysoka w trakcie trwania fazy ekspansji pobudzonych limfocytów B (Xiao, 2004).

1.4.2. Odpowiedź limfocytów T pamięci na restymulację antygenową

Wtórna odpowiedź limfocytów T pamięci jest o wiele szybsza od pierwotnej. Generuje ona znacznie większą liczbę komórek efektorowych, które są zdolne do wydzielania cytokin o właściwościach cytotoxicznych, już w czasie 1 godziny po restymulacji antygenowej (Gołąb, 2002).

Odpowiedź limfocytów T pamięci na wtórne zakażenie zachodzi w trzech różnych fazach. Antygenowo specyficzne limfocyty T pamięci obecne w tkankach obwodowych jako pierwsze odpowiadają na antygen. Po rozpoznaniu patogenu

komórki te proliferują i generują wtórną efektorową odpowiedź komórek T. Miejscowe zapalenie powoduje rekrutację na drodze chemotaksji antygenowo specyficznych i niespecyficznych limfocytów T pamięci z krążenia do zakażonych tkanek. Wiele z limfocytów T pamięci nie wykazuje odpowiednio wysokiej specyficzności antygenowej, więc mała ilość specyficznych dla danego antygenu limfocytów T pamięci rekrutowana do tkanek objętych zapaleniem generuje wtórną, miejscową, efektorową odpowiedź komórek T pamięci. Po upływie 24-72 godzin komórki dendrytyczne, które pochłonęły antygen w tkankach obwodowych, migrują do drenujących węzłów chłonnych i aktywują rezydujące limfocyty T pamięci. Duża liczba wtórnie antygenowo specyficznych limfocytów T efektorowych generowana z miejscowych komórek T pamięci opuszcza regionalne węzły chłonne i z krążeniem dociera do tkanek obwodowych objętych zakażeniem (Woodland, 2009).

U szczura proces ekspozycji komórek T na specyficzny antygen nie tylko przyczynia się do zmiany masy molekularnej CD45RC z wysokiej (CD45RC+) do niskiej (CD45RC-), ale również stymuluje zmiany w ekspresji cząsteczek uczestniczących w przyleganiu komórek do siebie, które regulują migrację limfocytów T. Komórki T CD4+ o fenotypie charakterystycznym dla limfocytów aktywowanych lub pamięci (CD45RC-) migrują do węzłów chłonnych często drogą doprowadzających naczyń limfatycznych, podczas gdy komórki T w stanie spoczynkowym (CD45RC+) migrują do węzła drogą krwionośną przez włóscizki żyłne (HEV). Dojrzałe limfocyty T CD45RC- u szczura po spotkaniu specyficznego antygeny charakteryzują się szybszą migracją z krwi do limfy doprowadzającej w porównaniu do populacji komórek T CD45RC+. Wykazano również, że mogą napływać do regionalnych węzłów chłonnych drogą krwionośną (Sparshott, 1998). Ostatecznie dopuszcza się dwie drogi napływu tych komórek do węzłów chłonnych: drogą limfy doprowadzającej i drogą krwionośną. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność tych limfocytów pomiędzy sąsiadującymi komórkami śródbłonna włóscizek żylnych (HEV) co może ułatwiać im szybki napływ do strefy przykorowej, a następnie do rdzenia węzła chłonnego. Z tego powodu limfocyty T CD45RC- szybciej pojawiają się w limfie przewodu piersiowego w porównaniu do komórek T CD45RC+. W badaniach na ptakach

udokumentowano wysoką liczbę limfocytów T CD45RC- w limfie doprowadzającej, natomiast w limfie odprowadzającej większą liczbę komórek T CD45RC+ (Mackay, 1990). W środowisku pozbawionym specyficznego antygeny komórki T CD45RC- posiadają zdolność ponownego nabywania fenotypu charakterystycznego dla spoczynkowych limfocytów T CD45RC+. Szybkość przełączania fenotypu może być różna w zależności od grupy organizmów. U człowieka proces ten następuje wolno i dość rzadko (McLean, 1995). U szczura przebiega bardzo gwałtownie i wielokrotnie (Sparshott, 1994; Sarawar, 1993).

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

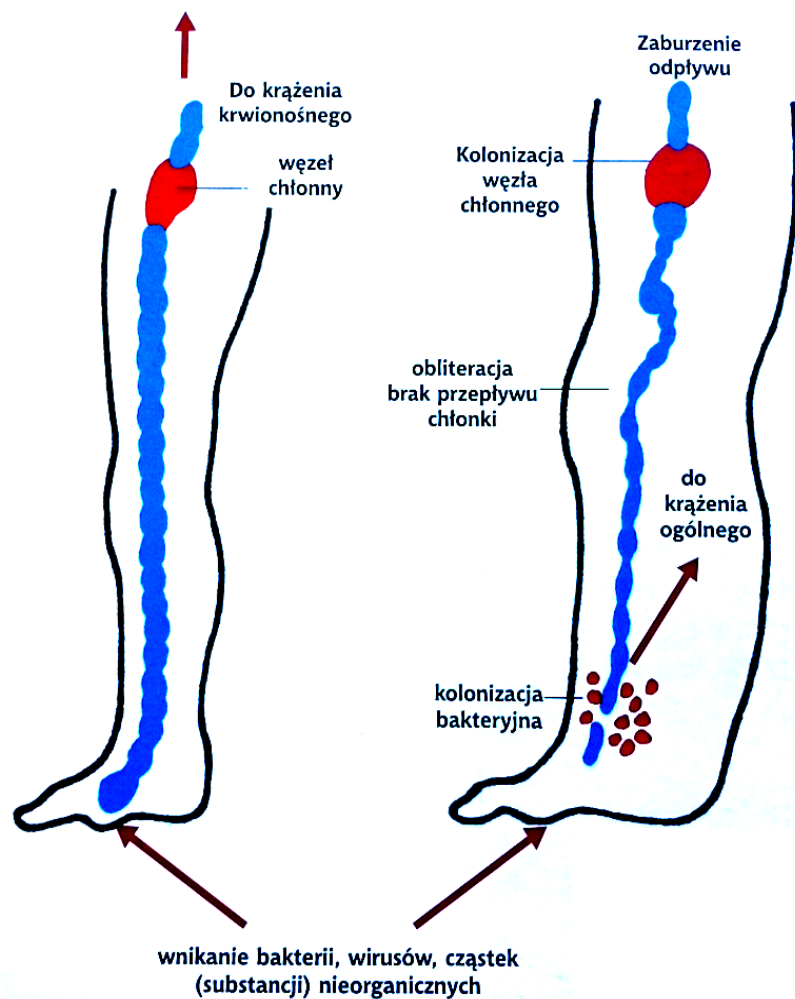
Skóra kończyn dolnych człowieka zasiedlana jest przez drobnoustroje pochodzące z kontaktu stóp ze środowiskiem, oraz z okolicy krocza i odbytu. Drobnoustroje te zachowują się jak saprofity i nie wywołują reakcji gospodarza (Jenkinson, 1993).

Stopy ulegają stale mikrourazom, w czasie których drobnoustroje penetrują naskórek. W skórze rozpoznawane są przez komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty i wraz z tymi komórkami transportowane do regionalnych węzłów chłonnych (Olszewski, 2001). Drobnoustroje można wykryć w normalnych węzłach pachwinowych u osobników bez zmian w skórze kończyn (Olszewski, 1997). Są to głównie *Staphylococcus epidermidis* lub inne koagulazonegatywne *Staphylococci*, rzadziej *Baccilli* i *Corynebacterium* (Olszewski, 1999). Mała masa bakterii normalnie transportowanych drogą chłonną nie wywołuje odpowiedzi zapalnej gospodarza. Proces ten nie jest więc rozpoznawany klinicznie. Ta fizjologiczna penetracja drobnoustrojów jest procesem ciągłym. Miejscem eliminacji drobnoustrojów drenowanych ze skóry są węzły chłonne.

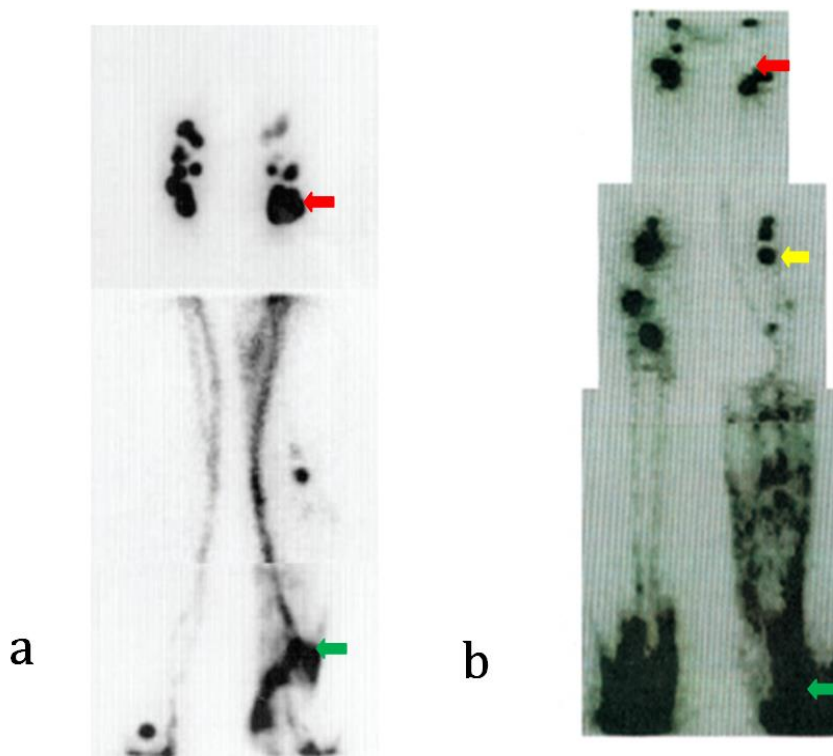
Wydaje się, iż w węzłach wytwarza się po pierwszym kontakcie z drobnoustrojami pamięć immunologiczna, która pozwala na szybkie usunięcie (inaktywację) powtórnie wnikającego antygeny. W ten sposób węzeł chłonny jest w stanie stałego „alertu immunologicznego” dzięki czemu kolejne wnikania drobnoustrojów, nawet w większej masie, przebiegają bez objawów klinicznych. Pośrednim dowodem na to, iż węzły chłonne eliminują penetrujące drobnoustroje jest obserwacja częstych ostrych bakteryjnych stanów zapalnych skóry i tkanki podskórnej w przypadku braku węzłów, np. po ich wycięciu w nowotworach, głównie po limfadenektomii pachowej w raku sutka lub pachwinowej w czerniaku skóry kończyn dolnych (Olszewski, 1991; 1996 c). Stany te są bardzo skutecznie leczone za pomocą antybiotyków, co potwierdza ich bakteryjną etiologię (Olszewski, 1996 a).

Po wniknięciu dużej masy bakterii do skóry i tkanki podskórnej, samoistnie lub przy otwartych urazach kończyn, odpowiedź węzłów wyraża się ich szybkim powiększeniem, bolesnością przy dotyku oraz podwyższoną ciepłotą tkanki.

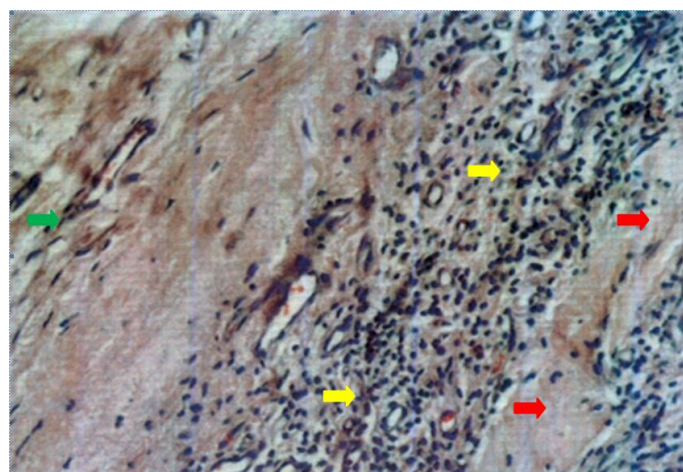
Jeśli proces zapalny wywołany miejscową proliferacją drobnoustrojów trwa długo, np. w przypadku niegojącej się rany, wówczas dochodzi do apoptozy i martwicy elementów limfoidalnych węzłów, a następnie ich włóknienia (Olszewski, 1999; Olszewski, 1996 b). Proces włóknienia obejmuje także naczynia chłonne. Powstaje zastój chłonny wikłany bakteryjnymi zapaleniami skóry i węzłów szczepami penetrującymi skórę (Olszewski, 1994; Olszewski, 2001; Olszewski, 2011), (Ryc. 3-6).



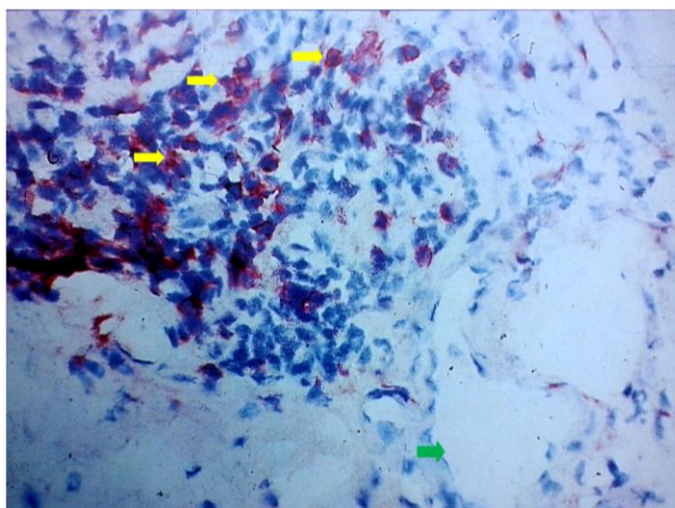
Ryc. 3. Schemat przedstawiający zaburzenie odpływu chłonnego w kończynie dolnej z postępującym gromadzeniem się penetrujących skórę mikroorganizmów. Następuje kolonizacja tkanek przez drobnoustroje oraz ich rozprzestrzenienie się drogą naczyń krwionośnych (Olszewski, 2006; Olszewski, 2011).



Ryc. 4. Zdjęcie limfoscintygraficzne kończyn dolnych chorych z obrzękiem limfatycznym kończyny lewej; a - widoczne owrzodzenie podudzia lewego (oznaczone zieloną strzałką) oraz powiększone pachwinowe węzły chłonne (oznaczone czerwoną strzałką), (Olszewski, 2012), b - obrzęk będący następstwem ostrego zapalenia skóry, widoczna atrofia pachwinowych węzłów chłonnych z ograniczonym magazynowaniem znacznika izotopowego (oznaczone czerwoną strzałką), powiększone podkolanowe węzły chłonne (oznaczone żółtą strzałką) oraz znaczne nagromadzenie izotopu w stopie (oznaczone zieloną strzałką) (Olszewski, 2001).



Ryc. 5. Histologiczny obraz fragmentu zwłókniałego węzła chłonnego chorego z kończyną dolną objętą obrzękiem limfatycznym i chronicznym zapaleniem skóry. Po lewej stronie ścieńczona torebka węzła (oznaczona zieloną strzałką), w środku niewielka ilość pozostałych limfocytów (oznaczone żółtymi strzałkami), po prawej zwłókniały fragment węzła pozbawiony limfocytów (oznaczony czerwonymi strzałkami), (Olszewski, 2001).



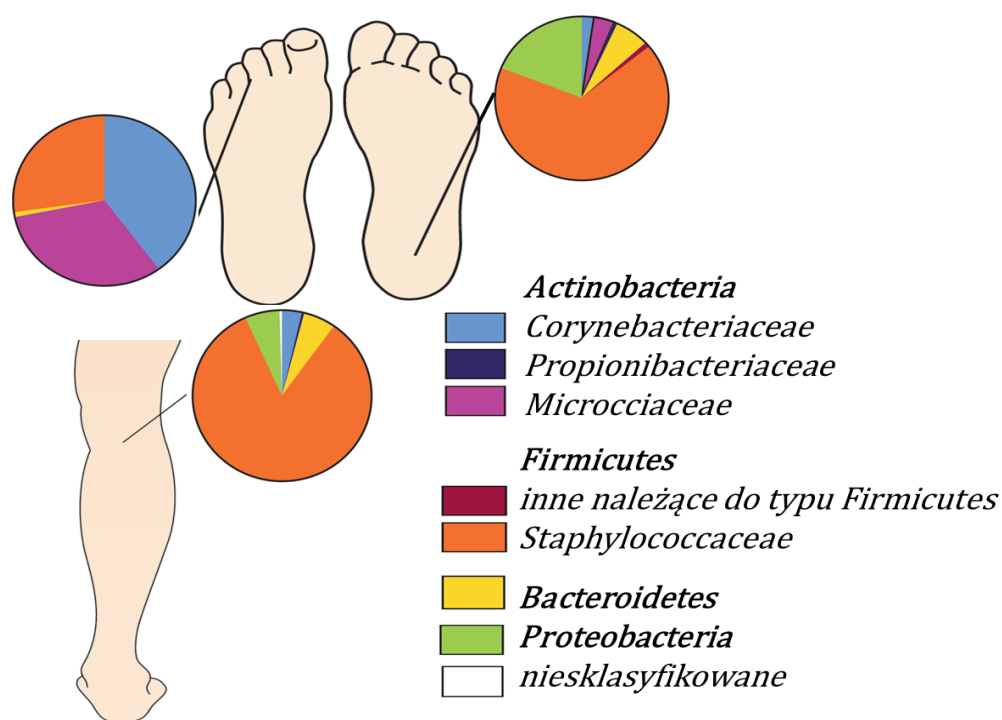
Ryc. 6. Fragment pachwinowego węzła chłonnego chorego z kończyną dolną objętą obrzękiem chłonnym w stadium III. Widoczne zmniejszenie liczby limfocytów z pozostałością nielicznych komórek CD4+ (T pomocnicze, czerwony kolor, przykładowo oznaczone żółtymi strzałkami). Pozostaje jedynie szkielet węzła z kanałami chłonnymi o poszerzonym świetle (oznaczone zieloną strzałką). Brak normalnej struktury węzła z zatokami podtorebkowymi, korowymi i rdzeniowymi, x 400, barwienie przeciwciałem monoklonalnym przeciwko białku CD4, (Olszewski, 2006).

Obserwacje te wskazują na szczególną rolę węzłów chłonnych w miejscowej odporności. W niektórych przypadkach dalsze, przewlekłe pobudzenie antygenem bakteryjnym u osobników ze zniszczonymi węzłami prowadzi do tworzenia się „nowych” węzłów lub rozrostu grudek chłonnych do rozmiarów węzłów (Olszewski, 2002).

Najczęstszymi drobnoustrojami normalnie kolonizującymi skórę stopy i podudzia człowieka są ziarenkowce (*cocci*), które stanowią około 60 procent spośród wszystkich wyizolowanych szczepów bakteryjnych. Wśród nich, w około 90 procentach z posiewów hodowano *Staphylococcus epidermidis* i inne koagulazo-negatywne szczepy. Pozostałe szczepy występujące w mniejszych ilościach to *Escherichia coli*, *Citrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Proteus sp.* oraz *Bacillus cereus*. Z posiewów limfy ludzkich kończyn dolnych zdrowych wolontariuszy w 12 procentach hodowano *Staphylococcus epidermidis* (Olszewski, 1997; 1999).

Według Grice, (2011); (Ryc. 7) w skład normalnej mikroflory skóry przestrzeni pomiędzy palcami stopy człowieka wchodzi drobneustroje z rodzin: *Staphylococcaceae*, *Micrococciaceae*, *Corynebacteriaceae*, a także z typu

Bacteroidetes. Skóra spodu pięty zasiedlona jest w około 60 procentach przez szczepy z rodziny *Staphylococcaceae*, *Proteobacteria*, *Corynebacteriaceae*, *Microcciaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Bacteroidetes*, a także inne z typu *Firmicutes*. Skóra dołu podkolanowego kończyn dolnych człowieka zasiedlona jest w około 80 procentach przez szczepy z rodziny *Staphylococcaceae*, a także z rodziny *Corynebacteriaceae*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Propionibacteriaceae* i inne dotychczas niesklasyfikowane.



Ryc. 7. Udział i topografia szczepów bakteryjnych normalnie zasiedlających skórę stopy i podudzia kończyny dolnej człowieka w/g Grice, (2011).

Najczęściej izolowanymi drobnoustrojami obecnymi w posiewach z płynu tkankowego, limfy, pachwinowych węzłów chłonnych, skóry i tkanki podskórnej chorych z zastojem chłonnym i ostrą postacią *dermatolymphangiadenitis* (DLA) były: *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus xylosus*, *Micrococcus spp.*, *Acinetobacter spp.* (Olszewski, 1991; Olszewski, 1999; Olszewski, 2011).

Nawet w normalnych tkankach kończyny dolnej, nie zmienionych zapalnie, można wykryć obecność drobnoustrojów (Szczęsny, 2008).

Przedstawione obserwacje kliniczne wskazują na rolę węzłów chłonnych w rozpoznawaniu bakterii pochodzących ze skóry kończyn dolnych i w ich eliminacji. Szybkość tych procesów świadczy o istnieniu pamięci immunologicznej. Niezbędne jest w związku z tym poznanie reakcji węzłów na ekspozycję na bakterie dotychczas uważane za saprofity na poziomie komórkowym, w tym:

- a. jaki jest fenotyp komórek węzła ulegających aktywacji pod wpływem antygeny bakteryjnego?
- b. czy ma miejsce redystrybucja topograficzna komórek węzła związana ze zwiększoną rekrutacją z naczyń krwionośnych i limfatycznych?
- c. które z komórek węzła mogą należeć do populacji komórek regulatorowych ograniczających zakres odpowiedzi immunologicznej w kontakcie z komórkami efektorowymi?
- d. które należą do komórek pamięci?

CELEM PRACY BYŁO UZYSKANIE ODPOWIEDZI NA NASTĘPUJĄCE PYTANIA:

1. Jakie ilościowe i fenotypowe zmiany w populacji komórek regionalnych węzłów chłonnych rozwijają się pod wpływem pierwotnego zakażenia skóry *Staphylococcus epidermidis*?
2. Czy wtórna odpowiedź komórek węzłów na stymulację tym samym drobnoustrojem jest w swym efekcie komórkowym bardziej nasiloną, czy też obniżoną w porównaniu do odpowiedzi pierwotnej?
3. Czy pod wpływem pierwotnej ekspozycji na *Staphylococcus epidermidis* powstaje w węzłach populacja komórek „pamięci immunologicznej” i zwiększa się ilość limfocytów T regulatorowych, które modulują wtórną odpowiedź?

W piśmiennictwie istnieje niewiele pozycji dokumentujących odpowiedź populacji komórek regionalnych węzłów chłonnych na bakterie pochodzące z własnej skóry i zasiedlające tkanki w miejscu urazu. Odpowiedź na powyższe pytania pozwoliłaby lepiej zrozumieć procesy miejscowej odporności antybakteryjnej tkanek kończyn fizjologicznie ekspozowanych na środowisko bakteryjne i uzasadnić wczesne stosowanie antybiotyków, w celu ograniczenia proliferacji bakteryjnej prowadzącej do zmniejszenia liczby komórek węzłów

chłonnych, występującego przy przewlekłych bakteryjnych stanach zapalnych skóry i tkanki podskórnej. Zapalenia takie obserwuje się u około 40 procent chorych z zastojem limfatycznym kończyn (Olszewski, 2011).

Zagadnienie jest trudne do zbadania u człowieka ze względu na ograniczoną dostępność i ilość materiału. Poza tym, częste w życiu osobniczym uprzednie pobudzenia komórek węzłów człowieka drobnoustrojami (np. w czasie mikrourazów) nie pozwoliłoby na zbadanie pierwotnej reakcji na antygen bakteryjny. Dlatego zdecydowałam się przeprowadzić badania na szczurach, które odpowiadają odczynem zapalnym na bakterie pochodzące z kończyn człowieka. Z wielu gatunków bakterii wyizolowanych ze skóry stopy i podudzia człowieka wybrałam jeden najczęściej występujący t.j. *Staphylococcus epidermidis*. Ten drobnoustrój należy również do normalnej skórnej flory bakteryjnej szczurów (Kahn, 2010). Skóra grzbietu myszy w 63 procentach zasiedlona jest przez szczepy z rodziny *Staphylococcaceae* (Shen, 2014).

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Wszystkie badania zostały wykonane za zgodą i lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie, Uchwała nr 702/2006 z dnia 19 października 2006r.

Doświadczenia wykonano na 49 szczurach (98 podkolanowych węzłach chłonnych) szczepu wsobnego rasy Wistar-Wag, płci męskiej w wieku 3 miesięcy, o masie ciała mieszczącej się w przedziale 230g-250g, pochodzących z hodowli Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk. Doświadczenia przeprowadzano w znieczuleniu ogólnym 3,6% wodzianem chloralu podawanym dootrzewnowo w dawce 1ml na 100g masy ciała.

3.2. Metoda zakażenia bakteriami

Do doświadczeń wykorzystano jeden z gatunków bakterii wyizolowanych ze zdrowej skóry ludzkich kończyn dolnych t.j. podudzia, palucha i z pomiędzy 2 a 3 palca stopy: *Staphylococcus epidermidis*. Drobnoustrój namnażano, przechowywano i przygotowywano do iniekcji w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Medycznej w Warszawie. Ten sam gatunek bakterii przeznaczony do iniekcji izolowano bezpośrednio z podłoża Mueller-Hinton Agar (Oxoid) i podawano w zagęszczeniu 2 McFarlanda / 1ml soli fizjologicznej, co jest równe 6×10^7 żywych komórek bakteryjnych zawieszonych w 0.1 ml 0.9 % roztworu soli fizjologicznej. Zagęszczenie drobnoustrojów oceniano w densytometrze (BioMerieux).

We wszystkich badanych grupach zawiesinę bakterii lub odpowiednią objętość 0.9 % roztworu soli fizjologicznej wstrzykiwano podskórnie, pomiędzy 2 a 3 palec grzbietu kończyny tylnej szczura.

Wyszczególniono 4 grupy zwierząt o następującej charakterystyce:

GRUPA KONTROLNA - podawano 0.1 ml jałowego 0.9 % roztworu soli fizjologicznej przez 7 kolejnych dni. 24 godziny po ostatnim podaniu roztworu soli izolowano podkolanowe węzły chłonne, $n=17$ zwierząt (34 węzły chłonne).

GRUPA Z ZAKAŻENIEM PIERWOTNYM I WCZESNĄ IZOLACJĄ MATERIAŁU

- podawano 0.1 ml zawiesiny *Staphylococcus epidermidis* przez 7 kolejnych dni. 24 godziny po ostatnim podaniu zawiesiny bakterii izolowano podkolanowe węzły chłonne, $n=11$ zwierząt (22 węzły chłonne).

GRUPA Z ZAKAŻENIEM PIERWOTNYM I PÓŹNĄ IZOLACJĄ MATERIAŁU

- podawano 0.1 ml zawiesiny *Staphylococcus epidermidis* przez 7 kolejnych dni. Podkolanowe węzły chłonne izolowano po 21 dniach od ostatniego podania zawiesiny bakterii, $n=7$ zwierząt (14 węzłów chłonnych).

GRUPA Z ZAKAŻENIEM WTÓRNYM I WCZESNĄ IZOLACJĄ MATERIAŁU

- podawano 0.1 ml zawiesiny *Staphylococcus epidermidis* przez 7 kolejnych dni, a po 21 dniach przerwy podawano jednorazowo taką samą dawkę bakterii. Podkolanowe węzły chłonne izolowano po 24 godzinach od ostatniego podania zawiesiny bakterii, $n=14$ zwierząt (28 węzłów chłonnych).

3.3. Określenie zmian ilościowych poszczególnych supopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych metodą cytometrii przepływowej

3.3.1. Izolacja komórek

Świeżo wyizolowane od szczura podkolanowe węzły chłonne ważono na wadze laboratoryjnej (Mettler Toledo, XS205 Dual Range).

Komórki węzłów wyczesywano jałowymi igłami iniekcyjnymi w płynie RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) z dodatkiem 5% surowicy cielęcej (FCS). Następnie przesączano przez filtr zestawu do dożylnych wlewów kroplowych (Farmachin, Sofia) i płukano 2x w RPMI 1640 + 5% FCS. Liczbę wyizolowanych komórek oceniano w mikroskopie świetlnym (BX40 Olympus, Germany) przy użyciu kamery Búrker. Limfocyty zliczano przy powiększeniu 400x stosując regułę dwóch boków. Żywotność komórek oceniano przy użyciu błękitu trypanu.

3.3.2. Znakowanie immunocytochemiczne komórek

Znakowanie miało na celu określenie proporcji poszczególnych subpopulacji komórkowych węzła w zawieszynie 10.000 komórek wyznakowanych przeciwciałami.

Użyto mysich przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom szczura anty: W3/13, W3/25, OX8, B, OX12, OX33, CD31, OX7, CD54, OX62 z biotyną, CD4 FITC, OX6 FITC, CD62L FITC, ED1 PE, CD25 PE i kontroli izotypowych wyprodukowanych u szczura IgG2a, IgG1 (Serotec, Ltd, England), CD8a PerCP, CD45RC PE, CD4 PE Cy-5 i kontroli izotypowych wyprodukowanych u szczura IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG2a PECy-5 (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Lose, USA), IgG1 PerCP (BioLegend, San Diego, California, USA), przeciwciał monoklonalnych wyprodukowanych u chomika armeńskiego skierowanych przeciwko antygenom szczura anty: CD27 z biotyną (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Lose, USA) i kontroli izotypowej IgG FITC wyprodukowanej u chomika armeńskiego (BioLegend, San Diego, California, USA) oraz przeciwciała poliklonalnego koziego skierowanego przeciwko antygenom szczura anty CD19 PE (Santa Cruz Biotechnology, USA) i kontroli izotypowej IgG PE wyprodukowanej u kozy (BioLegend, San Diego, California, USA).

Zastosowano podwójne i potrójne barwienie komórek przeciwciałami anty:
OX8+PE + OX6 FITC,
W3/25+PE + OX6 FITC,
W3/13+PE + OX6 FITC,
CD4 FITC + CD25 PE,
CD8a PerCP + CD62L FITC + CD45RC PE,
CD4 PECy-5 + CD62L FITC + CD45RC PE,
CD27+FITC + CD19 PE .

Etap 1.

Do 100 μ l zawiesziny komórek o gęstości 10^6 /ml w PBS x 1 z dodatkiem 1 % FCS dodawano 100 μ l 50% normalnej surowicy króliczej i inkubowano w temp. pokojowej przez 20 min. Próbkę ED1 PE i kontrolę izotypową IgG1 PE poddawano wcześniej 10 minutowej permabilizacji (permabilizator rozcieńczony 1:10 z wodą destylowaną) (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Lose, USA), a

następnie 2x płukano dodając 4ml PBS + 1% FCS i wirowano przez 7 min. przy wielkości $g = 160$. Po inkubacji z surowicą króliczą zawiesinę wirowano przez 7 min. przy wielkości $g = 160$ odciągano nadsącz, a do osadu komórek dodawano 10 μ l przeciwciała monoklonalnego w odpowiednim stężeniu skierowanego przeciwko:

W3/13 (stężenie wstępne: 1,0 mg/ml) 1:100,
OX8 (1,0 mg/ml) 1:100,
W3/25 (1,0 mg/ml) 1:100,
ED1 PE (0,1 mg/ml) 1:50,
B (1,0 mg/ml) 1:100,
OX12 (1,0 mg/ml) 1:100,
CD31 (1,0 mg/ml) 1:50,
CD54 (1,0 mg/ml) 1:50,
OX62 z biotyną (0,1 mg/ml)
OX33 (1,0 mg/ml) 1:100,
OX7 (1,0 mg/ml) 1:100,
CD27 z biotyną (0,1 mg/ml),
CD4 FITC (0,1 mg/ml)+ CD25 PE (0,2 mg/ml),
CD8a PerCP (0,1 mg/ml)+CD62L FITC (1,0 mg/ml) 1:5+CD45RC PE (0,2 mg/ml),
CD4 PECy-5 (0,1 mg/ml)+CD62L FITC (1,0 mg/ml) 1:5+CD45RC PE (0,2 mg/ml),
kontrola izotypowa IgG1 (0,1 mg/ml),
kontrola izotypowa IgG2a (0,1 mg/ml),
kontrola izotypowa IgG1 PE (0,1 mg/ml)+ IgG1 FITC (0,1 mg/ml),
kontrola izotypowa IgG FITC (0,5 mg/ml),
kontrola izotypowa IgG1 PE permabilizowana (0,1 mg/ml),
kontrola izotypowa IgG1 PerCP (0,2 mg/ml) + IgG1 PE (0,1 mg/ml) + IgG1 FITC (0,1 mg/ml),
kontrola izotypowa IgG2a PECy-5 (0,2 mg/ml) + IgG1 PE (0,1 mg/ml)+IgG1 FITC (0,1 mg/ml) i inkubowano w temp. 4°C przez 30 min.

Po inkubacji zawiesinę komórek płukano 2x dodając 4ml PBS + 1% FCS i wirując przez 7 min. przy wielkości $g = 160$. Do osadu komórek znakowanych jednym, dwoma lub trzema przeciwciałami połączonymi bezpośrednio z

fluorochromami dodawano 0,5 ml 1 % paraformaldehydu, dokładnie mieszano i przechowywano w probówkach osłonięte przed światłem folią aluminiową w temp. 4°C.

Etap 2.

W pozostałych próbkach usuwano nadsącz i do osadu komórek dodawano 10µl przeciwciał królika skierowanych przeciwko antygenom myszy związanych z PE (R0439), (o stężeniu wyjściowym 500mg/L), (Dako, Dania) rozcieńczonych w PBS w stosunku 1:20 z dodatkiem 20% normalnej surowicy szczura lub streptavidyny połączonej z FITC (F0422), (o stężeniu wyjściowym 1.0g/L), (Dako, Dania) rozcieńczonej w PBS w stosunku 1:20 z dodatkiem 20% normalnej surowicy szczura dla przeciwciał połączonych z biotyną (OX62 i CD27) i inkubowano w temp. 4°C przez 30 min. Następnie komórki płukano 2 x w 4 ml PBS + 1% FCS i wirowano przy wielkości $g=160$ przez 7 min. Do osadu komórek znakowanych jednym przeciwciałem dodawano 0,5 ml 1 % paraformaldehydu (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), dokładnie mieszano i przechowywano w probówkach osłonięte przed światłem folią aluminiową w temp. 4°C.

Etap 3.

Do osadu komórek pozostałych próbek dodawano 100 µl normalnej surowicy mysiej (dla prób OX8+PE + OX6 FITC, W3/25+PE + OX6 FITC, W3/13+PE + OX6 FITC) lub koziej (dla próby CD27+FITC + CD19 PE i kontroli izotypowej IgG FITC + IgG PE) i inkubowano 20 min. w temp. pokojowej. Następnie zawiesinę odwirowywano przez 7 min. przy wielkości $g =160$, odciągano nadsącz a do osadu komórek dodawano 10µl mysiego przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciw antygenom szczura skoniugowanego z FITC anty OX6 1:100, 20µl przeciwciała poliklonalnego wyprodukowanego w kozie skierowanego przeciwko antygenom szczura skoniugowanego z PE anty CD19 (o stężeniu wyjściowym 200 µg/ml) lub 10 µl koziej immunoglobuliny poliklonalnej IgG PE (o stężeniu wyjściowym 3ng/ml). Po 30 min. inkubacji w temp. 4°C zawiesinę komórek płukano 2x i wirowano. Do osadu komórek dodawano 0,5 ml 1% paraformaldehydu, mieszano i przechowywano osłonięte w temp. 4°C. Komórki wyznakowane przeciwciałami oceniano następnego dnia.

Ilość komórek wybarwionych pozytywnie oceniana była w cytometrze przepływowym (LSR, Becton Dickinson, San Lose, USA) za pomocą programu Cell Quest Pro (Becton Dickinson, San Lose, USA).

3.4. Barwienie immunohistochemiczne mrożonych skrawków podkolanowych węzłów chłonnych

Świeżo wyizolowane podkolanowe węzły chłonne mrożono w acetonie z suchym lodem i przechowywano w temperaturze -70°C . Następnie tkanki cięto na kriotomie (Cryocut 1800, Reichert-Jung, Leica) na skrawki o grubości 5 mikronów i przyklejano na szkiełka pokryte poly- α -lizyną. Po wysuszeniu, preparaty utrwalano przez 10 minut w schłodzonym acetonie, a następnie poddawano 20 minutowej inkubacji z blokującą surowicą kozią w rozcieńczeniu 1:1 z TBS (bufor Tris pH 7.6 rozcieńczony 1:10 w wodzie destylowanej). Do barwienia wykorzystano monoklonalne przeciwciała mysie skierowane przeciwko antygenom szczura w odpowiednim stężeniu anty: W3/13 1:100, W3/25 1:100, OX8 1:100, B 1:100, OX12 1:100, OX33 1:100, OX62 1:30, ED1 1:100, CD31 1:50, OX7 1:70, HiS48 1:100, OX6 1:100, CD54 1:50 (Serotec, Ltd, England) przeprowadzając 50 minutową inkubację w temperaturze pokojowej. Zastosowano również kontrolę negatywną, w której zamiast przeciwciała monoklonalnego użyto TBS. Po płukaniu, pozytywne komórki wykrywano przy użyciu kompleksu LSAB 2 AP (Dako, Dania) i substratu dla alkalicznej fosfatazy. W fazie końcowej skrawki poddawano barwieniu hematoksyliną. Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym (BX40 Olympus, Germany).

Przeciwciała zastosowane do znakowania immunocytochemicznego i immunohistochemicznego przedstawione zostały w tabeli nr 1, natomiast subpopulacje komórkowe wyrażające badane białka powierzchniowe u szczura w tabeli nr 2.

Tabela 1. Przeciwciała zastosowane do znakowania immunocytochemicznego i immunohistochemicznego; *Serotec Ltd England; **Becton Dickinson Biosciences Pharmingen San Lose, USA; ***Santa Cruz Biotechnology; ****BioLegend, San Diego, California, USA.

CD (ANTYGEN)	KLON	KLASA	PRODUCENT
CD43	W3/13	IgG1	*
CD4	W3/25	IgG1	*
CD4 FITC	W3/25	IgG1	*
CD4 PECy-5	OX35	IgG2a	**
CD8	OX8	IgG1	*
CD8a PerCP	OX8	IgG1	**
B	RLN-9D3	IgG2a	*
łańcuchy lekkie kappa	OX12	IgG2a	*
CD45RA	OX33	IgG1	*
CD25 PE	OX39	IgG1	**
-	OX62	IgG1	*
CD68	ED1	IgG1	*
CD68 PE	ED1	IgG1	*
CD31 (PECAM-1)	TLD-3A12	IgG1	*
CD90	OX7	IgG1	*
-	HiS48	IgM	*
MHC klasy II	OX6	IgG1	*
MHC klasy II	OX6 FITC	IgG1	*
CD54 (ICAM-I)	1A29	IgG1	*
CD19 PE	R-20	IgG1	***
CD27	LG.3A10	IgG1	**
CD45RC PE	OX22	IgG1	**
CD62L FITC	OX85	IgG1	*
kontrola izotypowa	-	IgG1	*
kontrola izotypowa	-	IgG2a	*
kontrola izotypowa	R3-34	IgG1 PE	**
kontrola izotypowa	R3-34	IgG1 FITC	**
kontrola izotypowa	RTK2071	IgG1 PerCP	****
kontrola izotypowa	R35-95	IgG2a PE Cy-5	**
kontrola izotypowa	Poly24030	IgG PE	****
kontrola izotypowa	HTK888	IgG FITC	****

Tabela 2. Subpopulacje komórkowe wyrażające badane białka powierzchniowe u szczura.

SUBPOPULACJE KOMÓRKOWE WYRAŻAJĄCE BADANE BIAŁKA POWIERZCHNIOWE	BIAŁKA POWIERZCHNIOWE
limfocyty T, granulocyty, monocyty	W3/13+
limfocyty T pomocnicze, makrofagi	W3/25+
limfocyty T cytotoksyczne i supresorowe	OX8+
limfocyty B	B+
limfocyty B	OX12+
limfocyty B	OX33+
komórki dendrytyczne	OX62+
makrofagi, granulocyty	ED1+
PECAM-1, limfocyty B, T, komórki śródbłonna, granulocyty, monocyty	CD31+
tymocyty, komórki szpikowe	OX7+
granulocyty	HiS48+
MHC klasy II	OX6+
ICAM-1, komórki dendrytyczne, komórki śródbłonna	CD54+
aktywowane limfocyty T	W3/13+ OX6+
aktywowane limfocyty T pomocnicze	W3/25+ OX6+
aktywowane limfocyty T cytotoksyczne	OX8+ OX6+
limfocyty T regulatorowe/supresorowe	CD4+ CD25+
różnicujące się plazmoblasty, limfocyty B pamięci	CD19+ CD27+
limfocyty T pamięci pomocnicze	CD4+ CD45RC-
limfocyty T pamięci pomocnicze centralne	CD4+ CD45RC- CD62L+
limfocyty T pamięci pomocnicze efektorowe	CD4+ CD45RC- CD62L-
limfocyty T pamięci cytotoksyczne	CD8+ CD45RC-
limfocyty T pamięci cytotoksyczne centralne	CD8+ CD45RC- CD62L+
limfocyty T pamięci cytotoksyczne efektorowe	CD8+ CD45RC- CD62L-

3.5. Określenie zmian ilościowych poszczególnych subpopulacji komórkowych węzłów chłonnych w programie Microimage

Skrawki podkolanowych węzłów chłonnych, wybarwione przeciwciałami metodą immunohistochemii, oceniano przy użyciu programu Microimage™ version 3.0 dla Windows™ (Olympus, Germany) przy użyciu mikroskopu świetlnego (BX40, Olympus, Germany) wyposażonego w kamerę (CCD-IRIS, Sony, Japan) przy powiększeniu 100x. Subpopulacje komórkowe węzłów wyrażające badane białko powierzchniowe, wybarwione na kolor czerwony, oznaczano używając połączenia trzech barw w odpowiednim nasileniu (czerwona, niebieska, zielona). Dla każdego ocenianego skrawka zastosowano takie same ustawienia. Ocena polegała na określeniu łącznego pola powierzchni komórek pozytywnie wybarwionych w ściśle określonym obszarze skrawka węzła. Udział procentowy poszczególnych subpopulacji komórkowych oceniano w kolejnych strefach funkcjonalnych węzła: w strefie brzeżnej, grudkach chłonnych, strefie przykorowej i strefie rdzennej.

3.6. Analiza statystyczna

Z uzyskanych wyników w kolejnych grupach eksperymentalnych wyliczono średnie oraz błędy standardowe. Analizy statystyczne wykonano za pomocą programu SAS (SAS Institute, 2012).

W przypadku danych z programu Microimage przeprowadzono wstępną analizę różnic pomiędzy strefami węzłów chłonnych i typami zakażeń z wykorzystaniem uogólnionego modelu liniowego mieszanego, w którym szczur był czynnikiem losowym (procedura SAS/GLIMMIX). Dla rozpoznania szczegółowych różnic porównano efekty typów zakażenia osobno dla każdej strefy, stosując analizę wariancji i porównania wielokrotne Tukey'a (procedura SAS/GLIMMIX), które przeprowadzono na poziomach istotności $\alpha=0,05$; $\alpha=0,01$ i $\alpha=0,001$.

Podobny sposób analizy zastosowano w przypadku danych masy węzłów oraz liczby komórek węzłów chłonnych.

W doświadczeniach z pomiarami metodą cytometrii przepływowej analizowane próbki były niejednokrotnie próbkami mieszanymi z kilku szczurów. Z tego względu w analizie wariancji wykorzystano ważoną sumę kwadratów

(procedura SAS/GLM). Jak poprzednio, porównań wielokrotnych pomiędzy typami zakażenia dokonano na trzech poziomach istotności. Wartość $p < 0,05$ przyjmowano za istotną statystycznie.

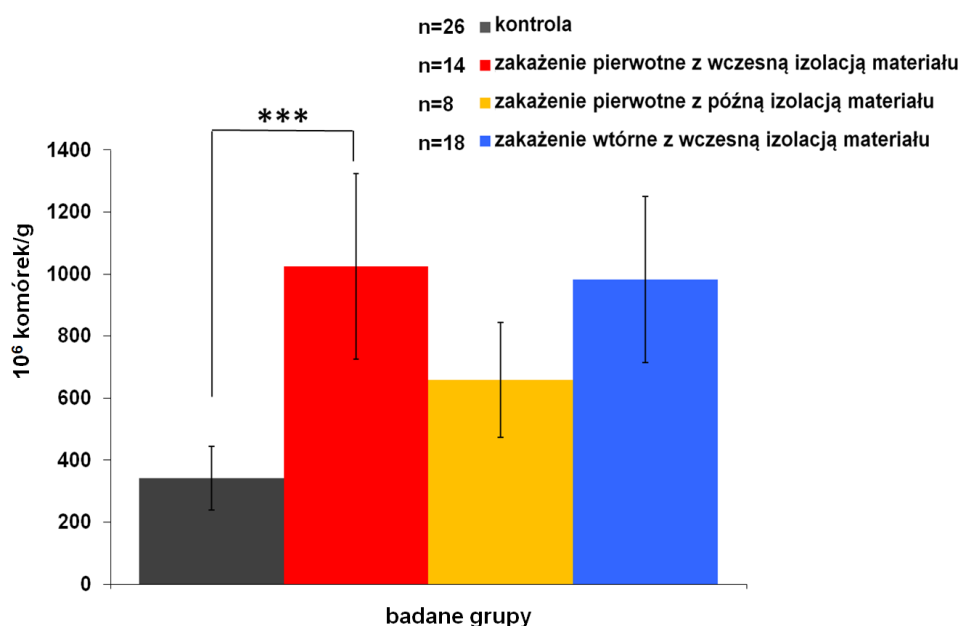
4. WYNIKI

Kontrolą dla grupy zwierząt po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału była grupa po podaniu 0.9% jałowego roztworu soli fizjologicznej.

Odniesieniem dla grupy zwierząt po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału była grupa po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis* z późną izolacją materiału.

Na szczególną uwagę z punktu widzenia celów pracy zasługiwało porównanie wyników z grupy zwierząt po zakażeniu wtórnym z wczesną izolacją materiału do tych po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału.

4.1. Liczba komórek (w $10^6/g$) w podkolanowych węzłach chłonnych

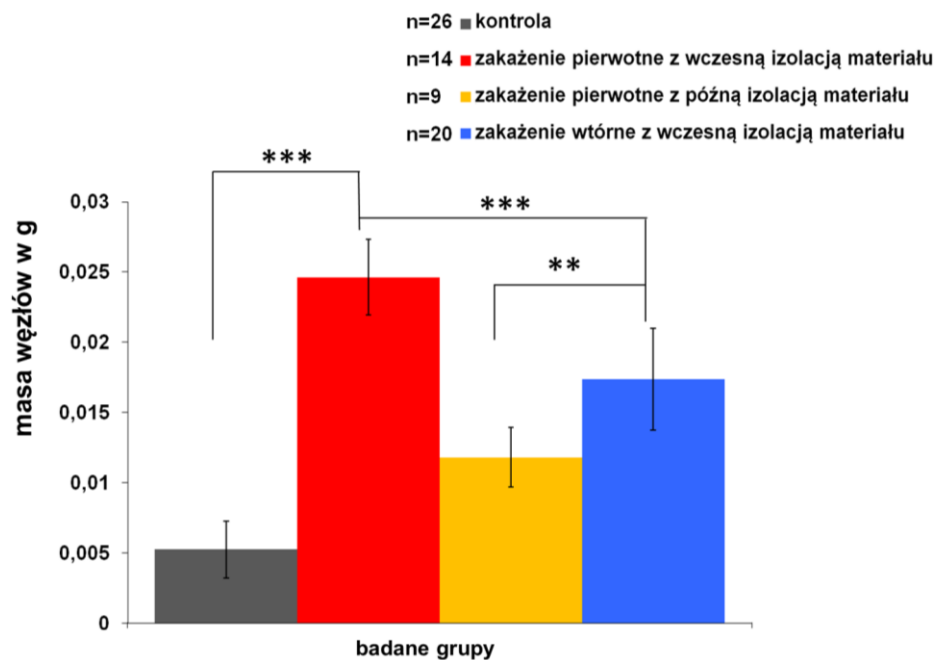


Ryc. 8. Liczba komórek (w $10^6/g$) w podkolanowych węzłach chłonnych. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; *** $p < 0,001$.

Żywotność komórek w badanych grupach wynosiła 98 procent. Zakażenie pierwotne skóry *Staphylococcus epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału spowodowało znaczne zwiększenie liczby komórek w podkolanowych węzłach chłonnych w porównaniu do grupy kontrolnej (po

podaniu roztworu soli fizjologicznej). Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału liczba komórek w węzłach pozostała na poziomie podobnym do tego, który osiągnęła w grupach po pierwotnym podaniu bakterii (Tab. 3; Ryc. 8).

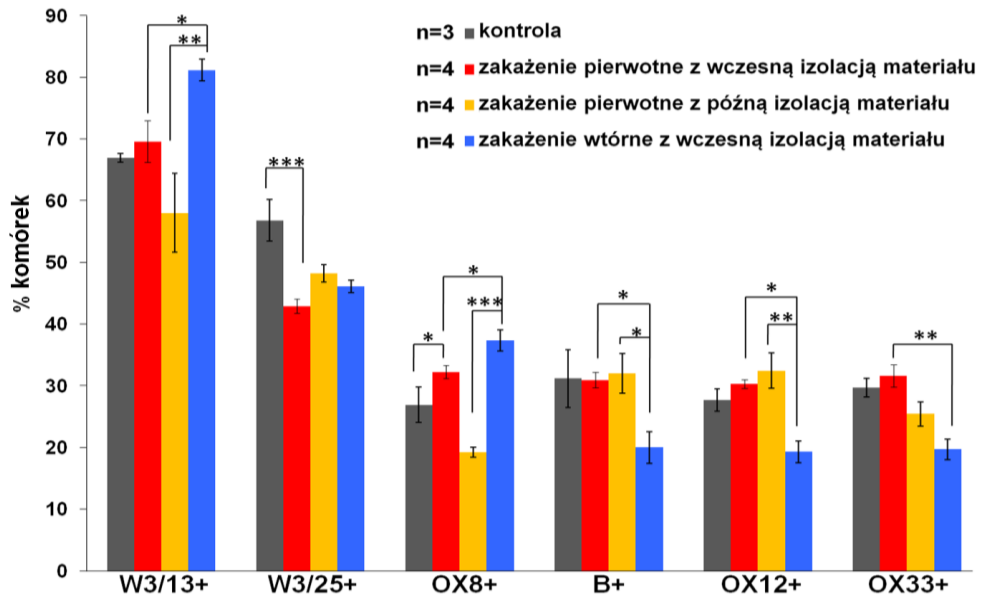
4.2. Masa (w g) podkolanowych węzłów chłonnych



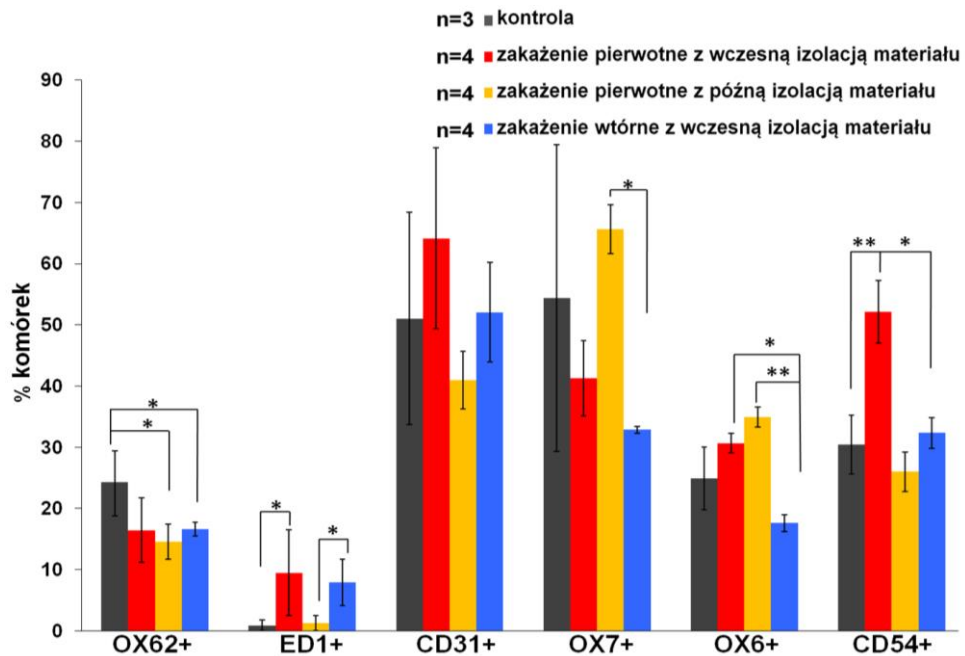
Ryc. 9. Masa (w gramach) podkolanowych węzłów chłonnych. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Zakażenie pierwotne skóry *Staphylococcus epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału spowodowało istotny statystycznie wzrost masy podkolanowych węzłów chłonnych w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym masa węzłów również zwiększyła się, były to jednak wartości znamienne niższe od tych w grupie po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału (Tab. 4; Ryc. 9).

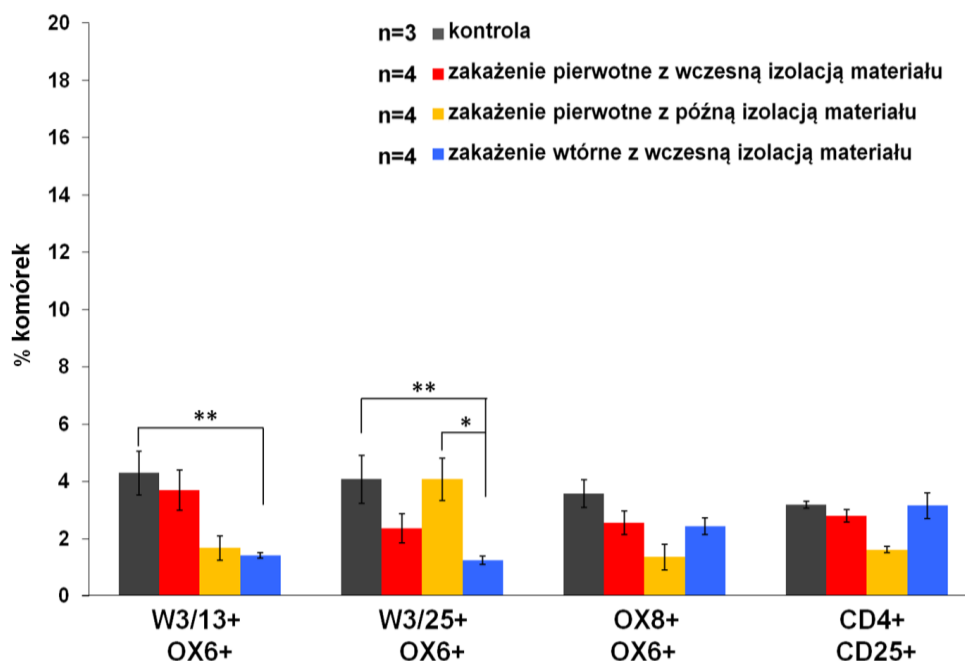
4.3. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych, ocenione w cytometrze przepływowym



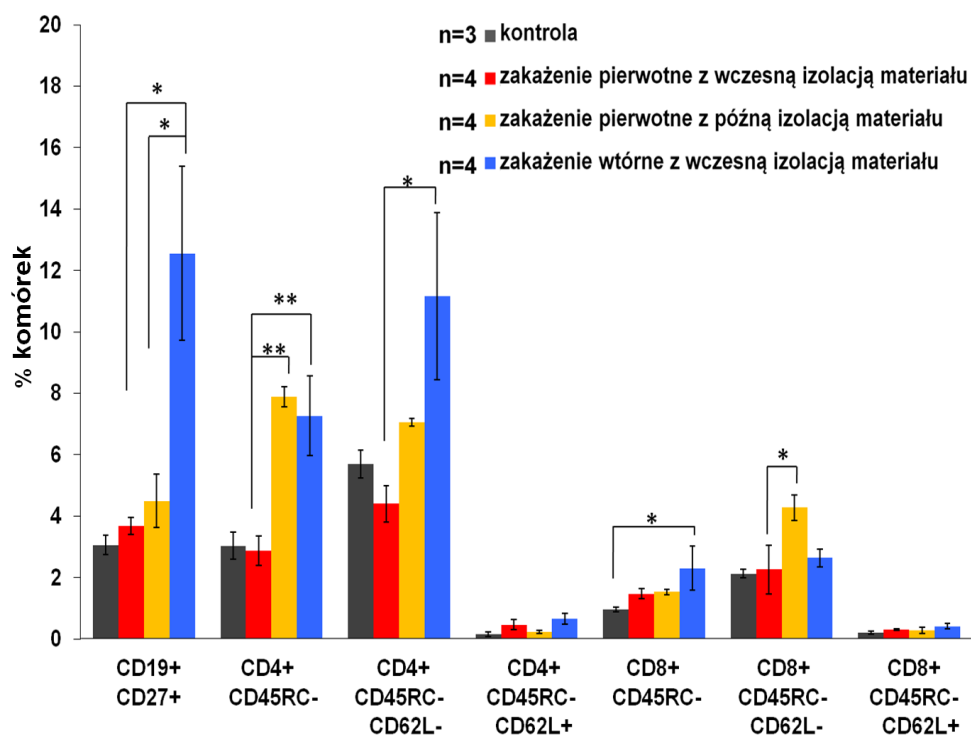
Ryc. 10. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych, ocenione w cytometrze przepływowym. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Ryc. 11. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych, ocenione w cytometrze przepływowym. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Ryc. 12. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych, ocenione w cytometrze przepływowym. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Ryc. 13. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych, ocenione w cytometrze przepływowym. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

W ocenie cytometrycznej określano zmiany proporcji poszczególnych subpopulacji komórkowych w zawiesinie komórek podkolanowych węzłów chłonnych w grupach po pierwotnym i wtórnym zakażeniu skóry *Staphylococcus epidermidis*.

Zakażenie pierwotne nie miało istotnego wpływu na udział procentowy komórek wyrażających białko **W3/13** (limfocyty T, granulocyty, monocyty) w węzłach w porównaniu do grupy kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału zaobserwowano znamienne zwiększenie odsetka tych komórek w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym (Tab. 5; Ryc. 10).

Populacja limfocytów T pomocniczych i makrofagów **W3/25+** zmniejszyła znamienne swój udział procentowy po pierwotnym zakażeniu skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym pozostała na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 5; Ryc. 10).

Odsetek limfocytów T cytotoksycznych **OX8+** zwiększył się znamienne po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym zwiększył się istotnie ponad wartości obserwowane w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 5; Ryc. 10).

Limfocyty B znakowane trzema różnymi przeciwciałami (**B, OX12, OX33**) wykazały podobne, znamienne statystycznie zmniejszenie udziału procentowego po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym (Tab. 5; Ryc. 10).

Udział komórek dendrytycznych **OX62+** w węzłach obniżył się znamienne w w grupie po zakażeniu pierwotnym i późną izolacją materiału w porównaniu do grupy kontrolnej i utrzymał na tym poziomie po zakażeniu wtórnym (Tab. 5; Ryc. 11).

Subpopulacja makrofagalna **ED1+** zareagowała szybko na antygen bakteryjny. Pierwotne i wtórne zakażenie skóry w grupach z wczesną izolacją materiału spowodowało znamienne wzrost jej udziału procentowego w węzłach (Tab. 5; Ryc. 11).

Udział procentowy komórek wyrażających białko **CD31** (PECAM-1+, komórki śródbłonkowe, limfocyty B, T, granulocyty, monocyty) był podobny po zakażeniu pierwotnym i wtórnym *S. epidermidis* (Tab. 5; Ryc. 11).

Komórki szpikowe i tymocyty **OX7+** w grupach po pierwotnym zakażeniu *S. epidermidis* pozostały na poziomie wyjściowym. Po wtórnym podaniu bakterii ich odsetek zmniejszył się istotnie w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym skóry z późną izolacją materiału (Tab. 5; Ryc. 11).

Po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału zaobserwowano znamienne wzrost subpopulacji komórek **CD54+**. Po wtórnym podaniu *S. epidermidis* udział procentowy tych komórek obniżył się znamienne w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału i był podobny do wartości z grupy po podaniu roztworu soli fizjologicznej (Tab. 5; Ryc. 11).

Podobny efekt wtórnego zakażenia wykazano w przypadku ekspresji antygenów klasy II (**OX6+**) aktywowanych po wtargnięciu antygeny bakteryjnego. Wykazano znamienne zmniejszenie udziału procentowego tych komórek po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do wartości w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 5; Ryc. 11).

W subpopulacjach aktywowanych limfocytów T (**W3/13+ OX6+**, **W3/25+ OX6+**) zaobserwowano podobny efekt braku reakcji na zakażenie wtórne, które przejawiało się znamieniem obniżeniem udziału procentowego tych populacji w porównaniu do kontroli (Tab. 5; Ryc. 12).

W subpopulacji aktywowanych limfocytów T cytotoksycznych (**OX8+OX6+**) zaobserwowano efekt braku reakcji na pierwotne i wtórne wtargnięcie bakterii (Tab. 5; Ryc. 12).

Wykazano brak odpowiedzi na zakażenie pierwotne i wtórne *S. epidermidis* ze strony limfocytów T regulatorowych **CD4+CD25+** (Tab. 5; Ryc. 12).

Procentowy udział limfocytów B pamięci **CD19+CD27+** wzrósł znamienne po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do wartości w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 5; Ryc. 13).

Różnica odsetka limfocytów pamięci T pomocniczych **CD4+CD45RC-** wzrastała istotnie w okresie 3 tygodni po zakażeniu pierwotnym, ale zakażenie

wtórne nie miało już dalszego wpływu na tworzenie tej subpopulacji (Tab. 5; Ryc. 13).

Poziom limfocytów T pamięci pomocniczych efektorowych **CD4+CD45RC-CD62L-** zwiększył się znamienne po zakażeniu wtórnym w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału (Tab. 5; Ryc. 13).

Procentowy udział komórek T pamięci pomocniczych centralnych **CD4+CD45RC-CD62L+** był podobny zarówno po zakażeniu pierwotnym jak i wtórnym skóry (Tab. 5; Ryc. 13).

Udział limfocytów T pamięci cytotoksycznych **CD8+CD45RC-** był najwyższy po zakażeniu wtórnym skóry i były to wartości istotne statystycznie w porównaniu do grupy po podaniu roztworu soli fizjologicznej. Wartości te były niższe niż w przypadku komórek pamięci T pomocniczych (Tab. 5; Ryc. 13).

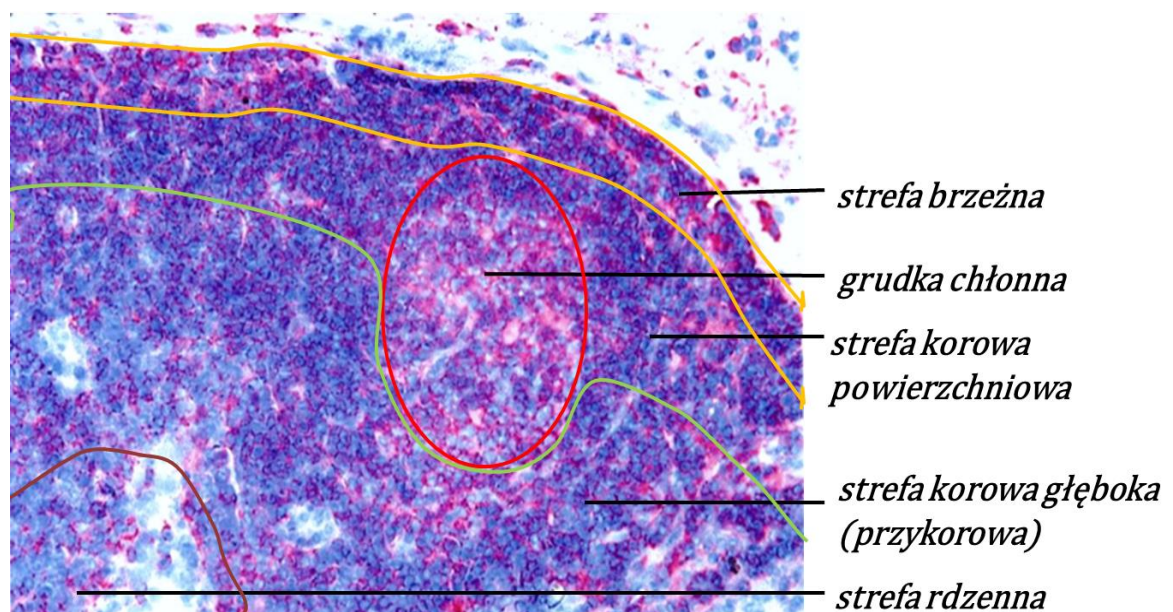
Odsetek limfocytów T pamięci cytotoksycznych efektorowych **CD8+CD45RC-CD62L-** wzrastał znamienne w okresie 3 tygodni po zakażeniu pierwotnym skóry, ale zakażenie wtórne nie miało już dalszego wpływu na tworzenie tej subpopulacji (Tab. 5; Ryc. 13).

Udział procentowy komórek T pamięci cytotoksycznych centralnych **CD8+CD45RC-CD62L+** był podobny zarówno po zakażeniu pierwotnym jak i wtórnym skóry w podkolanowych węzłach chłonnych (Tab. 5; Ryc. 13).

4.4. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w poszczególnych strefach podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage

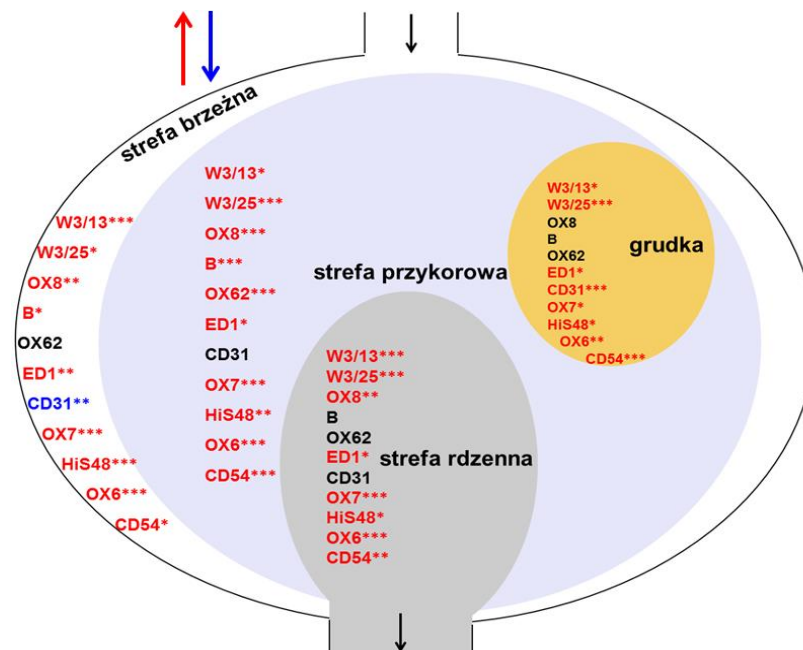
W ocenie morfometrycznej w badaniu immunohistochemicznym określano zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych na podstawie pola powierzchni jakie zajmują w ściśle określonym skrawku węzła chłonnego. Zmiany te są różne w kolejnych częściach węzła, ponieważ węzły limfatyczne podzielone są topograficznie na rejony funkcjonalne: strefę brzezną, grudki chłonne, strefę przykorową i strefę rdzenną.

Poszczególne strefy węzła chłonnego u szczura przedstawione zostały na rycinie nr 14.



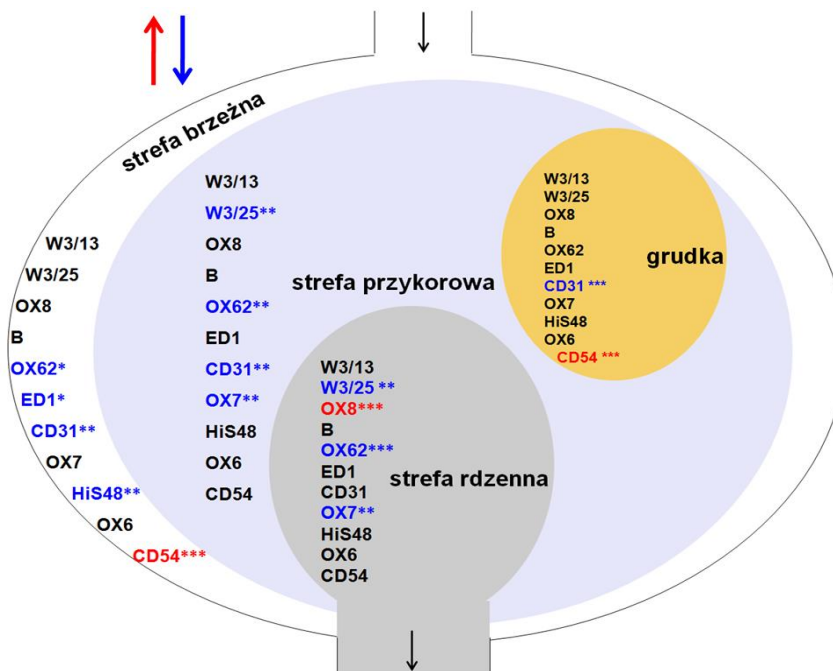
Ryc. 14. Strefy funkcjonalne podkolanowego węzła chłonnego szczura, x200.

A zakażenie pierwotne *Staphylococcus epidermidis*



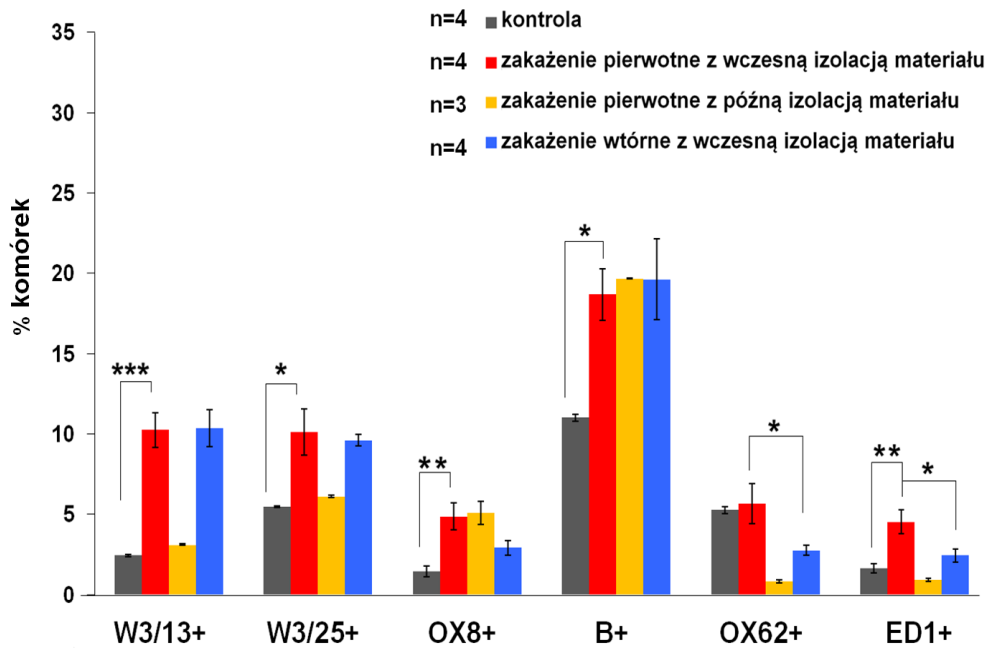
W3/13 +	limfocyty T, granulocyty, monocyty
W3/25+	limfocyty T pomocnicze, makrofagi
OX8+	limfocyty T cytotoksyczne
B+	limfocyty B
OX62+	komórki dendrytyczne
ED1+	makrofagi, granulocyty
CD31+	PECAM I, kom. śródbłonka, limfocyty T, B, granulocyty, monocyty
OX7+	komórki szpikowe, tymocyty
HiS48+	granulocyty
OX6+	MHC klasy II
CD54+	ICAM I

B zakażenie wtórne *Staphylococcus epidermidis*

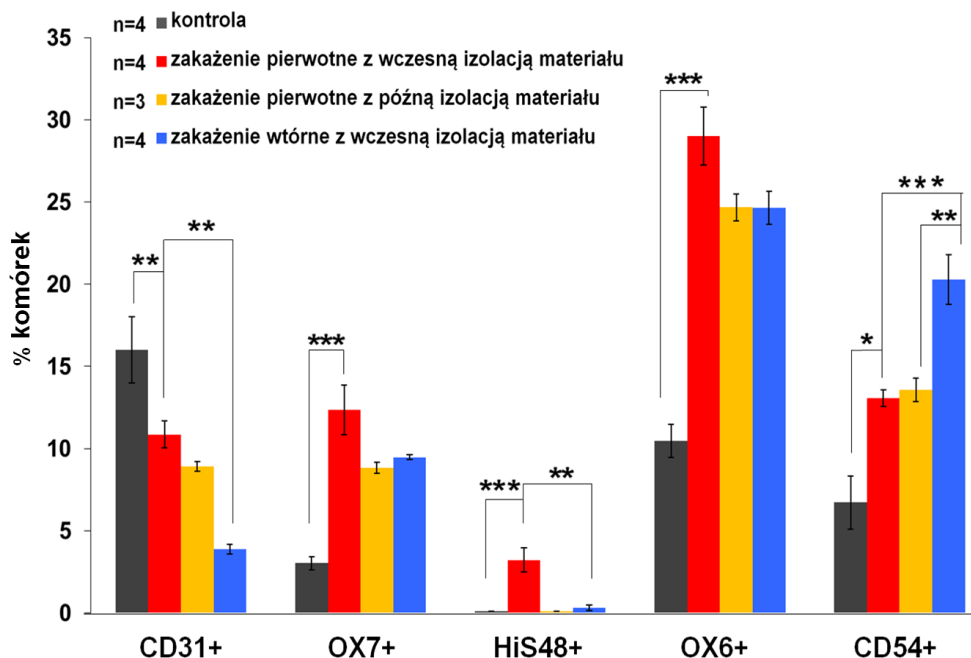


Ryc. 15. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w poszczególnych strefach węzłów chłonnych określone przy użyciu programu Microimage. **A**-grupa po pierwotnym zakażeniu skóry z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli, **B**- grupa po wtórnym zakażeniu skóry z wczesną izolacją materiału w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału, czerwony kolor-zwiększenie odsetka komórek, niebieski kolor-zmniejszenie odsetka komórek, czarny kolor-brak zmian ilościowych. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.1. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie brzeżnej węzłów

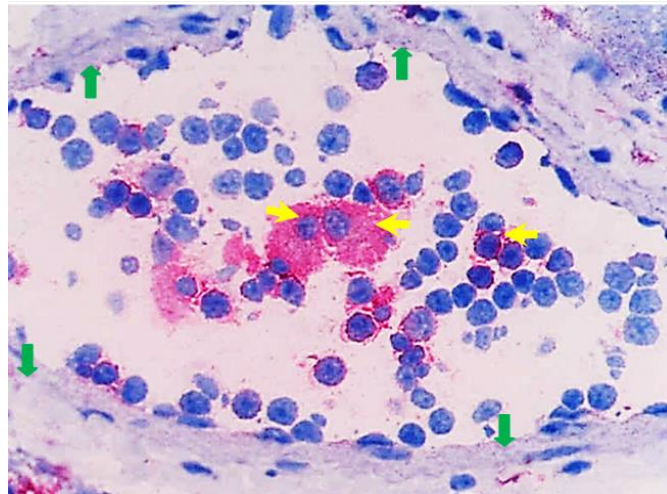


Ryc. 16. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie brzeżnej podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

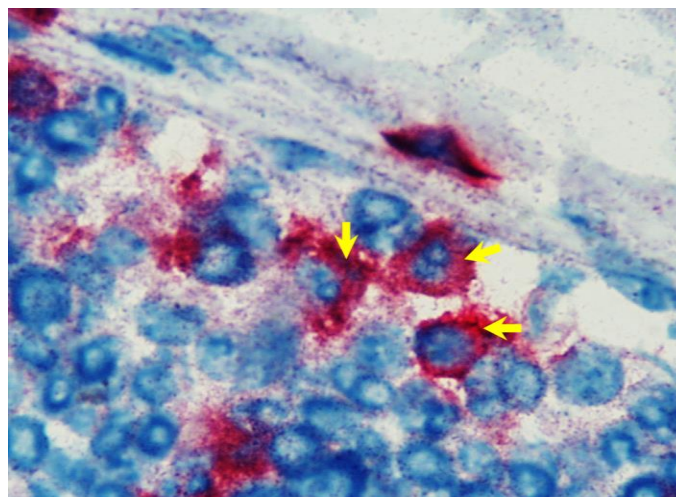


Ryc. 17. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie brzeżnej podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Komórki strefy brzeżnej węzła chłonnego reagują jako pierwsze na antygen dopływający drogą naczyń limfatycznych doprowadzających. W tym, na antygen mikroorganizmów reagują w pierwszym rzędzie komórki układu wrodzonego jak makrofagi, granulocyty i komórki dendrytyczne, a dopiero w trakcie 3-7 dni można zauważyć rozpoczynającą się odpowiedź limfocytów T i B.



*Ryc. 18. Komórki obecne w świetle naczynia limfatycznego doprowadzającego (ściana naczynia oznaczona zielonymi strzałkami) do podkolanowego węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **W3/25** (limfocyty T pomocnicze, makrofagi - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000.*



*Ryc. 19. Komórki strefy brzeżnej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX62** (komórki dendrytyczne - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000.*

Subpopulacja komórek **W3/13+** zawierająca przede wszystkim limfocyty T, ale również granulocyty i monocyty zwiększyła znamienne swój udział procentowy po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli w strefie brzeżnej węzłów. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostała na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15-16).

Odsetek limfocytów T pomocniczych i makrofagów **W3/25+** zwiększył się znamienne po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym osiągnął poziom podobny do tych po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15-16; Ryc. 20).

Udział procentowy limfocytów cytotoksycznych **OX8+** w strefie brzeżnej węzłów zwiększył się istotnie po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym pozostał na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15-16). Odsetek tej subpopulacji jest fizjologicznie mniej liczny niż subpopulacji komórek T pomocniczych.

Odsetek komórek **B** zwiększył się znamienne po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w strefie brzeżnej węzłów i pozostał na tym szczytowym poziomie po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15-16).

Po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału poziom komórek dendrytycznych **OX62 +** w strefie brzeżnej węzłów nie wzrastał istotnie w porównaniu do kontroli, a po zakażeniu wtórnym był znamienne statystycznie niższy od tego po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15-16; Ryc. 19; Ryc. 21).

Populacja makrofagalna **ED1+** znamienne zwiększyła swój udział procentowy w strefie brzeżnej węzłów pod wpływem pierwotnego zakażenia *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym jej poziom procentowy był istotnie niższy od tego po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15-16; Ryc. 22).

Zakażenie pierwotne skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału wpływało na istotne obniżenie udziału procentowego subpopulacji

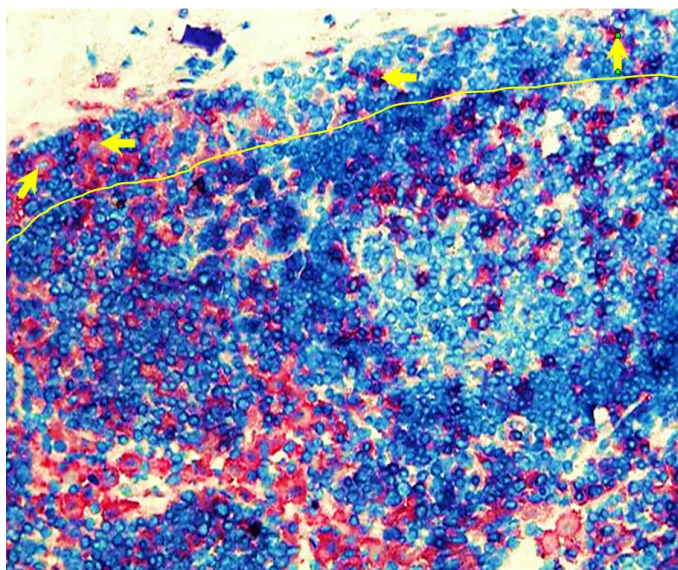
komórek **CD31+** w strefie brzeżnej węzłów chłonnych w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym odsetek tej subpopulacji również zmniejszył się istotnie w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc.17).

Odsetek komórek **OX7+** istotnie wzrastał po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostał na poziomie podobnym do tych po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc.17).

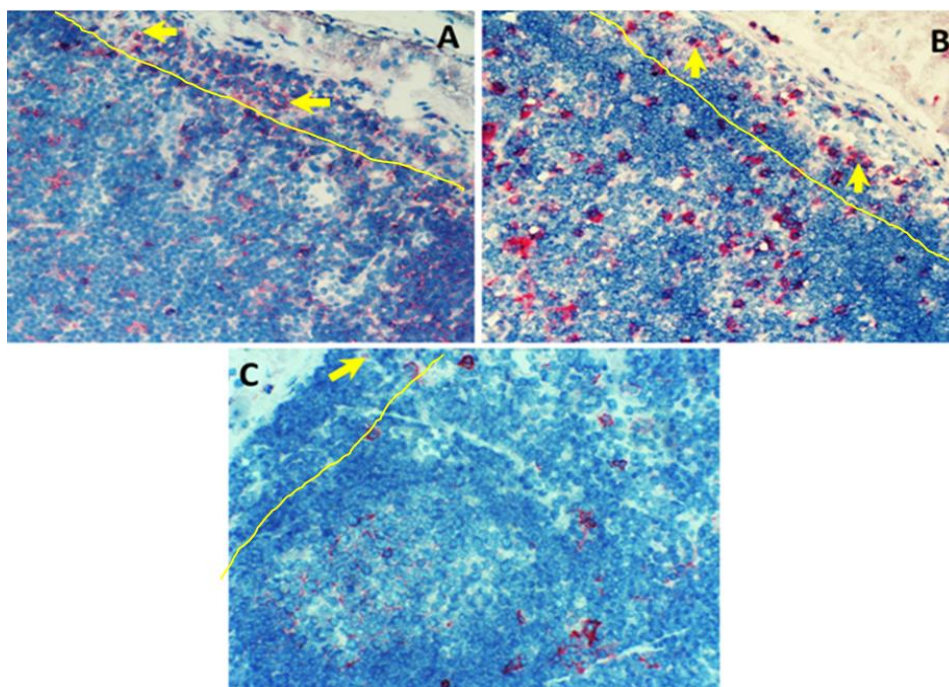
Udział procentowy granulocytów **His48+** wzrastał znamienne po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli, ale nie obserwowano takiej reakcji po zakażeniu wtórnym, gdzie wartości były istotnie statystycznie niższe od tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc.17; Ryc. 23).

Białko **OX6** (antygeny klasy II) pojawia się głównie po pobudzeniu populacji makrofagów, komórek dendrytycznych a także limfocytów. Efekt ten obserwujemy po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału, gdzie wartości procentowe tych komórek są znamienne wyższe od tych w grupie kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym ich udział procentowy pozostał na poziomie podobnym do tych po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc.17).

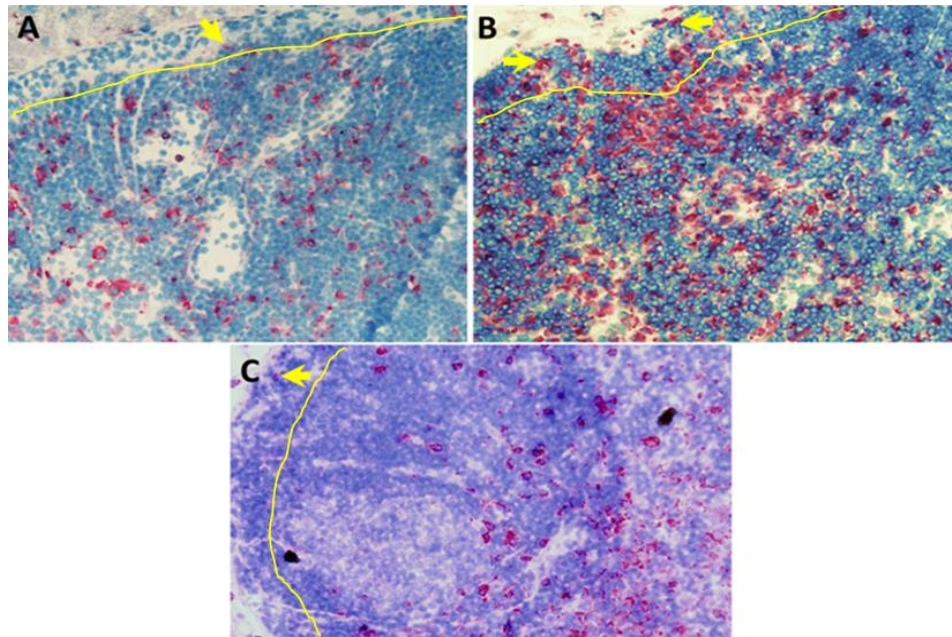
Białko **CD54+** pojawia się na pobudzonych antygenem komórkach. Po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału odsetek tych komórek w strefie brzeżnej węzłów zwiększył się znamienne w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału ich udział procentowy był istotnie wyższy od tych po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc.17).



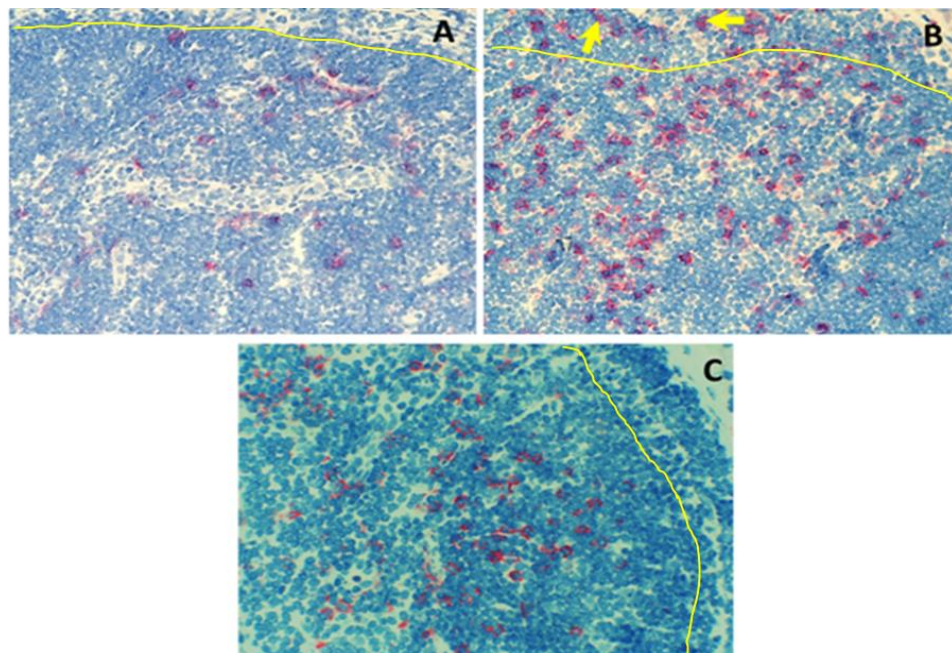
Ryc. 20. Podkolanowy węzeł chłonny (z widoczną strefą brzezną, oddzieloną żółtą linią) szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwiony immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **W3/25** (limfocyty T pomocnicze, makrofagi - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x250.



Ryc. 21. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą brzezną, oddzieloną żółtą linią) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX62** (komórki dendrytyczne - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.

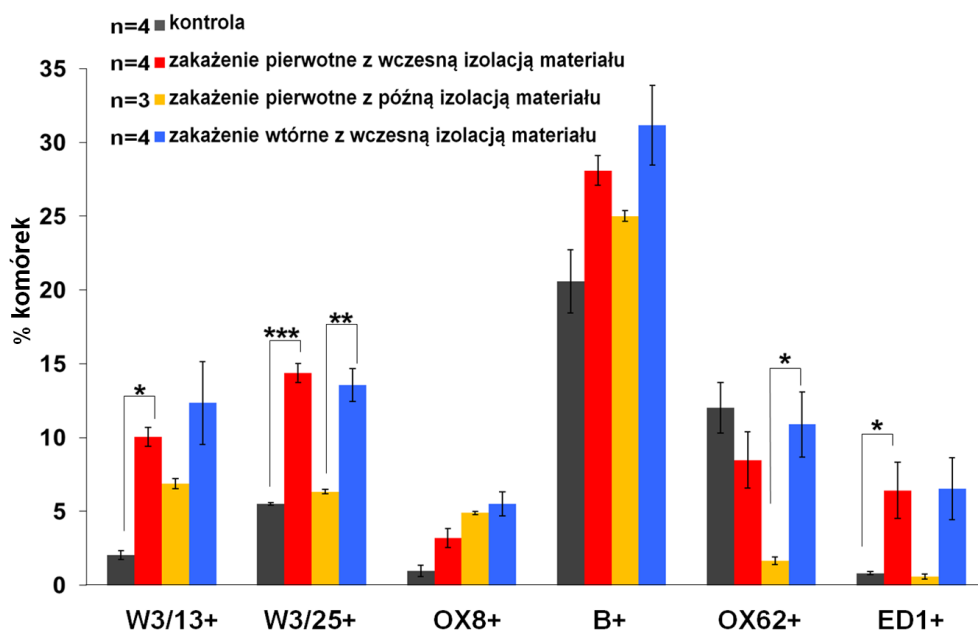


Ryc. 22. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą brzezną, oddzieloną żółtą linią) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **ED1** (makrofagi, granulocyty - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.

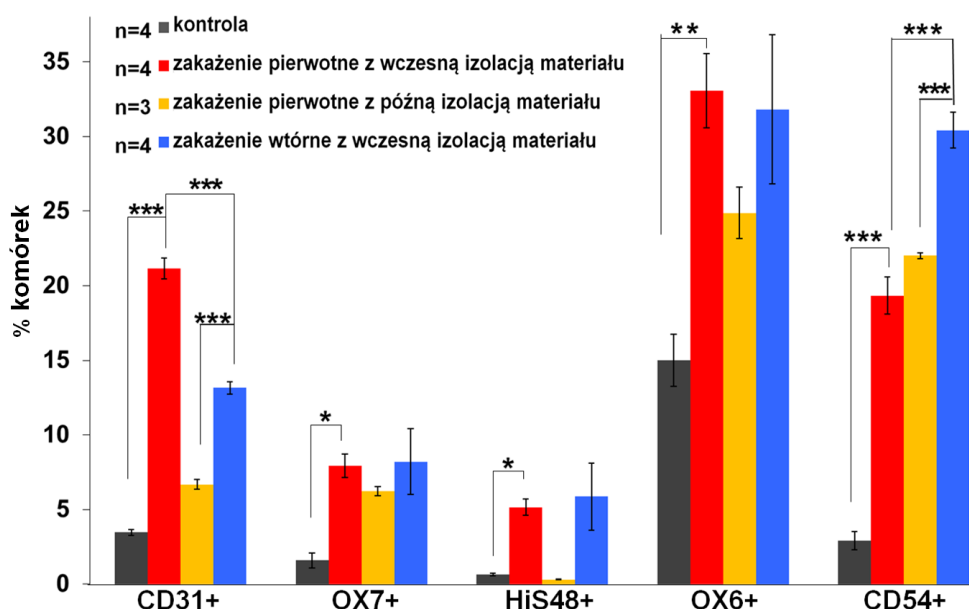


Ryc. 23. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą brzezną, oddzieloną żółtą linią) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **HIS48** (granulocyty - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.

4.4.2. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w grudkach chłonnych węzłów



Ryc. 24. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w grudkach chłonnych podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Ryc. 25. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w grudkach chłonnych podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

W grudkach chłonnych węzłów, proporcjonalnie do innych populacji komórkowych zwiększony był głównie udział procentowy limfocytów B, których ilość jest zawsze wysoka w tym rejonie węzła chłonnego.

Odsetek komórek **W3/13+** istotnie zwiększył się po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostał na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 24).

Komórki **W3/25+** zwiększyły znamienne swój udział procentowy po pierwotnym zakażeniu skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym odsetek tych komórek również wzrósł, jednak były to wartości podobne do tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 24; Ryc. 27).

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w udziale procentowym limfocytów cytotoksycznych **OX8+** w grudkach węzła w żadnej z eksperymentalnych grup zwierząt (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 24).

Odsetek limfocytów **B** w grudkach chłonnych węzła nie zmienił się istotnie po zakażeniu pierwotnym jak i wtórnym skóry i wykazywał stały wysoki poziom w porównaniu do innych subpopulacji komórkowych (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 24).

Komórki dendrytyczne **OX62+** po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału pozostawały na poziomie podobnym do wyjściowego w grudkach węzłów. Natomiast po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału zwiększyły istotnie swój udział procentowy. Były to jednak wartości podobne do tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 24).

Subpopulacja makrofagalna **ED1+** zareagowała znamienym wzrostem odsetka w grudkach węzła po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli (Ryc. 16, Ryc. 26). Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostała na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 24).

Poziom subpopulacji komórek **CD31+** w grudkach węzła zwiększył się istotnie po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału w

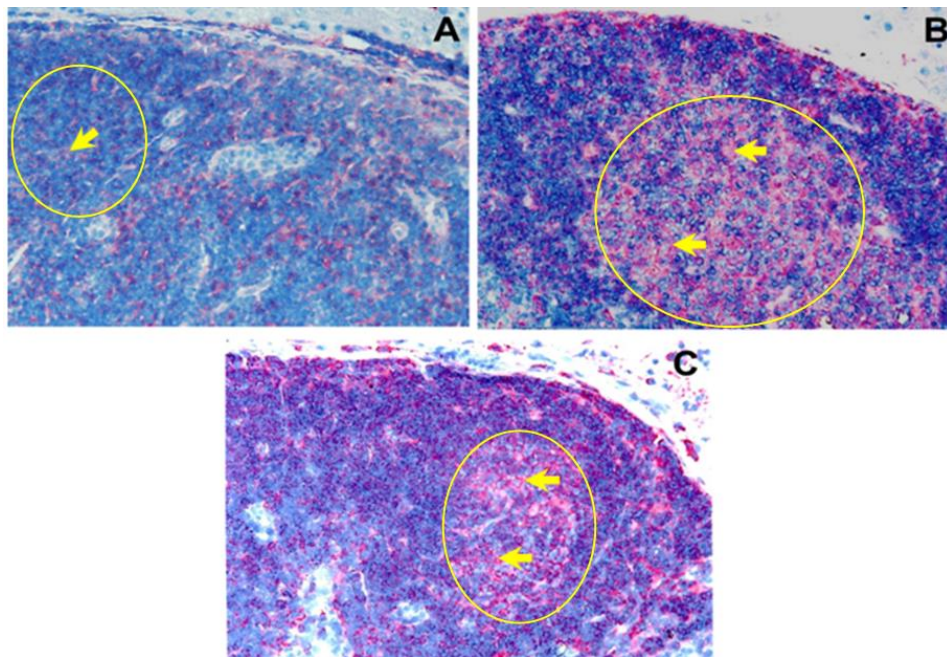
porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym również wzrósł, jednak były to wartości istotnie statystycznie niższe od tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 25).

Komórki wyrażające na swej powierzchni antygen tymocytarny **OX7+** znamienne zwiększyły swój udział procentowy w grudkach węzłów po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostały na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 25).

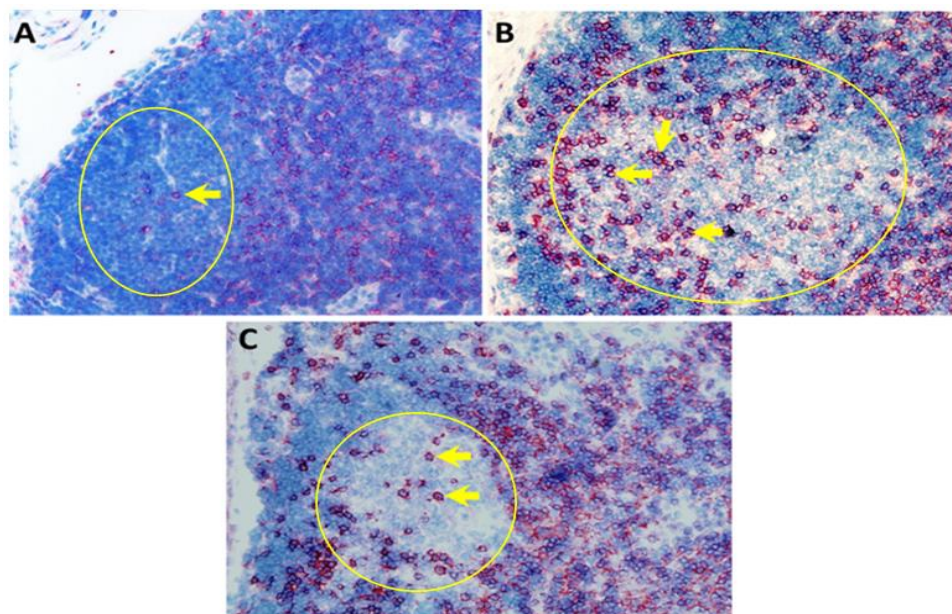
Granulocyty **HiS48+** zareagowały znamienym statystycznie wzrostem odsetka po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po wtórnym podaniu bakterii poziom granulocytów pozostał na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 25).

Komórki wyrażające na swej powierzchni antygeny klasy II (**OX6+**) zwiększyły znamienne swój udział procentowy w grudkach po pierwotnym podaniu antygeny bakteryjnego w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym pozostały na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 25; Ryc. 26).

Udział procentowy komórek **CD54+** w grudkach węzłów zwiększył się znamienne statystycznie po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału osiągnął wartości istotnie wyższe od tych w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 25).

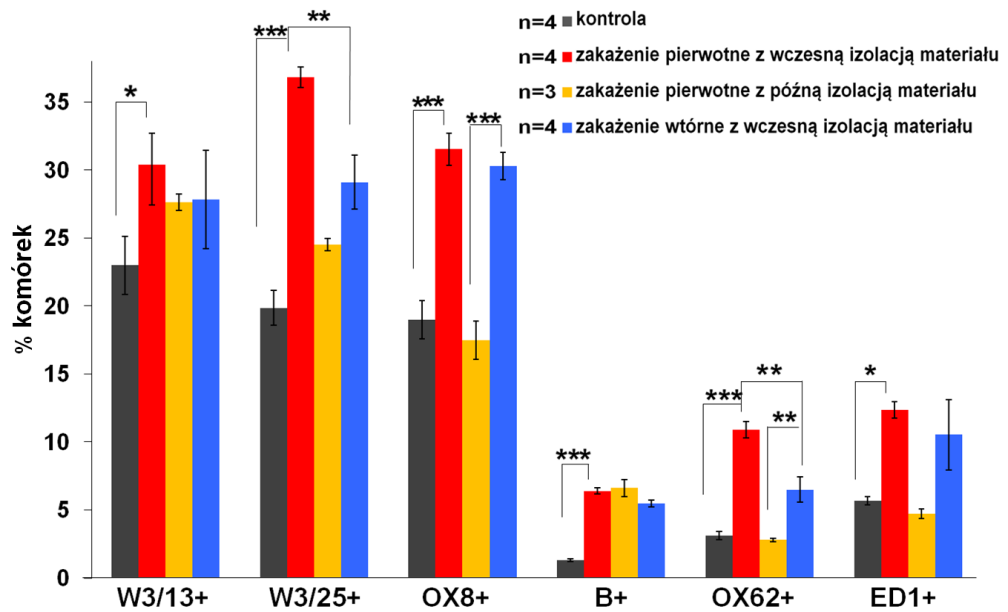


Ryc. 26. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną grudką, oddzieloną żółtą linią) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX6** (antygeny klasy II - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.

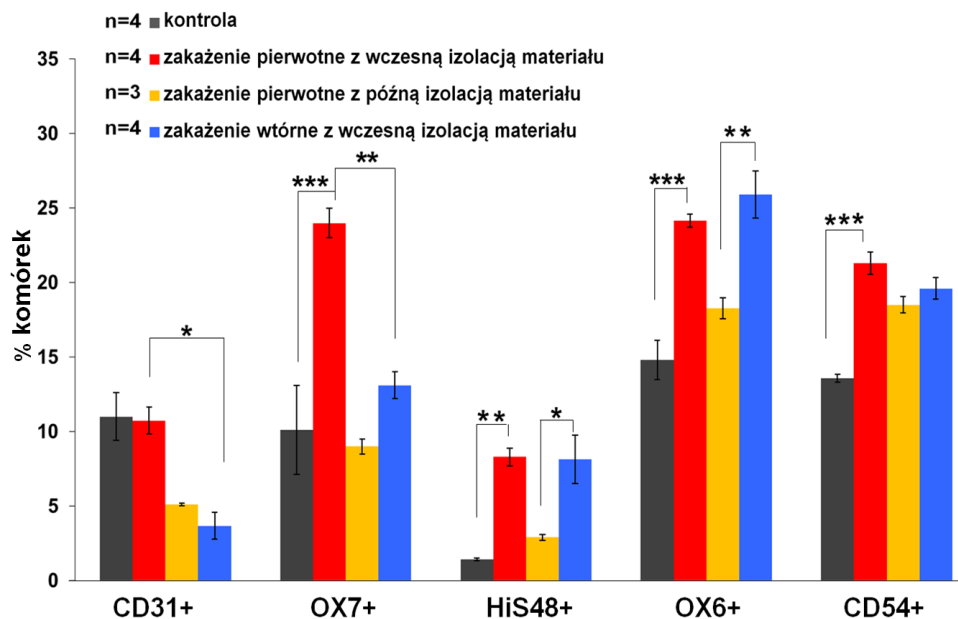


Ryc. 27. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną grudką, oddzieloną żółtą linią) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **W3/25** (limfocyty *T* pomocnicze, makrofagi - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.

4.4.3. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie przykorowej węzłów



Ryc. 28. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie przykorowej podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Ryc. 29. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie przykorowej podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Strefę przykorową węzłów chłonnych charakteryzował wysoki udział procentowy limfocytów T i niski udział limfocytów B w porównaniu do innych populacji komórkowych.

Poziom subpopulacji komórek **W3/13+** zwiększył się istotnie statystycznie po pierwotnym podaniu *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostał na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 28; Ryc. 30).

Komórki **W3/25+** znamienne zwiększyły swój udział procentowy po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym ich odsetek istotnie zmniejszył się w stosunku do poziomu obserwowanego po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 28).

Limfocyty T cytotoksyczne **OX8+** znamienne zwiększyły swój udział procentowy po pierwotnym podaniu bakterii *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do grupy kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym ich udział również istotnie zwiększył się, był to jednak poziom podobny do tego po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 28; Ryc. 31).

Odsetek limfocytów **B** zwiększył się znamienne w strefie przykorowej węzła po pierwotnym zakażeniu *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do grupy kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostał na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 28).

Komórki dendrytyczne **OX62+** istotnie zwiększyły swój udział procentowy w strefie przykorowej węzła po pierwotnym zakażeniu skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym ich poziom również znamienne wzrósł, jednak były to wartości istotnie niższe od tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 28; Ryc. 33).

Odsetek komórek makrofagalnych **ED1+** zwiększył się znamienne w strefie przykorowej węzła po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją

materiału w porównaniu do grupy kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostał na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 28).

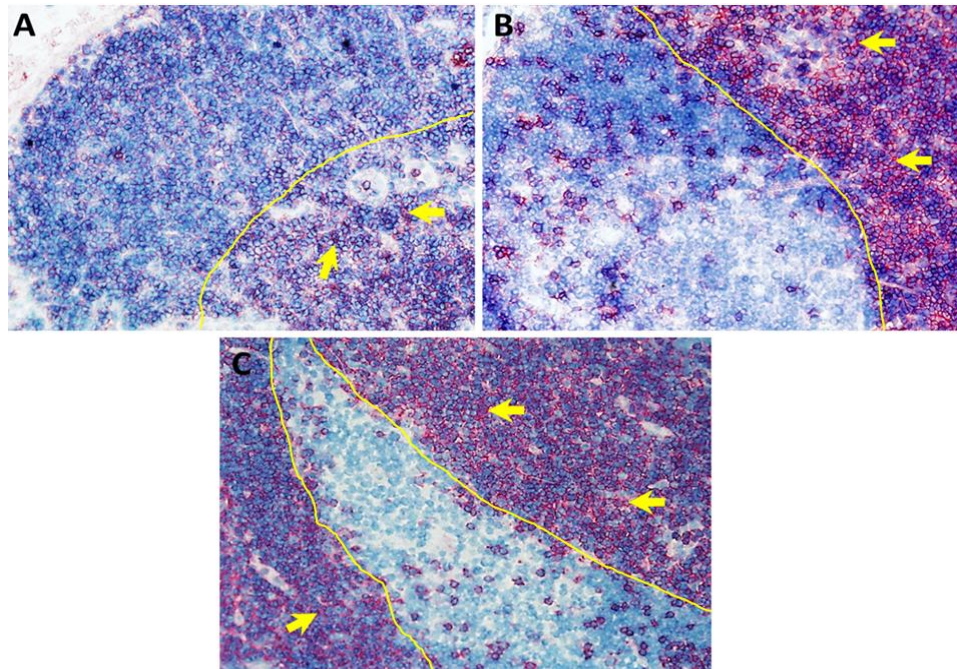
Subpopulacja komórek **CD31+** nie zareagowała zmianą odsetka w strefie przykorowej wężła po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym udział procentowy tych komórek był znamienne niższy od tego po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 29).

Odsetek komórek szpikowych i tymocytów **OX7+** zwiększył się istotnie po pierwotnym zakażeniu w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do grupy kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym ich udział był znamienne niższy od tego po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 29; Ryc. 34).

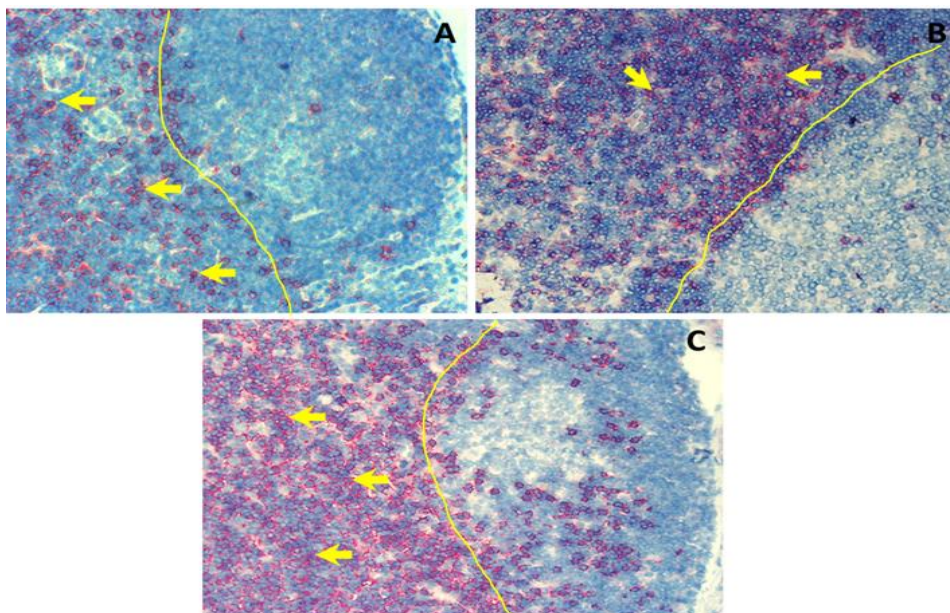
Poziom granulocytów **HiS48+** zwiększył się istotnie po zakażeniu pierwotnym i wtórnym skóry *S. epidermidis* w grupach z wczesną izolacją materiału. Udział procentowy, który osiągnęła subpopulacja granulocytów po zakażeniu wtórnym nie był jednak wyższy od tego po zakażeniu pierwotnym i wczesnej izolacji materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 29).

Zakażenie pierwotne skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału spowodowało znamienne statystycznie zwiększenie odsetka subpopulacji komórek **OX6+** w części przykorowej wężła w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym udział tych komórek również zwiększył się istotnie, jednak były to wartości podobne do tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 29; Ryc. 32).

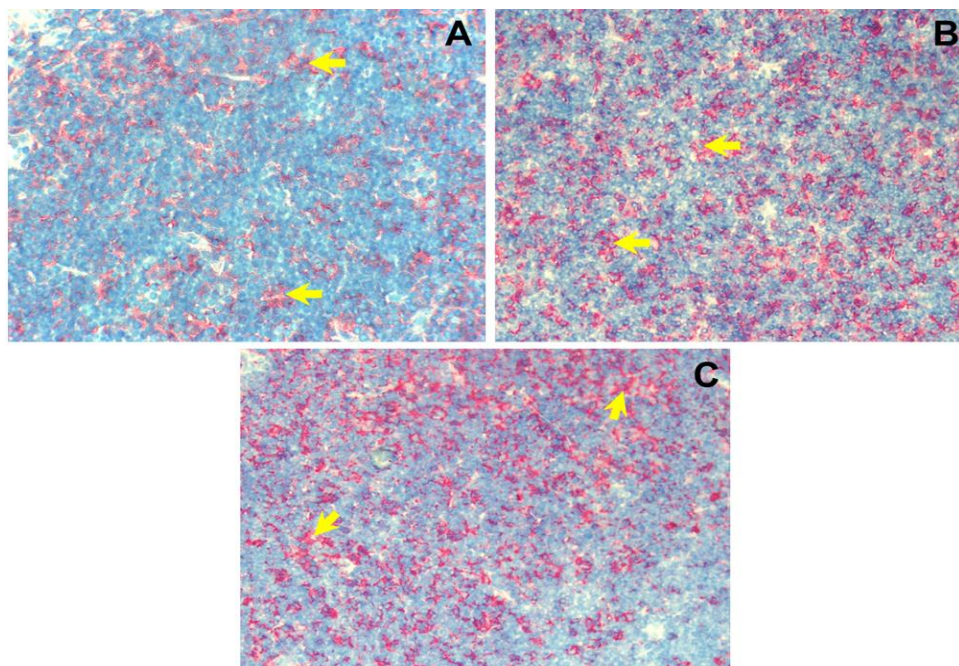
Pierwotne zakażenie w grupie z wczesną izolacją materiału spowodowało znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek wyrażających białko **CD54+** (ICAM-1+) w strefie przykorowej wężła. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału odsetek tych komórek pozostał na poziomie, który osiągnął w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 29).



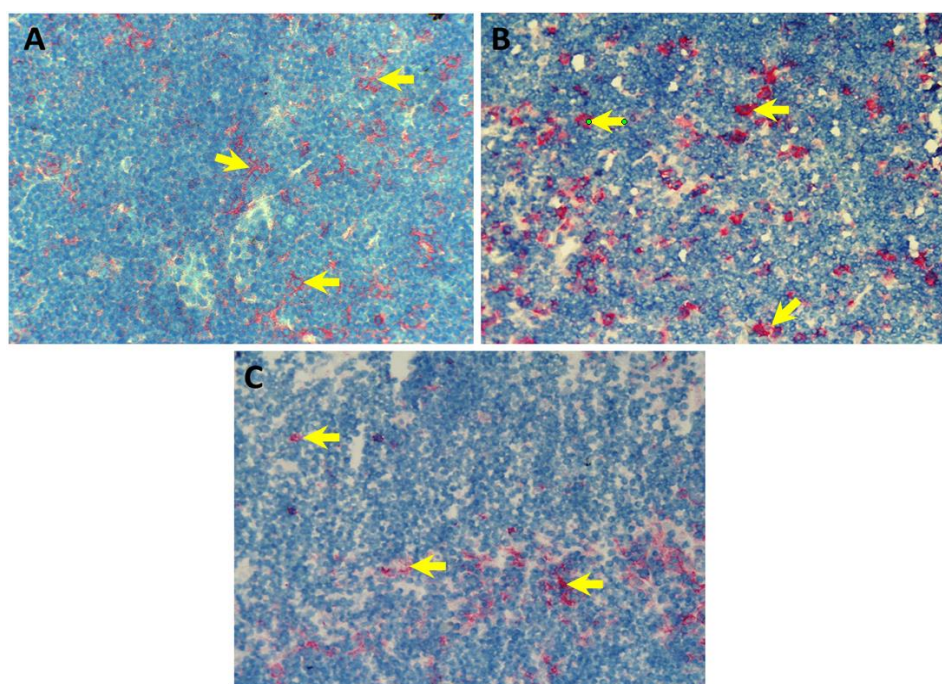
Ryc. 30. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą przykorową, oddzieloną żółtą linią) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **W3/13** (limfocyty T, granulocyty, monocyty - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.



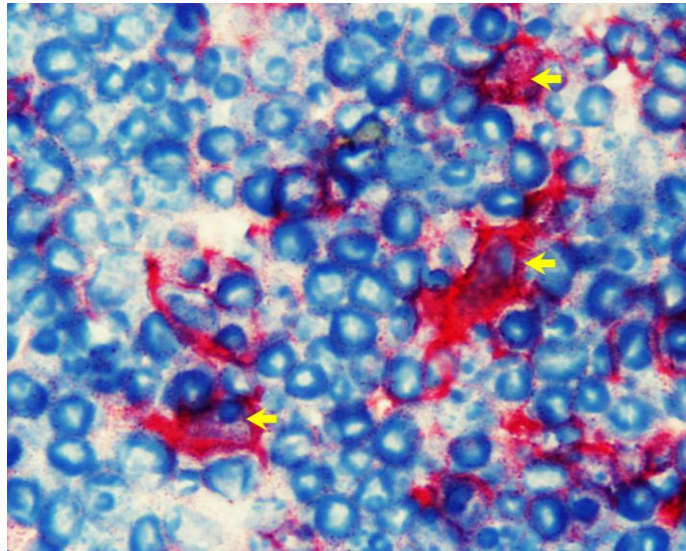
Ryc. 31. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą przykorową, oddzieloną żółtą linią) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX8** (limfocyty T cytotoksyczne - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.



Ryc. 32. Strefa przykorowa podkolanowych węzłów chłonnych szczura wybarwiona immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX6** (antygeny klasy II - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.

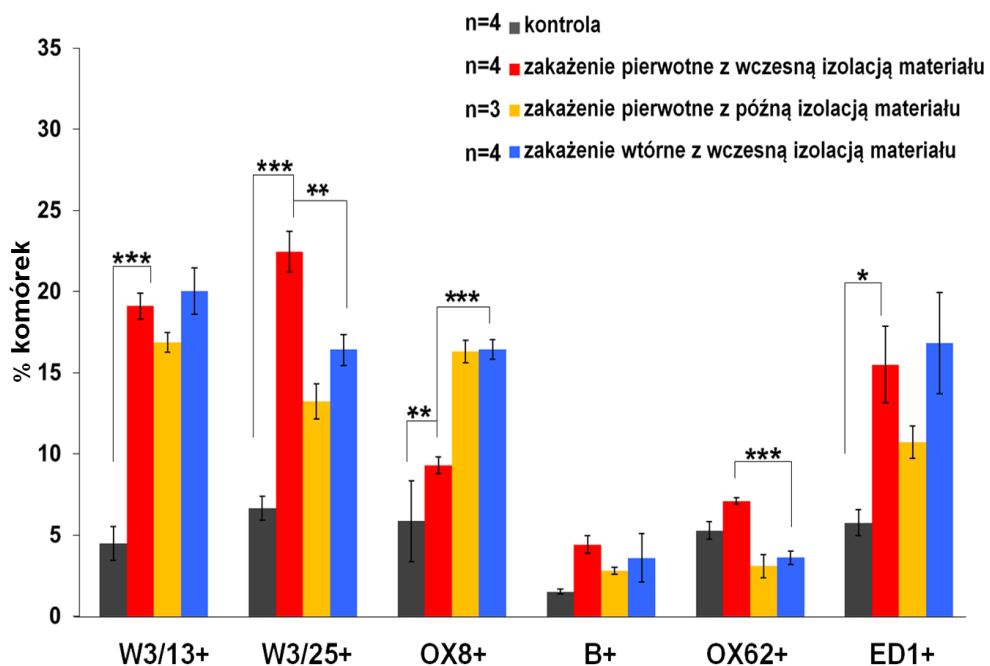


Ryc. 33. Strefa przykorowa podkolanowych węzłów chłonnych szczura wybarwiona immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX62** (komórki dendrytyczne - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x200. A- grupa kontrolna, B- grupa po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału, C- grupa po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* z wczesną izolacją materiału.

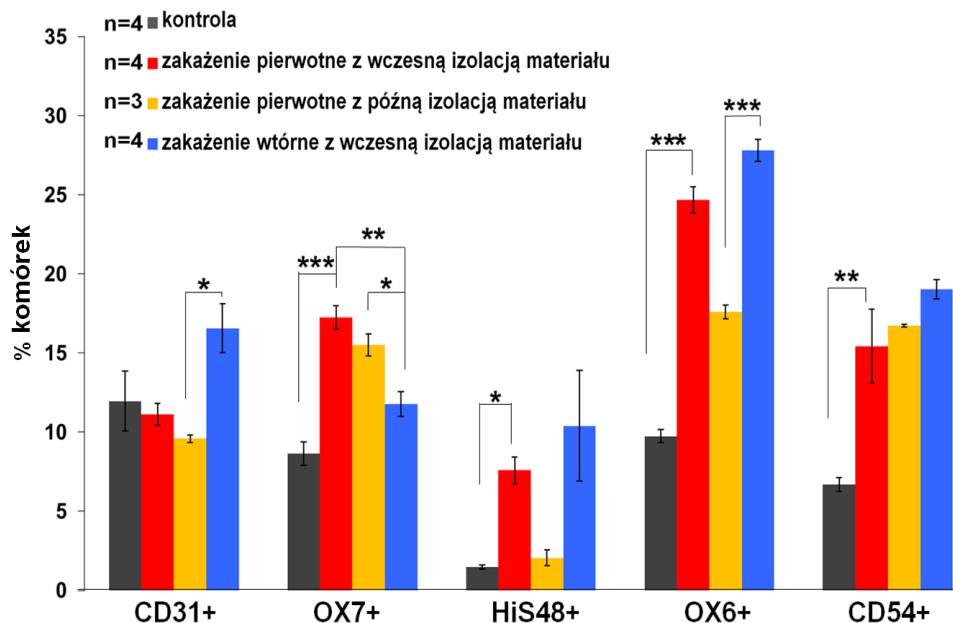


Ryc. 34. Komórki strefy przykorowej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX7** (komórki szpikowe, tymocyty - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000

4.4.4. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie rdzennej węzłów



Ryc. 35. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie rdzennej podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Ryc. 36. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie rdzennej podkolanowych węzłów chłonnych, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. Wyniki badań przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

W strefie rdzennej węzłów chłonnych nie zaobserwowano różnic w proporcjach pomiędzy poszczególnymi populacjami komórek.

Subpopulacja komórek **W3/13+** znamienne zwiększyła swój udział procentowy po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostała na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 35).

Odsetek komórek **W3/25+** po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału był istotnie wyższy od tego w grupie kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym ich udział był znamienne statystycznie niższy od wartości, które osiągnął po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 35; Ryc. 37).

Limfocyty T cytotoksyczne **OX8+** zareagowały znamienym wzrostem odsetka w strefie rdzennej węzłów po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym ich udział procentowy był istotnie wyższy od wartości jakie osiągnęły po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 35).

Poziom komórek **B** nie uległ istotnym statystycznie zmianom zarówno po zakażeniu pierwotnym jak i wtórnym skóry *S. epidermidis* w strefie rdzennej węzłów (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 35).

Udział komórek dendrytycznych **OX62+** w strefie rdzennej węzłów po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału był podobny do kontrolnego. Po wtórnym podaniu bakterii odsetek tych komórek znamienne obniżył się w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 35; Ryc. 38).

Komórki makrofagalne **ED1+** istotnie zwiększyły swój udział procentowy po pierwotnym zakażeniu skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału pozostały na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 35; Ryc. 39).

Udział komórek **CD31+** po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału był podobny do kontrolnego. Po wtórnym podaniu bakterii odsetek tej subpopulacji znamienne zwiększył się, jednak były to wartości podobne do tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 36).

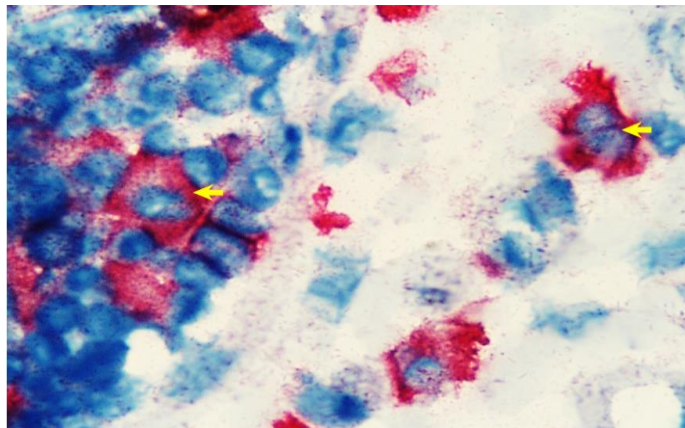
Komórki szpikowe i tymocyty **OX7+** zwiększyły istotnie swój udział procentowy po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału udział procentowy tej subpopulacji znamienne zmniejszył się w strefie rdzennej węzłów w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 36; Ryc. 40).

Granulocyty **HiS48+** zareagowały istotnym statystycznie wzrostem udziału procentowego w strefie rdzennej węzłów po pierwotnym zakażeniu *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po zakażeniu wtórnym pozostały na poziomie obserwowanym w grupach po zakażeniu pierwotnym (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 36).

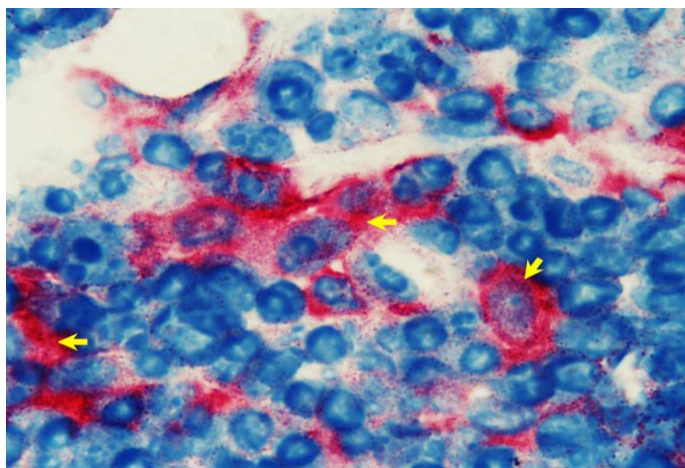
Udział procentowy subpopulacji komórek **OX6+** zwiększył się znamienne statystycznie po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do grupy kontrolnej. Po zakażeniu wtórnym ich

udział również znamienne zwiększył się, jednak były to wartości podobne do tych po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 36; Ryc. 41).

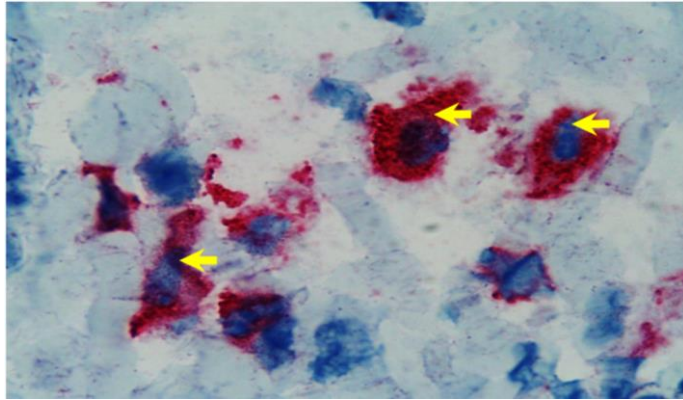
Odsetek subpopulacji komórek wyrażających białko ICAM-1 (CD54+) zwiększył się istotnie po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do kontroli. Po wtórnym podaniu tych samych bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału pozostał na poziomie, który osiągnął w grupach po zakażeniu pierwotnym skóry (Tab. 6; Ryc. 15; Ryc. 36).



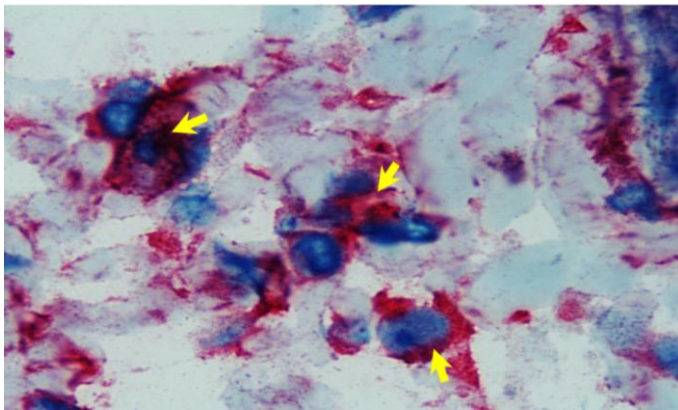
*Ryc. 37. Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **W3/25** (limfocyty T pomocnicze, makrofagi - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000.*



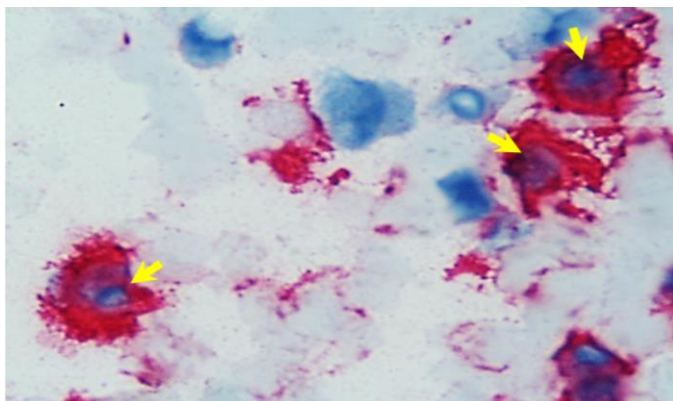
*Ryc. 38. Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX62** (komórki dendrytyczne - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000.*



*Ryc. 39. Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **ED1** (makrofagi, granulocyty - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000*



*Ryc. 40. Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX7** (komórki szpikowe, tymocyty - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000.*



*Ryc. 41. Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX6** (antygeny klasy II - kolor czerwony, przykładowo oznaczone żółtą strzałką), x1000.*

5. DYSKUSJA

Istotnym problemem klinicznym jest współistnienie zastoju limfatycznego kończyn i zakażenia tkanek objętych tym zastojem. Badania wykazały, że bakterie uważane do tej pory za saprofity skórne mogą być jednym z czynników biorących udział w patogenezie obrzęku limfatycznego (Olszewski, 1991).

Wiedza na temat typu odpowiedzi immunologicznej jaką wywołują w regionalnych węzłach chłonnych bakterie saprofityczne skóry jest ograniczona. Dlatego też istotne jest wykazanie, czy po zakażeniu saprofitami zachodzi odpowiedź humoralna i czy w przypadku wtórnego zakażenia tym samym antygenem mamy do czynienia z istnieniem pamięci immunologicznej. Niewiele wiadomo również, które typy komórek odpornościowych uczestniczą w pierwotnej i wtórnej eliminacji *Staphylococcus epidermidis* i czy współpraca tych komórek jest na tyle efektywna, aby doszło do przechwycenia antygeny, jego prezentacji oraz wytworzenia puli efektorowych komórek, dających efektywną wtórną odpowiedź immunologiczną.

Wyniki mojej pracy wykazały, że *Staphylococcus epidermidis* bytujący w warunkach normalnych na skórze i uznawany za saprofita wywołuje aktywację komórek układu immunologicznego u szczura po podaniu go do tkanek głębokich kończyny. Odpowiedź na wtórne podanie tego drobnoustroju była słabsza od pierwotnej lub pozostawała na jej poziomie, co mogłoby świadczyć o wykształceniu odporności nabytej swoistej na badany antygen i jego neutralizację przez przeciwciała wytwarzane przez komórki pamięci.

Zasługującą na uwagę obserwacją były wyniki oceny ogólnej **liczby komórek** w regionalnych (podkolanowych) węzłach chłonnych oraz **masy węzłów** po zakażeniu skóry *S. epidermidis*. Po pierwotnym podaniu bakterii w grupie z wczesną izolacją materiału zaobserwowałam wzrost liczby komórek w węzłach oraz masy węzłów. Po wtórnym podaniu tego samego drobnoustroju liczba komórek w węzłach pozostała na poziomie podobnym do tych po zakażeniu pierwotnym. Masa węzłów po zakażeniu wtórnym wzrosła jedynie w porównaniu do kontroli, jednak były to wartości niższe od tych po zakażeniu pierwotnym. Można wnioskować, iż odpowiedź komórkowa węzła osiągnęła po pierwszym zakażeniu swój szczyt w sensie liczby zaangażowanych (zmobilizowanych z krwi

przepływającej przez węzeł i w nim namnożonych) komórek lub też eliminacja antygeny regulowana przez komórki pamięci jest szybka i nie wymaga wielu komórek efektorowych. Różnicę w masie węzłów w grupach po pierwotnym i wtórnym podaniu bakterii można tłumaczyć większą masą komórek lub obrzękiem węzła po zakażeniu pierwotnym.

Wyniki te odpowiadają obserwacjom klinicznym u człowieka wykazującym, że procesowi zapalenia skóry towarzyszy większa przepuszczalność naczyń włosowatych, wynaczynianie białek, leukocytów, formowanie obrzęku limfatycznego, zwiększenie przepływu limfy w celu zatrzymania zawartych w niej obcych antygenów, wysokie stężenie cytokin oraz wysycenie węzłów chłonnych komórkami prezentującymi antygen. Transport komórek układu limfatycznego do regionalnych węzłów chłonnych u człowieka osiąga swój szczyt pomiędzy 4 a 6 godziną ostrego procesu zapalnego i pozostaje na tym poziomie do 2-3 dni. U pacjentów z kończyną dolną objętą pozapalnym obrzękiem limfatycznym obserwowano w badaniu limfoscyntygraficznym powiększone regionalne węzły chłonne (Olszewski, 2001). Z płynu tkankowego, limfy, naczyń limfatycznych kończyny dolnej oraz pachwinowych węzłów chłonnych hodowano saprofityczne szczepy bakteryjne w 70 procentach przypadków. Dominującymi były koagulazonegatywne *staphylococci* i *bacilli* (Olszewski, 2012).

Po zakażeniu tkanek w mechanizmie odporności wrodzonej nieswoistej uczestniczą takie komórki jak makrofagi, komórki dendrytyczne, NK, limfocyty $\gamma\delta$ T oraz granulocyty. Obejmuje ona proces wytwarzania cytokin, fagocytozy oraz zabijanie patogenów i komórek nimi zakażonych (Kędziora, 2009; Sochocka, 2008). Odporność nabyta swoista pozwala na eliminację patogenów w późnej fazie infekcji, jednocześnie uczestnicząc w kształtowaniu pamięci immunologicznej (Kędziora, 2009). Dominuje tu wytwarzanie przeciwciał, których produkcja zależy od limfocytów B. Uwagę skupia się więc na generacji limfocytów B pamięci oraz ich interakcji z antygenowo specyficznymi limfocytami pomocniczymi T CD4+ a także grudkowymi komórkami dendrytycznymi oraz makrofagami (Bevan, 2011).

Ocena cytometryczna zawiesiny komórek węzłów chłonnych pozwoliła ocenić zmiany odsetka poszczególnych populacji komórkowych biorących udział w odpowiedzi pierwotnej na zakażenie skóry *S. epidermidis* oraz przeanalizować,

które z nich mogłyby być odpowiedzialne za eliminację tego saprofita po infekcji wtórnej.

W ramach populacji limfocytów T różnice w reaktywności na zakażenie *S. epidermidis* wykształciła subpopulacja komórek T pomocniczych W3/25+ (CD4+) i T cytotoksycznych OX8+. Pierwotne zaangażowanie limfocytów T pomocniczych spowodowało ich spadek procentowy lub też było następstwem wzrostu odsetka subpopulacji komórek T cytotoksycznych. Miało to miejsce przy wzroście całkowitej masy (liczby) limfocytów w węźle, tak więc bezwzględna liczba limfocytów pomocniczych nie zmalała, zaś liczba limfocytów cytotoksycznych wzrosła znacznie. Populacja limfocytów T cytotoksycznych OX8+ wzrosła również po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do wartości obserwowanych po zakażeniu pierwotnym. Mogło to świadczyć o uruchomieniu mechanizmu nabytej odporności komórkowej na stosowany antygen.

Ważną obserwacją było także to, iż po siedmiu dniach codziennego zakażania nie było odpowiedzi komórek wyrażających białko W3/13, wśród których dominowały limfocyty T. Różnica pojawia się dopiero po zakażeniu wtórnym, kiedy zaobserwowano zwiększenie ich odsetka.

Pepper, (2011) wykazał, że limfocyty T pomocnicze efektorowe typu 1 po infekcji bakteryjnej migrują z centralnych narządów limfatycznych, co zwiększa szanse na spotkanie antygeny i ewentualnie pozostają w formie tzw. komórek Th1 efektorowych pamięci. Natomiast limfocyty T pomocnicze grudkowe pozostają w narządach limfoidalnych służąc pomocą limfocytom B. Pozostają tam tak długo, jak długo trwa czynność ośrodka rozmnażania. Nie wiadomo, czy komórki te obumierają później, czy pozostają w puli tzw. uniwersalnych centralnych limfocytów T pamięci wykazujących dużą plastyczność w odpowiedzi na dalszą inwazję antygenów.

Odsetek limfocytów B znakowanych trzema różnymi przeciwciałami (B, OX12, OX33) zmniejszył się po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym. Świadczyć to może o natychmiastowym zaangażowaniu w eliminację antygeny, czego nie zaobserwowano po zakażeniu pierwotnym, ponieważ nie wykształcił się

prawdopodobnie jeszcze mechanizm pamięci komórkowej. Zmniejszenie odsetka komórek B naiwnych mogło być wynikiem zwiększenia udziału limfocytów B pamięci.

Komórki B w stadium centrocytów selekcjonowane są pod kątem specyficzności antygenowej. *In vivo* obserwuje się wysoką śmiertelność wśród centrocytów. Natomiast, gdy te komórki są izolowane w warunkach *in vitro*, przechodzą apoptozę w ciągu kilku godzin hodowli. Apoptoza tych komórek może zostać opóźniona dzięki aktywacji poprzez przyłączenie białka CD40. Wówczas centrocyty zwiększają ekspresję immunoglobulin powierzchniowych i nabywają właściwości komórek pamięci (MacLennan, 1994). Po wtórnej ekspozycji na antygen tworzy się mała ilość, ale wysoce swoistych klonów komórek B pamięci. Pozwala to na skuteczną odpowiedź przy użyciu minimalnej liczby komórek B (Manser, 2004).

Sukcesywna odpowiedź immunologiczna zależy od zdolności komórek dendrytycznych do rozpoznawania patogenów, wydzielania cytokin zapalnych i prezentacji antygenów w celu zainicjowania aktywacji limfocytów T (Banchereau, 2000). Wyniki tej pracy wskazują na obniżenie udziału migrujących komórek dendrytycznych wyrażających białko OX62 w węzłach, w czasie trzech tygodni po zakażeniu pierwotnym skóry *Staphylococcus epidermidis* i utrzymanie na tym samym poziomie po zakażeniu wtórnym. Mogłoby to świadczyć o stałym zaangażowaniu tej subpopulacji komórek w eliminację antygeny.

Komórki dendrytyczne, które dotarły z tkanek obwodowych do drenujących węzłów chłonnych najczęściej pozostają w węzle i nie przemieszczają się drogą naczyń limfatycznych odprowadzających do dalszych węzłów (Girard, 2012; Braun, 2011). Wykazano, że często ulegają apoptozie po przedstawieniu antygeny komórce T, ograniczając reakcję immunologiczną. Hamowanie ich apoptozy wywołuje rozwój układowej choroby autoimmunologicznej (Chen, 2006).

Pierwotne i wtórne zakażenie skóry *S. epidermidis* spowodowało natychmiastowy wzrost procentowy populacji makrofagalnej ED1+.

Makrofagi stanowią pierwszą linię obrony przeciwko antygenom bakteryjnym. Charakteryzują się hamowaniem infekcji *S. epidermidis* poprzez eliminację antygeny bakteryjnego. Zubożenie liczby makrofagów u myszy

wywołuje zwiększoną zachorowalność po infekcji *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* (Silva, 2010). Funkcje makrofagów dotyczą pogranicza nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej. Zdolność fagocytarna makrofagów jest wydajniejsza jeśli patogen opłaszczony jest specyficznymi dla niego przeciwciałami. Jako pierwsza linia obrony rozpoznają one i niszczą mikroorganizmy oraz uszkodzone tkanki, a przy tym są również zdolne do prezentacji antygenów i zapoczątkowywania swoistych reakcji immunologicznych (Rennermalm, 2004).

Po zakażeniu wtórnym skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału wykazano istotne zmniejszenie udziału procentowego populacji komórek OX7+. Komórki te wyrażają na swej powierzchni antygen tymocytarny.

Cechą każdej ostrej reakcji immunologicznej u szczurów jest redukcja komórkowa grasicy (Frith, 2000). Wiele z patogenów wywołuje ciężkie infekcje, które są przyczyną inwolucji grasicy. Jej stopień koreluje z czasem trwania infekcji. Dotyczy ona głównie strefy korowej grasicy i spowodowana jest apoptozą tymocytów CD4+ i CD8+. Podanie *in vivo* gronkowcowej enterotoksyny B wyprodukowanej przez *Staphylococcus aureus* doprowadziło u zwierząt do inwolucji grasicy, która związana była z apoptozą tymocytów wyrażających białka CD4 i CD8. Limfotoksyna wytwarzana w czasie trwania infekcji bakteryjnych wywołuje inwolucję grasicy z towarzyszącym 95 procentowym zmniejszeniem liczby tymocytów (Verinaud, 2004).

Po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału zaobserwowano zwiększenie odsetka komórek wyrażających białko CD54. Pojawia się ono na pobudzonych antygenem komórkach.

Komórki CD54+ charakteryzują się ekspresją białka ICAM-1 uczestniczącego w przyleganiu komórek do siebie. Odpowiada ono na prozapalne cytokiny oraz uczestniczy w trzecim etapie wynaczynienia leukocytów. Pośredniczy w przyleganiu leukocytów do komórek śródbłonna. W modelu mysim, podanie gronkowcowej enterotoksyny typu A i B przyczyniło się do zwiększenia ekspresji białka ICAM-1 na powierzchni komórek, natomiast zablokowanie przeciwciałem tego białka lub jego ligandu spowodowało zredukowaną akumulację leukocytów w miejscach zapalenia. Wykazano zwiększenie ekspresji

ICAM-1 w maziówce u pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów, a także na śródbłonku naczyń w reakcjach nadwrażliwości opóźnionej w trakcie odrzucenia przeszczepu (Tessier, 1998).

Po wtórnym podaniu tego samego drobnoustroju udział komórek CD54+ obniżył się do poziomu wyjściowego, który był niższy niż w grupie po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału. Świadczyć to może o efektywności komórek pamięci, dzięki którym dochodzi do neutralizacji ponownie podanego antygeny.

Podobny efekt wtórnego zakażenia zaobserwowano w przypadku ekspresji antygenów klasy II (komórki OX6+) aktywowanych po wtargnięciu antygeny bakteryjnego, kiedy to widoczne było zmniejszenie udziału procentowego tych komórek. Ekspresja MHC klasy II u gryzoni obejmuje trzy typy komórek w węzłach chłonnych: makrofagi, komórki dendrytyczne oraz limfocyty B. Mają one za zadanie aktywację limfocytów T CD4+ (Itano, 2003). Zmniejszenie udziału powyższych komórek może świadczyć o tym, że pozostała niewielka ilość antygeny w tkance.

W subpopulacjach aktywowanych limfocytów T (W3/13+OX6+), (W3/25+ OX6+) zaobserwowano podobny efekt braku reakcji na zakażenie wtórne, które przejawiało się obniżeniem udziału procentowego tych subpopulacji. Obniżenie poziomu wtórnej odpowiedzi mogło być powiązane z pojawieniem się pamięci immunologicznej, która niesie ze sobą zmiany liczebności i dystrybucji limfocytów warunkujących efektywną odpowiedź przeciwko patogenom (Bevan, 2011).

Wykazano ponadto brak odpowiedzi na zakażenie ze strony limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+. Prawdopodobnie obserwacje te były zbyt krótkie dla powoli rozwijającego się procesu regulacji odpowiedzi immunologicznej.

Wyniki prac przedstawiających udział limfocytów T regulatorowych w odpowiedzi na bakterie saprofityczne przewodu pokarmowego, wykazały wysoki udział tych komórek w odpowiedzi w stanie homeostazy, dzięki czemu nie dochodziło do aktywacji drobnoustrojów i ich patologicznego działania. W warunkach zapalnych, którym towarzyszył współudział patogenów, układ immunologiczny nie odróżniał saprofitów od patogenów. Limfocyty T

regulatorowe zmniejszyły swój udział w odpowiedzi przeciwzapalnej, nie obserwowano zjawiska tolerancji immunologicznej i rozwijał się proces zapalny (Belkaid, 2013).

Wykazano również, że w warunkach homeostazy naskórkowe komórki Langerhansa pośredniczą w wywoływaniu tolerancji na własne antygeny bakteryjne skóry poprzez indukcję miejscowych limfocytów T regulatorowych CD4+Foxp3+ dzięki wydzielaniu TGF- β . Limfocyty T regulatorowe hamują proliferację komórek T CD4+ specyficznych dla tych bakterii. Cytokina TGF- β wykazuje silną rolę regulacyjną w utrzymaniu homeostazy mikroflory skóry. Wpływa na selektywną ekspresję TLR na komórkach Langerhansa, niską pochłaniania bakterii i niską ekspresję białek MHC klasy II (Van der Aar, 2013).

Układ immunologiczny wykształcił dwuliniowy mechanizm wtórnej eliminacji patogenów. Pierwszą linię tworzą wcześniej uformowane przeciwciała obecne w śluzówkach (IgA i IgG) oraz limfocyty T efektorowe obecne w miejscu inwazji patogenu. Ważne są również przeciwciała obecne w surowicy, które są pierwszą linią obrony przeciwko patogenom inicjującym infekcję drogą krwionośną. Drugą linię obrony tworzą limfocyty B i T pamięci obecne w tkankach limfatycznych, proliferujące i różnicujące w kierunku komórek efektorowych, migrujących do miejsc zakażenia. Komórki pamięci obecne w narządach limfatycznych znacznie szybciej rozwijają funkcje efektorowe niż komórki naiwne. Jednak znaczenie ich w tej najpilniejszej obronie jest ograniczone, ponieważ z opóźnieniem docierają do miejsc zakażenia. Najbardziej kluczową różnicą pomiędzy limfocytami T pamięci centralnymi a efektorowymi jest lokalizacja tych komórek. Niezdolność limfocytów T centralnych do szybkiego docierania do miejsc zakażenia i inicjacji obrony śluzówkowej zastępowana jest ich umiejętnością szybkiej proliferacji i wytworzenia dużej puli limfocytów efektorowych, które są kluczowe do ograniczenia rozprzestrzeniania zakażenia i oczyszczenia z patogenu (Sallusto, 2010).

W pracy tej postanowiono więc poddać analizie udział komórek B pamięci oraz centralnych i efektorowych limfocytów T pamięci w odpowiedzi na zakażenie skóry *S. epidermidis*.

W ocenie cytometrycznej wyniki wykazały spektakularny wzrost procentowego udziału limfocytów B pamięci (CD19+CD27+) w podkolanowych węzłach chłonnych po zakażeniu wtórnym *S. epidermidis*. Okres wytworzenia tej subpopulacji komórek wyniósł około 3 tygodni.

W eksperymencie Raman, (2003) wykazano, że związanie białka CD27 na aktywowanych limfocytach B podczas immunizacji T niezależnym antygenem prowadzi do generacji wysokiej liczby antygenowo specyficznych komórek B w regionalnych węzłach chłonnych myszy. Komórki te charakteryzowały się zdolnością długiego przeżywania. Końcowe analizy wykazały, że większość z tych komórek może być stymulowana do wydzielania specyficznych przeciwciał IgG i generowania silnej wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Proces związania białka CD27 na limfocytach B w trakcie pierwotnej odpowiedzi zwiększał powinowactwo do antygeny podczas wtórnej odpowiedzi. Prawdopodobnie klony komórek o wysokiej specyficzności antygenowej generowane podczas odpowiedzi pierwotnej były zdolne do różnicowania się w kierunku komórek plazmatycznych po wtórnej ekspozycji na antygen. Ponadto, traktowanie białkiem CD27 aktywowanych LPS-em komórek B zwiększało przeżycie, proliferację i przełączanie klasy syntetyzowanych przeciwciał, promując proliferację w kierunku komórek B pamięci. Związanie białka CD27 u myszy w trakcie pierwotnej odpowiedzi hamowała ją, natomiast zwiększała generację limfocytów B wtórnych. Te komórki 2 tygodnie po immunizacji *in vivo* mogły być skierowane do puli zdolnych do wytwarzania wtórnych izotypów przeciwciał. Proces związania białka CD27 na aktywowanych komórkach B może wywierać taki sam efekt u ludzi, myszy i może być wykorzystany jako stymulator układu immunologicznego służący do zwiększania odpowiedzi komórek pamięci. Komórki B pamięci człowieka wykazują obecność białka CD27 stale, mysie natomiast przejściowo. Ekspresja białka CD27 na pobudzonych limfocytach B jest niezbędna do indukcji wtórnej odpowiedzi u myszy. Komórki te charakteryzują się wysoką ekspresją receptora BCR, reagują na restymulację i uczestniczą w utrzymaniu długoterminowej odpowiedzi humoralnej. Ich przewlekła aktywacja stale generuje nowe komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała (Raman, 2003).

Hendriks, (2003) wykazał, że obniżona ekspresja białka CD27 na aktywowanych komórkach B redukuje przeżycie virusowo-specyficznym limfocytów T CD8+ w regionalnych węzłach chłonnych i w przewodzie piersiowym myszy.

Rola procesu wiązania białka CD27 jest niezwykle istotna jeśli chodzi o promocję pamięci limfocytów B i wydajność ostatecznego różnicowania. Poznanie molekularnych mechanizmów działania tego białka oraz inhibitorów uczestniczących w procesie hamowania jego ekspresji mogłoby być bezcenne do badań nad konstrukcją szczepionek (Satpathy, 2010).

Ciągłe zapotrzebowanie na skuteczne szczepionki przeciwko groźnym infekcjom zwraca uwagę na to, w jaki sposób limfocyty T i B pamięci zapewniają obronę dla organizmu. Limfocyty T CD4+ pamięci, poprzez umiejętność kierowania innymi komórkami układu immunologicznego są kluczowymi mediatorami odpowiedzi immunologicznej. Poprzez produkcję IFN- γ oraz IL-4 aktywują makrofagi do walki z określonym patogenem. Istnieje wiele doniesień, że ich obecność jest niezbędna do indukcji wtórnej odpowiedzi limfocytów B pamięci i produkcji przeciwciał. Posiadają one zdolność osłabiania wtórnej infekcji dzięki zdolności bezpośredniego zabijania zainfekowanych komórek, poprzez uwalnianie granzymu B lub perforyny. Komórki T pomocnicze pamięci CD4+ również wzmacniają produkcję oraz funkcjonowanie komórek T cytotoksycznych pamięci CD8+ (Bell, 2008).

Oceniając metodą cytometryczną populację limfocytów T pomocniczych pamięci CD4+CD45RC- wykazano wzrost ich odsetka w okresie 3 tygodni po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis*, ale zakażenie wtórne nie miało już dalszego wpływu na tworzenie tej populacji. Natomiast poziom limfocytów T pamięci pomocniczych efektorowych CD4+CD45RC-CD62L- po zakażeniu wtórnym wzrósł i były to wartości istotnie statystycznie wyższe od tych po zakażeniu pierwotnym.

Komórki CD62L- nie mają właściwości przylegania. Mogą więc migrować z węzła chłonnego, aby pełnić funkcje efektorowe w miejscu zapalenia. Wśród komórek T centralnych pamięci CD4+ wyszczególniono bardzo istotną subpopulację aktywowanych komórek, które charakteryzowały się zdolnością

szybkiej, zależnej od białek MHC klasy II proliferacji oraz niskim poziomem ekspresji następujących białek: CD122, CD127 i CD62L. Komórki te prawdopodobnie wyróżnia zdolność bardzo szybkiej odpowiedzi na bakterie saprofityczne (Laouar, 2008).

Klinger, (2009) zaobserwował w badaniu na szczurach, że limfocyty T pamięci CD4+CD45RC- oraz spoczynkowe T CD4+CD45RC+ charakteryzują się zredukowaną ekspresją CD62L 24 godziny po osiągnięciu regionalnych węzłów chłonnych w porównaniu do limfocytów T krwi obwodowej. Wysoki poziom CD62L na powierzchni limfocytów T umożliwia im wejście do drenujących węzłów chłonnych. Obniżenie poziomu CD62L w środowisku węzła chłonnego jest prawdopodobnie czynnikiem niezbędnym do indukcji odpowiedzi immunologicznej oraz ułatwia migrację w różnych strefach węzła. Poziom CD62L wyrażany przez obie subpopulacje jest podobny w różnych strefach węzła limfatycznego (w strefie komórek T, B i rdzennej). Dodatkowo limfocyty T pamięci CD45RC- wykazują statystycznie zwiększoną ekspresję białek LFA-1 i ICAM-1 w trzech wyżej wymienionych strefach węzła limfatycznego w porównaniu do spoczynkowych komórek T CD45RC+. W związku z tym, że limfocyty T pamięci CD4+CD45RC- nawet podczas wędrówki drogą krwionośną charakteryzują się obniżoną o około 50 procent w porównaniu do spoczynkowych limfocytów T CD4+ ekspresją L-selektyny (CD62L), z taką samą prędkością docierają do węzłów chłonnych. Jest to związane prawdopodobnie ze zwiększoną ekspresją na ich powierzchni wyżej wymienionych białek uczestniczących w przyleganiu komórek do siebie. Komórki pamięci T CD62L- charakteryzują się wysoką ekspresją integryny $\alpha 4\beta 1$, która umożliwia toczenie się, wiązanie do śródbłonna włóscinek żylnych i przejście do węzła chłonnego. Natomiast wszystkie limfocyty T strefy korowej węzłów chłonnych charakteryzują się wyższą ekspresją białka ICAM-1 w porównaniu do komórek T krwi, limfy, strefy T i rdzenia węzłów (Klinger, 2009).

Udział limfocytów T pamięci cytotoksycznych CD8+CD45RC- był największy po zakażeniu wtórnym skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału.

W odpowiedzi na bakterie saprofityczne skóry Shen, (2014) wykazał wysoki udział procentowy w drenujących węzłach chłonnych komórek T CD4+ i T

CD8+ o fenotypie limfocytów pamięci efektorowych. Wiele z proliferujących komórek wyrażało na swej powierzchni L-selektynę, co jest główną cechą limfocytów T pamięci centralnych i warunkuje migrację do drenujących węzłów chłonnych, oraz receptor CCR10 będący markerem komórek T efektorowych wędrujących ze skóry. Innymi białkami wyrażanymi na powierzchni proliferujących limfocytów T w odpowiedzi na saprofitę skórne były: TCR $\alpha\delta$, CD44, CD25, CD122. Niewiele z nich wykazywało obecność białka CD95. Zaobserwowano także, że poszczególne z tych komórek wyrażały na swej powierzchni receptory dla chemokin: CCR4, CCR6, CCR7 oraz CCR10 oraz IL-17A, IFN γ i IL-5. W odpowiedzi na takie drobnoustroje jak: *Corynebacteria*, *Staphylococci*, *Mycobacteria* i *Enterococci* wykazano intensywniejszą proliferację limfocytów T CD8+ w porównaniu do komórek T CD4+ (Shen, 2014).

Odsetek limfocytów T pamięci cytotoksycznych CD8+CD45RC-CD62L- wzrastał znamienne w okresie 3 tygodni po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis*, ale zakażenie wtórne nie miało już dalszego wpływu na tworzenie tej populacji.

Limfocyty te należą do efektorowych cytotoksycznych komórek T pamięci, opuszczających węzły limfatyczne i zdolnych do wytwarzania cytokin w miejscach objętych infekcją. Obecne w skórze limfocyty T pamięci CD8+ są subpopulacją komórek na stałe występujących u człowieka i myszy. Po infekcji patogenem, pozostają w tych miejscach zapewniając ochronę przeciw infekcjom wtórnym, a także szczepieniom. Wykazano w skórze myszy zakażonej wirusem opryszczki pospolitej, miejscowe limfocyty T pamięci CD8+, które po aktywacji indukowały wysoką liczbę czynnych genów przeciwwirusowych i przeciwbakteryjnych (Ariotti, 2014).

W eksperymencie Guardy, (2007) węzły chłonne drenujące miejsca z obecnymi dojrzałymi komórkami dendrytycznymi po inokulacji adiuwanta rekrutowały limfocyty T efektorowe i pamięci CD8+ CCR7- CD62L-. Wędrownica ta zachodziła drogą krwionośną i wymagała związania receptora CXCR3 wyrażanego na komórkach T i chemokiny CXCL9 obecnej na śródbłonku włóściczek żylnych węzła. W reaktywnych węzłach chłonnych rekrutowane komórki T wchodziły w stałe interakcje z komórkami dendrytycznymi z pochłoniętym antygenem, zabijały

je i w ten sposób ograniczały zdolność tych komórek do aktywacji naiwnych limfocytów T CD4+ i T CD8+. Indukowana rekrutacja przenoszonych z krwią limfocytów T efektorowych i pamięci do regionalnych węzłów chłonnych może reprezentować mechanizm kończący pierwotną odpowiedź oraz ograniczający wtórną odpowiedź immunologiczną.

Ocena morfometryczna skrawków immunohistochemicznych pozwoliła określić, które subpopulacje komórkowe biorą udział w pierwotnej eliminacji bakterii *Staphylococcus epidermidis* w każdej ze stref węzła chłonnego oraz porównać siłę odpowiedzi (w efekcie komórkowym) na wtórne podanie tego samego drobnoustroju.

Węzły chłonne są zorganizowanymi strukturami podzielonymi topograficznie na poszczególne rejony funkcjonalne. Strefy te są odpowiednio bogate w komórki odpowiedzialne za wyłapywanie antygeny, jego prezentację, wytworzenie odporności komórkowej oraz eliminację antygeny.

W **strefie brzeżnej** węzłów po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału wykazano zwiększenie odsetka limfocytów T pomocniczych, T cytotoksycznych, komórek B, granulocytów, monocytów, makrofagów, komórek szpikowych i tymocytów, komórek wyrażających antygeny klasy II oraz białko ICAM-1. Wykazano ponadto zmniejszenie udziału procentowego komórek CD31+ (PECAM-1+). Po wtórnym zakażeniu skóry w grupie z wczesną izolacją materiału zwiększyły swój udział procentowy komórki CD54+. Zmniejszył się natomiast odsetek migrujących komórek dendrytycznych, makrofagów, granulocytów oraz komórek CD31+.

Zwiększenie udziału procentowego makrofagów w strefie brzeżnej węzłów po pierwotnym podaniu antygeny *S. epidermidis* daje szansę na jego przechwycenie z limfy doprowadzającej, aby następnie przetransportować w kierunku limfocytów B przemieszczających się do grudek chłonnych (Cyster, 2010). Po zakażeniu wtórnym udział makrofagów zmniejszył się do wartości obserwowanych wyjściowo. Te komórki podobnie jak dendrytyczne, jako komórki prezentujące antygen mogą ulegać martwicy pod wpływem zaangażowania w eliminację antygeny. Zmniejszenie udziału makrofagów może również świadczyć o

silnej aktywności neutrofilii, które usuwają zainfekowane patogenem makrofagi (Chtanova, 2008).

Związanie bakterii z komórką żerną jest niezwykle ważnym etapem odpowiedzi przeciwbakteryjnej, od którego zależy wchłonięcie patogenu i uruchomienie mechanizmów cytotoksycznych. Po zakażeniu pierwotnym *S. epidermidis* w strefie brzeżnej węzłów zwiększyły swój udział granulocyty HiS48+. Neutrofile są komórkami odgrywającymi istotną rolę w procesie fagocytozy oraz uśmiercania bakterii zewnątrzkomórkowych.

Chtanova, (2008) wykazała, że po infekcji *T. gondii* w strefie brzeżnej węzłów chłonnych migrujące granulocyty tworzyły „rojące się” skupiska, zmieniając strukturę węzłów poprzez usuwanie zainfekowanych makrofagów. Spekuluje się, że tworzenie skupisk daje szansę neutrofilom na zwiększenie stężenia wydzielanych produktów bakteriobójczych, usprawniając mechanizmy odporności poprzez wywołanie stanu zapalnego i zapewnienie ochrony przed patogenem.

Po zakażeniu wtórnym *S. epidermidis* wykazano zmniejszony udział granulocytów w powyższej strefie węzła, co mogło świadczyć o szybkiej eliminacji bakterii, być może w mechanizmie humoralnym z przeciwciałami.

Efektorowe mechanizmy fagocytów aktywowanych przeciwko bakteriom zewnątrzkomórkowym obejmują proces fagocytozy, uwalniania białek ziarnistych przez neutrofile oraz kooperację makrofagów/monocytów z neutrofilami. Ludzkie makrofagi zainfekowane *in vitro* *Streptococcus pyogenes* wydzielają chemokiny przyciągające neutrofile i monocyty. Przeciwbakteryjne działanie hodowanych makrofagów przeciwko *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa* jest wzmocniona dzięki ich kooperacji z neutrofilami. Mechanizm tej kooperacji oparty jest na uwalnianiu przeciwbakteryjnych białek przez neutrofile w kierunku zainfekowanych makrofagów (Silva, 2010).

Odsetek limfocytów B po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis* również zwiększył się w tym rejonie węzła, co dawało szansę na rozwój efektywnej odpowiedzi na ten rodzaj drobnoustroju.

Carrasco, (2007) wykazał u myszy, po 24 godzinach od infekcji *E. coli* wysoką liczbę makrofagów z pochłoniętym antygenem w strefie brzeżnej

podkolanowych węzłów chłonnych oraz aktywowanych limfocytów B, które prawdopodobnie przejęły antygen od makrofagów i przemieszczały się w kierunku płaszcza grudek limfatycznych w celu zapoczątkowania odpowiedzi humoralnej. Interakcje pomiędzy makrofagami i limfocytami B w strefie brzeżnej węzła pozwalają antygenowo specyficznym komórkom B nabywać antygeny i internalizować je przez receptor BCR przed ich migracją do strefy kooperacji z limfocytami T pomocniczymi (Cyster, 2010).

Po zakażeniu wtórnym skóry *S. epidermidis* udział komórek B pozostał na szczytowym poziomie w strefie brzeżnej węzłów, co mogło świadczyć o stałym zaangażowaniu tej populacji komórek w eliminację antygeny.

Zwiększony udział limfocytów T pod torebką łącznotkankową węzła po zakażeniu pierwotnym, daje dużą szansę na dotarcie w okolice płaszcza grudki i aktywację specyficznym antygenowo komórkom B (Jakóbisiak, 2007). Po zakażeniu wtórnym skóry *S. epidermidis* poziom komórek T pozostał na poziomie obserwowanym po zakażeniu pierwotnym. Wskazywać to może na proces neutralizacji antygeny przez przeciwciała po wtórnym zakażeniu i brak konieczności aktywacji wysokiej liczby komórek uczestniczących w procesie prezentacji antygeny.

Inna w porównaniu z uprzednio wymienionymi populacjami jest reakcja migrujących komórek dendrytycznych, wyrażających białko OX62 w strefie brzeżnej węzłów. Po zakażeniu pierwotnym ich poziom nie wzrastał, a po wtórnym był istotnie statystycznie niższy od tego po zakażeniu pierwotnym.

Komórki te pod wpływem antygeny bakteryjnego i zaangażowania w jego eliminację mogą ulegać martwicy i rozpadowi. Komórki dendrytyczne migrujące z obwodu, przechodzą najpierw przez zatokę strefy brzeżnej węzła, przeplatając makrofagi, zanim dotrą do strefy przykorowej, aby osiąść w pobliżu żyłek wysłanych wysokimi komórkami śródbłonna (Card, 2014).

Obecne w węzłach makrofagi i migrujące komórki dendrytyczne dzielą pomiędzy sobą funkcje prezentacji antygeny. Małe, wolne mikroorganizmy docierające do zatoki brzeżnej węzła przechwytywane są od razu przez makrofagi (Junt, 2007; Hickman, 2008). Większe patogeny dostają się do regionalnego węzła chłonnego na powierzchni migrujących komórek dendrytycznych (Cyster, 2010).

W odpowiedzi na czynnik zapalny organizm wykształcił mechanizmy usprawniające procesy migracji komórek. Odpowiedzialne są za to między innymi białka uczestniczące w przyleganiu komórek do siebie zapoczątkowujące te procesy. Komórki CD54+ wyrażające białko ICAM-1 zwiększyły swój udział procentowy w strefie brzeżnej węzłów po pierwotnej infekcji *S. epidermidis*. Świadczyć to może o pobudzeniu tych komórek przez antygen bakteryjny, zwiększeniu interakcji międzykomórkowych oraz przekazywaniu sygnałów prowadzących do wytworzenia efektywnej odpowiedzi.

In vivo wysoka ekspresja białka ICAM-1 na komórkach układu immunologicznego obserwowana była po infekcji takimi patogenami jak: *Haemophilus influenzae*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Mycobacterium tuberculosis* (Clare, 2003).

Po zakażeniu wtórnym skóry *S. epidermidis* również wzrósł odsetek komórek wyrażających białko ICAM-1 co mogło świadczyć o tym, że komórki te uczestniczyły we wtórnej eliminacji bakterii wciąż obecnych w tkance. Białka uczestniczące w przyleganiu komórek do siebie: ICAM-1 i VCAM-1 wyrażane na komórkach strefy brzeżnej węzła mogą ułatwiać przyleganie limfocytów B do innych komórek i tym samym doprowadzać do ich aktywacji przy niższej dawce patogenu (Phan, 2007; Carrasco, 2007; Junt, 2007).

Udział komórek CD31+ wyrażających białko PECAM-1 zmniejszył się w strefie brzeżnej węzłów po zakażeniu pierwotnym i wtórnym *S. epidermidis*, co może świadczyć o stałym zaangażowaniu tej subpopulacji komórek w eliminację antygeny.

Białko PECAM-1 wiąże bakterie Gram (+), (gronkowce, paciorkowce, *Listeria i Bacillus*) a także *Salmonella typhimurium* u myszy i człowieka. Główną jej rolę w zapaleniu jest kontrola procesu wynaczyniania leukocytów. Rola białka PECAM-1 w procesie zapalnym zależy od rodzaju bodźca zapalnego oraz udziału określonych cytokin zapalnych. Myszy z deficytem tego białka wykazują zmniejszoną zachorowalność po doustnej infekcji *Salmonella typhimurium* oraz znikome wysycenie komórkami bakteryjnymi wątroby, śledziony, mózgu oraz krezkowych węzłów chłonnych. Natomiast infekcja LPS-em myszy z deficytem PECAM-1 powodowała wysoką ich śmiertelność ze względu na brak ekspresji tego

białka w układzie naczyniowym, na komórkach śródbłonna, oraz brak tworzenia połączeń międzykomórkowych. Zrozumienie mechanizmów regulacji zapalenia oraz rozprzestrzeniania się patogenów przez białko PECAM-1 może pomóc w opracowaniu nowych możliwości terapeutycznych w oparciu o blokadę wiązania PECAM-1 (Lovelace, 2013).

Grudki limfatyczne węzłów chłonnych są miejscem rozwoju ośrodków rozrodczych w odpowiedzi na antygen. Mikrośrodowisko ośrodków rozmnażania zapewnia dynamiczną niszę, w której aktywowane limfocyty B wspólnie z depozytami antygeny na grudkowych komórkach dendrytycznych oraz pomocniczymi limfocytami T, stanowią podstawę do generowania długotrwałej humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Ośrodki rozmnażania w grudkach są głównym źródłem populacji limfocytów B efektorowych i są niezbędne do wytworzenia przeciwciał o wysokim powinowactwie, stanowiących istotną ochronę przeciw zakaźnym patogenom. Ma to zasadnicze znaczenie dla skuteczności praktycznie wszystkich szczepionek (Gatto, 2010).

Po pierwotnym zakażeniu skóry *Staphylococcus epidermidis* w grudkach podkolanowych węzłów chłonnych wykazano istotny wzrost udziału limfocytów T, B, granulocytów, monocytów, makrofagów, komórek szpikowych i tymocytów, komórek charakteryzujących się ekspresją białka CD31, MHC klasy II oraz ICAM-1+ do których również należą grudkowe komórki dendrytyczne. Silna odpowiedź komórek grudek węzłów na pierwotne zakażenie skóry *S. epidermidis* może świadczyć o wyczerpującej odpowiedzi ośrodków rozrodczych prowadzącej do wytworzenia puli limfocytów B efektorowych oraz przeciwciał specyficznych dla danego antygeny (Gatto, 2010). Grudkowe komórki dendrytyczne charakteryzują się ekspresją receptora TLR4, który wykrywa LPS pochodzący z bakterii Gram (-). Ekspresja TLR4 jest zwiększona w czasie reakcji ośrodków rozmnażania, co sugeruje że grudkowe komórki dendrytyczne bezpośrednio reagują na ligandy drobnoustrojów za pośrednictwem receptorów wrodzonych i tym samym wpływają na adaptacyjną odpowiedź immunologiczną. Rolą grudkowych komórek dendrytycznych jest pomoc w aktywacji limfocytów B, prawdopodobnie poprzez mechanizmy związane z wydzielaniem chemokin i (lub) ekspresję FcγRIIB (Aguzzi, 2014).

Po zakażeniu wtórnym skóry *S. epidermidis* zwiększył się tylko udział komórek wyrażających molekułę ICAM-1 w grudkach limfatycznych. Wtórna, wysoce efektywna odpowiedź komórek B ośrodków rozrodczych często związana jest z antygenem utrzymywanym w formie immunokompleksów obecnych na grudkowych komórkach dendrytycznych. Dawka oraz czas ekspozycji na antygen kontroluje generację limfocytów T pomocniczych w grudkach (Aguzzi, 2014).

Strefa przykorowa węzłów chłonnych jest miejscem migracji limfocytów T, ich spotkania z komórką dendrytyczną niosącą pokrewny antygen, prezentacji antygeny w kontekście MHC oraz powstania puli komórek efektorowych. Jest to obszar grasiczozależny węzła. W strefie przykorowej ma ujście wiele naczyń włosowatych wysłanych wysokimi komórkami śródbłonna, przez które naiwne limfocyty T, B, monocyty, granulocyty wnikają na drodze chemotaksji. Proces ten wywołują czynniki zapalne (Card, 2014).

Po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* wykazano zwiększenie udziału limfocytów T pomocniczych oraz cytotoksycznych, komórek B, granulocytów, monocytów, makrofagów, migrujących komórek dendrytycznych, komórek szpikowych i tymocytów, komórek wyrażających antygeny klasy II oraz białko ICAM-1. Wyniki te wskazują na silną reakcję komórek układu immunologicznego na infekcję skóry *S. epidermidis*. Proces taki pozwala na uzyskanie wysokiej liczby antygenowo specyficznych komórek T efektorowych.

Obecność antygenowo specyficznych limfocytów pomocniczych T CD4+ jest czynnikiem wpływającym na jakość pierwotnej i (lub) wtórnej odpowiedzi limfocytów cytotoksycznych T CD8+. Stwierdzono bowiem, że komórki T CD8+ tworzą również długotrwałe kontakty z komórką dendrytyczną niosącą na swej powierzchni antygen. Interakcje komórki dendrytycznej z limfocytom T CD4+ przyczyniają się do zwiększenia zdolności dojrzewania komórek dendrytycznych w następstwie czego dochodzi do rekrutacji specyficznych dla danego antygeny komórek T CD8+ (Breart, 2006).

Podanie myszom LPS-u i bakterii Gram (-) spowodowało migrację monocytów do regionalnych węzłów chłonnych, gdzie nabywały zdolności i właściwości komórek dendrytycznych. Charakteryzowały się morfologią komórek dendrytycznych i posiadały zdolność do prezentacji antygenów limfocytom T

CD4+ i T CD8+. Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego skutecznie prezentują antygen limfocytom T, co sugeruje że monocyty przyczyniają się do odpowiedzi antygenowo specyficznych komórek T, na wielu etapach odpowiedzi immunologicznej (Sallusto, 2010).

Komórki dendrytyczne w strefie przykorowej węzła odgrywają dużą rolę w inicjacji antybakteryjnej odpowiedzi immunologicznej. Są niezbędne do stymulacji naiwnych limfocytów T CD8+ i T CD4+ w obecności drobnoustrojów (Sallusto, 2010). Limfocyty T i migrujące komórki dendrytyczne są w ciągłym kontakcie z siatką komórek zrębu w strefie przykorowej węzła. Dostarcza im ona sygnałów do przeżycia, np. IL-7, i zawiera antygeny przez co sprzyja klonalnej ekspansji limfocytów T (Card, 2014).

Komórki wyrażające na swej powierzchni antygen OX7 (tymocyty, komórki szpikowe), wyselekcjonowane w grasicy migrują do wtórnych narządów limfatycznych, gdzie uczestniczą w wytwarzaniu odporności przeciwko patogenom. Ich odsetek wzrastał po zakażeniu pierwotnym skóry *S. epidermidis* w strefie przykorowej węzłów. Po zakażeniu wtórnym w grupie z wczesną izolacją materiału udział procentowy tych komórek istotnie obniżył się.

Dootrzewnowa infekcja myszy bakterią *Francisella tularensis* spowodowała redukcję masy grasicy oraz zmniejszenie ilości tymocytów w jej korze. Wykazano jednocześnie znaczne zmniejszenie limfocytów T w strefie grasiczozależnej narządów limfatycznych (Ito, 1985).

Po zakażeniu wtórnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału zmniejszyły swój udział procentowy także limfocyty T pomocnicze, migrujące komórki dendrytyczne, komórki wyrażające białko CD31. Można przypuszczać, że w odpowiedzi na zakażenie wtórne nie była potrzebna aż tak wysoka liczba komórek efektorowych, ponieważ funkcję procesu rozpoczęcia eliminacji antygeny przejęły przeciwciała.

Po pierwotnej ekspozycji na antygen *S. epidermidis* w **strefie rdzennej** węzłów zaobserwowano znamienne statystycznie zwiększenie udziału procentowego limfocytów T pomocniczych oraz cytotoksycznych, monocytów, granulocytów, makrofagów, komórek szpikowych i tymocytów, komórek wrażliwych na antygeny klasy II oraz białko ICAM-1.

W czasie zapalenia wyjście limfocytów z węzłów chłonnych jest przejściowo zamknięte (Card, 2014). Stan ten został uzyskany po pierwotnym zakażeniu saprofitem skórnym, w związku z czym akumulacja komórek w tym rejonie węzła nasiliła się.

Po zakażeniu wtórnym skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału zaobserwowano tylko zwiększenie udziału procentowego limfocytów T cytotoksycznych, ponadto zmniejszenie odsetka limfocytów T pomocniczych i makrofagów, migrujących komórek dendrytycznych oraz tymocytów i komórek szpikowych.

Aktywowane w wyniku klonalnej ekspansji w strefie przykorowej węzła limfocyty T efektorowe oraz pamięci zmniejszają ekspresję CCR7 i L-selektyny. W zamian za to wyrażają one wysoki poziom receptora S1PR1 wrażliwego na chemotaktyczne działanie ligandu S1P, który jest ekspresjonowany na śródbłonku limfatycznym zatok korowych oraz naczyń limfatycznych odprowadzających. Związanie ligandu z receptorem sygnalizuje przejście limfocytów T do zatok korowych, rdzennych, a następnie zgodnie z przepływem płynu do naczyń limfatycznych odprowadzających i opuszczenie węzła. U myszy, u których komórki śródbłonka limfatycznego LYVE-1+ nie produkują S1P nie zaobserwowano opuszczania węzła chłonnego przez limfocyty (Card, 2014).

Podsumowując, pierwotne podskórne podanie szczurom skórnego saprofita *Staphylococcus epidermidis* wywołało silną odpowiedź głównych komórek węzłów chłonnych, które uczestniczą w przechwytywaniu antygeny, a także jego prezentacji w strefie przykorowej oraz w grudkach węzła. Aktywacja tak wielu komórek we wszystkich strefach węzła prawdopodobnie przyczyniła się do sprawnej eliminacji podanego antygeny i powstania wysokiej liczby komórek efektorowych, w tym komórek pamięci. Po wtórnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* odpowiedź komórkowa węzłów nie osiągnęła poziomu wyższego od tego po pierwotnym zakażeniu, a nawet w przypadku wielu subpopulacji komórkowych była obniżona.

U podstaw ograniczenia wtórnej odpowiedzi leżeć może zaobserwowane przeze mnie wyraźne zwiększenie udziału procentowego populacji komórek B i T pamięci immunologicznej. Nie miały na to natomiast wpływu komórki T

regulatorowe. Pozostaje więc do wyjaśnienia mechanizm działania komórek pamięci ograniczający rekrutację i aktywację komórek węzła. Można przypuszczać, iż komórki pamięci uruchamiały szybką odpowiedź humoralną w postaci produkcji przeciwciał specyficznych dla antygeny bakteryjnego poznanego w czasie pierwotnego zakażenia.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

PIERWOTNE ZAKAŻENIE skóry szczura *Staphylococcus epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału spowodowało znamienne zwiększenie liczby komórek w podkolanowych węzłach chłonnych i masy węzłów w porównaniu do grupy kontrolnej.

W ocenie cytometrycznej zwiększył się istotnie statystycznie udział procentowy cytotoksycznych limfocytów T OX8+, makrofagów ED1+ oraz komórek wyrażających białko ICAM-1 (CD54+). Zmniejszył się natomiast procentowy udział komórek W3/25+ (limfocyty T pomocnicze, makrofagi) w pełnej zawieszynie komórek węzłów.

W okresie 3 tygodni od zakażenia pierwotnego zwiększył się znamienne udział limfocytów T pomocniczych pamięci (CD4+/CD45RC-) oraz cytotoksycznych T pamięci (CD8+/CD45RC-/CD62L-).

Rozkład komórek w poszczególnych strefach węzła chłonnego pozwolił na szczegółową ocenę ich dystrybucji.

W ocenie morfometrycznej w badaniu immunohistochemicznym w *strefie brzeżnej* węzłów zaobserwowano istotne zwiększenie odsetka komórek W3/13+ (limfocyty T, granulocyty, monocyty), komórek W3/25+ (limfocyty T, makrofagi), limfocytów T cytotoksycznych OX8+, komórek B, makrofagów ED1+, komórek szpikowych i tymocytów OX7+, granulocytów HiS48+, komórek wyrażających białko MHC kl. II (OX6+) oraz ICAM-1 (CD54+). Wykazano ponadto zmniejszenie udziału procentowego komórek CD31+ (komórki śródbłonna, PECAM-1+, limfocyty B, T, granulocyty i monocyty).

W grudkach chłonnych węzłów zaobserwowano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek wyrażających następujące antygeny: W3/13+, W3/25+, ED1+, CD31+, OX7+, HiS48+, OX6+ i CD54+.

W strefie przykorowej węzłów wykazano istotne statystycznie zwiększenie odsetka komórek wyrażających następujące antygeny: W3/13+, W3/25+, OX8+, B+, OX62+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ oraz CD54+.

W *strefie rdzennej* węzłów zaobserwowano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek wyrażających następujące antygeny: W3/13+, W3/25+, OX8+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ oraz CD54+.

Po **WTÓRNYM ZAKAŻENIU** skóry szczura *Staphylococcus epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału liczba komórek w podkolanowych węzłach chłonnych pozostawała na poziomie podobnym do tych po zakażeniu pierwotnym. Masa węzłów natomiast była niższa niż po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału.

W **ocenie cytometrycznej** wykazano istotne zwiększenie udziału procentowego komórek W3/13+, OX8+, ED1+ oraz zmniejszenie odsetka populacji limfocytów B (B+, OX12+, OX33+), komórek OX7+, OX62+, OX6+, CD54+ oraz aktywowanych limfocytów T (W3/13+OX6+) i (W3/25+OX6+).

Wtórna odpowiedź charakteryzowała się ponadto znamionym statystycznie zwiększeniem w węzłach udziału procentowego subpopulacji komórek B pamięci (CD19+CD27+), T pamięci pomocniczych (CD4+/CD45RC-/CD62L-) oraz T pamięci cytotoksycznych (CD8+/CD45RC-).

Nie zaobserwowano ilościowych zmian subpopulacji komórek T regulatorowych/supresorowych (CD4+/CD25+).

W **ocenie morfometrycznej** w badaniu immunohistochemicznym po wtórnym zakażeniu skóry *Staphylococcus epidermidis* w *strefie brzeżnej* węzłów zaobserwowano znamienne statystycznie zwiększenie udziału procentowego komórek CD54+. Zmniejszył się natomiast istotnie statystycznie odsetek komórek wyrażających następujące antygeny: OX62+, ED1+, CD31+ oraz HiS48+. Pozostałe populacje komórkowe pozostały na poziomie procentowym podobnym do tego po pierwotnym zakażeniu skóry w grupie z wczesną izolacją materiału.

W *grudkach chłonnych* węzłów wykazano istotne statystycznie zwiększenie udziału procentowego komórek CD54+ oraz zmniejszenie odsetka komórek CD31+. Udział procentowy pozostałych populacji pozostawał na poziomie obserwowanym po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału.

W *strefie przykorowej* węzłów stwierdzono znamienne statystycznie zmniejszenie udziału procentowego komórek wyrażających następujące antygeny:

W3/25+, OX62+, CD31+ i OX7+. Pozostałe populacje komórkowe pozostały na poziomie procentowym podobnym do tego po pierwotnym zakażeniu skóry w grupie z wczesną izolacją materiału.

W *strefie rdzennej* węzłów po zakażeniu wtórnym wykazano znamienne statystycznie zwiększenie udziału procentowego komórek OX8+ oraz istotne zmniejszenie odsetka komórek W3/25+, OX62+ i OX7+. Udział procentowy pozostałych populacji pozostawał na poziomie obserwowanym po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału.

7. WNIOSKI

Ad. celu 1. Niezmienione proporcje poszczególnych populacji komórkowych węzłów chłonnych po pierwotnym zakażeniu skóry *Staphylococcus epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, przy jednocześnie zwiększonej bezwzględnej liczbie komórek mogłyby świadczyć o tym, iż organizacja komórkowa węzła jest przygotowana ewolucyjnie na przyjęcie antygeny bakteryjnego ze skóry, a odpowiedź polega głównie na zwiększonej rekrutacji z krwi fenotypów komórek obecnych w węzle już przed zakażeniem.

Ad. celu 2. Brak zwiększenia liczby komórek w węzłach i masy węzłów po wtórnym zakażeniu skóry *Staphylococcus epidermidis* ponad wartości zaobserwowane po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału sugeruje, że w węzle może zachodzić neutralizacja lub eliminacja antygeny bakteryjnego przez przygotowane już klony limfocytów pamięci komórkowej.

Ad. celu 3. Chociaż mechanizm neutralizacji lub eliminacji antygeny bakteryjnego nie został zbadany w niniejszej pracy to obserwacja zwiększenia udziału procentowego limfocytów B i T pamięci, ale nie limfocytów T regulatorowych mogłaby wskazywać na szybką miejscową odpowiedź humoralną przez przeciwciała specyficzne dla podanego antygeny bakteryjnego wytworzone w czasie pierwotnego zakażenia.

8. PIŚMIENICTWO

1. **Aebischer D.**, Iolyeva M., Halina C.: The inflammatory response of lymphatic endothelium. *Angiogenesis*: 17; 383–393 (2014).
2. **Agematsu K.**, Hokibara S., Nagumo H., Komiyama A.: CD27: a memory B-cell marker. *Trends Immunology Today*: 21; 204-206 (2000).
3. **Agematsu K.**, H. Nagumo, F. Yang, T. Nakazawa, K. Fukushima, S. Ito, K. Sugita, T. Mori, T. Kobata, C. Morimoto, A. Komiyama: B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur. J. Immunol.*: 27; 2073 - 2079 (1997).
4. **Aguzzi A.**, K. Jan, N. J. Kräutler: Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends in Immunology*: March; 35, 3 (2014).
5. **Anderson S. M.**, Hannum L. G., Shlomchik M. J.: Memory B Cell Survival and Function in the Absence of Secreted Antibody and Immune Complexes on Follicular Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*: 176; 4515-4519 (2006).
6. **Arce S.**, E. Luger, G. Muehlinghaus, G. Cassese, A. Hauser, A. Horst, K. Lehnert, M. Odendahl, D. Honemann, K. D. Heller, Kleinschmidt H., Berek C., Dörner T., Krenn V., Hiepe F., Bargou R., Radbruch A., Manz R. A.: CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *J. Leukocyte Biol.*: 75; 1022–1028 (2004).
7. **Ariotti S.**, Hogenbirk M. A., Dijkgraaf F. E., Visser L. L., Hoekstra M. E., Song Ji-Ying, Jacobs H., Haanen J. B., Schumacher T. N.: Skin-resident memory CD8+ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science*: 346; 101-105 (2014).
8. **Arpin C.**, Dechanet J., Van Kooten C., Merville P., Grouard G., Briere F., Banchereau J., and Liu Y. J.: Generation of memory B cells and plasma cells *in vitro*. *Science*: 268; 720 (1995).
9. **Avery T. D.**, Ellyard J. I., Mackay F., Corcoran L. M., Hodgkin P. D., Tangye S. G.: Increased Expression of CD27 on Activated Human Memory B Cells Correlates with Their Commitment to the Plasma Cell Lineage. *The Journal of Immunology*: 174; 4034-4042 (2005).
10. **Baldazzi V.**, Paci P., Bernaschi M. i Castiglione F.: Modeling lymphocyte homing and encounters in lymph nodes: *BMC Bioinformatics*; 10; 387 (2009).

11. **Banchereau J.**, Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K.: Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev.Immunol.*: 18; 767-811 (2000).
12. **Batista F. D.**, Harwood N. E.: The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews*: 9; 15-26 (2009).
13. **Belkaid Y.**, Bouladoux N., Hand T. W.: Effector and Memory T cell Responses to Commensal Bacteria. *Trends Immunol.*: 34; 299–306 (2013).
14. **Bell E. B.**, Westermann J. : CD4 memory T cells on trial: immunological memory without a memory T cell. *Trends in immunology*: 29; 405–411 (2008).
15. **Bevan M. J.**: Understand memory, design better vaccines. *Nature Immunology*: 12; 463–465 (2011).
16. **Boyman O.**, Letourneau S., Krieg C., Sprent J.:Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur.J. Immunology*: 39; 2088-2094 (2009).
17. **Braun A.**, Worbs T., Moschovakis G.L., Halle S., Hoffmann K., Bolter J. i wsp.: Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nature Immunology*: 12; 879-887 (2011)
18. **Breart B.**, Bousso P.: Cellular orchestration of T cell priming in lymph nodes. *Current Opinion in Immunology*: 18; 483–490 (2006).
19. **Buiting A. M.**, De Rover Z., Kraal G., van Rooijen N.: Humoral immune responses against particulate bacterial antigens are dependent on marginal metallophilic macrophages in the spleen. *Scand. J. Immunol.*: 43; 398–405 (1996).
20. **Cahalan M. D.**, Parker I. : Imaging the choreography of lymphocyte trafficking and the immune response. *Current Opinion in Immunology*: 18; 476–482 (2006).
21. **Card C. M.**, Yu S. S., Swartz M. A.: Emerging roles of lymphatic endothelium in regulating adaptive immunity. *The Journal of Clinical Investigation*: 124; 943-952 (2014).
22. **Carrasco Y.**, Batista F.: B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity*: 27; 160–171 (2007).

- 23. Carter R. H.**, Myers Riley: Germinal center structure and function: Lessons from CD19. *Seminars in Immunology*: 20; 43–48 (2008).
- 24. Caux CH.**, Vanbervliet B., Massachier C., Ait-Yahia S., Vaure C., Chemin K., Dieu-Nosjean M.-C., Vicari A.: Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation*: 73; 7-11 (2002).
- 25. Chen M.**, Wang Y.H., Wang Y., Huang L., Sandoval H., Liu Y.J., Wang J.: Dendritic Cell Apoptosis in the Maintenance of Immune Tolerance. *Science*: 311; 1160-1164 (2006).
- 26. Chen Y.**, Pikkarainen T., Elomaa O., Soininen R., Kodama T., Kraal G., Tryggvason K.: Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *J. Immunol.*: 175; 8173–8180 (2005).
- 27. Choe J.**, and Y. S. Choi. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol.*: 28; 508 (1998).
- 28. Chomiczewska D.**, Trznadel-Budźko E., Kaczorowska A., Rotsztejn H.: Znaczenie komórek Langerhansa w układzie immunologicznym skóry. *Pol. Merk. Lek.*: XXVI, 153; 173-177 (2009).
- 29. Chtanova T.**, Schaeffer M., Han S-J., van Dooren G. G, Nollmann M., Herzmark P., Chan S. W., Satija H., Camfield K., Aaron H., Striepen B., Robey E. A.: Dynamics of Neutrophil Migration in Lymph Nodes during Infection. *Immunity*: 29; 487–496 (2008).
- 30. Clare S.**, Goldin R., Hale Ch., Aspinall R., Simmons C., Mastroeni P., Dougan G.: Intracellular Adhesion Molecule Plays a Key Role in Acquired Immunity to Salmonellosis. *Infection and Immunity*: 71; 5881–5891 (2003).
- 31. Cyster J. G.**: B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nature Immunology*: 11; 989-996 (2010).
- 32. Ebner S.**, Ehammer Z., Holzmann S. i wsp.: Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int. Immunol.*: 16; 877-887 (2004).
- 33. Flacher V.**, Bouschbacher M., Verronese E. i wsp.: Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J. Immunol.* 177; 7959-7967 (2006).

- 34. Forster R.,** Davalos-Misslitz A. C., Rot, A.: CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Rev. Immunol.*: 8; 362–371 (2008).
- 35. Fossum S.:** The Architecture of Rat Lymph Nodes. Representralen University of Oslo; 15-25 (1983).
- 36. Frith C. H.,** Ward J. M., Chandra M., Losco P. E.: Non-proliferative Lesions of the Hematopoietic System in Rats. *Guides for Toxicologic Pathology* (2000).
- 37. Garcia de Vinuesa, C.,** P. O'Leary, D. M.-Y. Sze, K.-M. Toellner, and I. C. M. MacLennan.: T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *Eur. J. Immunol.*: 29; 1314–1327 (1999).
- 38. Gatto D.,** Brink R.: The germinal center reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*: 126; 898-907 (2010).
- 39. Girard J. P.,** Moussion C., Forster R.: HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*: 12; 762–773 (2012).
- 40. Gołęb J.,** Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T. *Immunologia*. Warszawa: PWN; 172–173; 221; 259–269 (2009).
- 41. Gołęb J.,** Jakóbisiak M., Lasek W.: *Immunologia*, Warszawa, PWN; 164-173; 259-260 (2002).
- 42. Grice E. A.,** Segre J. A.: The skin microbiome. *Nature*: 9; 244-253 (2011).
- 43. Guarda G.,** Hons M., Soriano S. F., Huang A. Y., Polley R., Fontecha M.- A., Stein J. V., Germain R. N., Lanzavecchia A., Sallusto F.: L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nature Immunology*: 8; 743 - 752 (2007).
- 44. Hendrix J.,** Xiao Y., Borst J.: CD27 promotes activated T cell survival and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J. Exp. Med.*: 198; 1369 (2003).
- 45. Hickman H. D.,** Takeda K., Skon C. N., Murray F. R., Hensley S. E., Loomis J., Barber G. N., Bennink J. R., Yewdell J. W.: Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nature Immunol.*: 9; 155–165 (2008).

- 46. Huggins J.**, Pellegrin T., Felgar R. E., Wei Ch., Brown M., Zheng B., Milner E. C. B., Bernstein S. H., Sanz I., Zand M. S.: CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells. *Blood*: 109; 1611-1619 (2007).
- 47. Itano A. A.**, Jenkins M. K.: Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology*: 4; 733 – 739 (2003).
- 48. 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*: 19; 47–57 (2003).
- 49. Ito M.**, Nishiyama K., Hyodo S., Shigeta S., Ito T.: Weight reduction of thymus and depletion of lymphocytes of T-dependent areas in peripheral lymphoid tissues of mice infected with *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*: 49; 812–818 (1985).
- 50. Jagła M.**, Cichocka-Jarosz E.: Limfocyty T regulatorowe. *Alergia Astma Immunologia*: 12; 22-29 (2007).
- 51. Jakóbisiak M.**, Gołąb J.: Prezentacja antygenów limfocytom T. W: Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa; 205-222 (2007).
- 52. Janatpour M. J.**, Hudak S., Sathe M., Sedgwick J. D., McEvoy L. M.: Tumor necrosis factor-dependent segmental control MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment. *J. Exp.Med.*: 194; 1375-1384 (2001).
- 53. Jasiulewicz A.**, Lisowska K. A., Bryl E., Witkowski J. M.: The role of B-lymphocytes in the pathomechanism of selected diseases. *Forum Medycyny Rodzinnej*: 5; 37–46 (2011).
- 54. Jenkinson McEwan D.**: The basis of the skin surface ecosystem. *Skin Microflora Microbial Skin Disease*; 1-33 (1993).
- 55. Jung J.**, J. Choe, L. Li, and Y. S. Choi.: Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10. *Eur. J. Immunol.*: 30; 2437 (2000).
- 56. Junt T.**, Moseman E. A., Iannaccone M., Massberg S., Lang P. A., Boes M., Fink K., Henrickson S.E., Shayakhmetov D.M., Di Paolo N.C., van Rooijen N., Mempel T.R.,

Whelan S.P., von Andrian U.H.: Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature*: 450; 110–114 (2007).

57. Junt T., Scandella E., Ludewig B.: Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nature*: 8; 764-775 (2008).

58. Kahn C. M., Line S. : The Merck Veterinary Manual, 10th Edition, Wiley ISBN: 978-0-911910-93-3, Hardcover (2010).

59. Kallies A., J. Hasbold, D. M. Tarlinton, W. Dietrich, L. M. Corcoran, P. D. Hodgkin, and S. L. Nutt.: Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in Blimp-1 expression. *J. Exp. Med.*: 200; 967 (2004).

60. Kędziora S., Słotwiński R.: Molecular mechanisms associated with recognition of pathogens by receptors of innate immunity. *Postepy Hig. Med. Dośw.*: 63; 30-38 (2009).

61. Kissenpfennig A., Henri S., Dubois B. i wsp.: Dynamics and Function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph nodes areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*: 22; 643-654 (2005).

62. Klinger A., Gebert A., Bieber K., Kalies K., Ager A., Bell E. B., Westermann J.: Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. *International Immunology*: 21; 443-455 (2009).

63. Koppel E. A. , Wieland C. W., van den Berg V. C. M, Litjens M., Florquin S., Kooyk Y. van, van der Poll T., Geijtenbeek T. B. H.: Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.*: 35; 2962–2969 (2005).

64. Kraal G., van der Laan L. J., Elomaa O., Tryggvason K.: The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect.*: 2; 313–316 (2000).

65. Laouar A., Manocha M., Haridas V., Manjunath N.: Concurrent Generation of Effector and Central Memory CD8 T Cells during Vaccinia Virus Infection.: *PloS one* 3; e4089 (2008).

66. Leigh A. S., A. Neil B., Don M.: Phenotypic characterization of regulatory CD4+CD25+ T cells in rats. *International Immunology*: 16; 365-375 (2004).

- 67. Lovelace M. D.,** May Lin Yap M. L., Jana Yip J., Muller W., Wijburg O., Denise E. Jackson D. E.: Absence of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, PECAM-1/CD31, In Vivo Increases Resistance to Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Mice. *Infect and Immunity*: 81; 1952-1963 (2013).
- 68. Ma L.,** Mauro C., Cornish G. H., Chai J. G., Coe D., Fu H., Patton D., Okkenhaug K., Franzoso G., Dyson J.: Ig gene-like molecule CD31 plays a nonredundant role in the regulation of T-cell immunity and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 19461–19466. doi:10.1073/pnas.1011748107 (2010).
- 69. Mackay C. R.,** Marston W. L., Dudler L.: Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.*: 171; 801 (1990).
- 70. MacLennan Ian C. M.:** Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, 12; 117-139 (1994) .
- 71. Macpherson A. J.,** Harris N. L.: Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Rev. Immunol.*: 4; 478–485 (2004).
- 72. Macpherson A. J.,** Smith K.: Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J. Exp. Med.*: 203; 497–500 (2006).
- 73. Macpherson A. J.,** Uhr T.: Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*: 303; 1662–1665 (2004).
- 74. Manser T.:** Textbook Germinal Centers? *The Journal of Immunology*: 15; 3369-3375 (2004).
- 75. Masopust D.,** Vezys V., Marzo A. L., Lefrancois L.: Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*: 291; 2413-2417 (2001).
- 76. McHugh R.S.,** Shevach E. M., Thornton A.M.: Control of organ-specific autoimmunity by immunoregulatory CD4+CD25+ T cells. *Microbes Infect.*: 3; 919–927 (2001).
- 77. McLean A. R.,** Michie C.A.: In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc. Natl. acad. Sci. Usa.*: 92; 3707 (1995).
- 78. Merville P.,** Dechanet J., Grouard G., Durand I., Banchereau J.: T cell-induced B cell blasts differentiate into plasma cells when cultured on bone marrow stroma with IL-3 and IL-10. *Int. Immunol.*: 7; 635 (1995).

- 79. Moussion C.,** Girard J.P.: Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature*: 479; 542-546 (2011).
- 80. Nagumo H.,** Agematsu K.: Synergistic response of IL-10 and CD27/CD70 interaction in B cell immunoglobulin synthesis. *Immunology*: 94; 388 - 394 (1998).
- 81. Nakamura K.,** Kitani A., Fuss I., Pedersen A., Harada N., Nawata H., Strober W.: TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.*: 172; 834-842 (2004).
- 82. Obukhanych T. V.,** Nussenzweig M. C.: T-independent type II immune responses generate memory B cells. *The Journal of Experimental Medicine*: 13; 305-310 (2006).
- 83. Ohtani O.,** Ohtani Y., Carati C. J., Gannon B. J.: Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatics labirinths and Aquaporin-1 expression. *Arch. Histol. Cytol.*: 66; 261-272 (2003).
- 84. Ohtani O.,** Ohtani Y.: Recent Developments in Morphology of Lymphatic Vessels and Lymph Nodes. *Annals of Vascular Diseases*: 5; 145-150 (2012).
- 85. Ohtani O.,** Ohtani Y.: Structure and function of rat lymph nodes. *Arch. Histol. Cytol.*: 71; 69-76 (2008).
- 86. Olszewski W. L.:** Atlas układu limfatycznego kończyn dolnych. Francja: Les Laboratoires Servier; 33-38 (2006).
- 87. Olszewski W. L.:** De novo lymph node formation in chronic inflammation of the human leg. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*: 979; 166-177 (2002).
- 88. Olszewski W. L.:** Episodic dermatolymphangioadenitis (DLA) in patients with lymphedema of lower extremities before and after administration of benzathine penicillin. *Lymphology*: 29; 126-131 (1996) a.
- 89. Olszewski W. L.:** Function of the lymphatic system in inflammation. *Phlebology*: 35; 22-26 (2001).
- 90. Olszewski W. L.:** Infection in: Lee B.-B., Bergan J., Rockson S. G.: Lymphoedema. Springer: Chapter 25; 207 (2011).

- 91. Olszewski W. L.,** Grzelak I., Ziółkowska A., Engeset A.: Immune cell traffic from blood through the normal human skin to lymphatics. *Clin Dermatol.*: 13; 473-483 (1995).
- 92. Olszewski W. L.,** Jain P., Zaleska M., Stelmach E., Swoboda E.: Chronic lower limb wounds evoke systemic response of the lymphatic (immune) system. *Indian Journal of Plastic Surgery*: 45; 255-260 (2012).
- 93. Olszewski W. L.,** Jamal S.: Skin bacterial factor in progression of filarial lymphedema. *Lymphology*:27; 148-149 (1994).
- 94. Olszewski W. L.,** Jamal S., Manokaran G., Pani S., Kumaraswami V., Kubicka U., Łukomska B., Dworzczynski A., Swoboda E., Meisel-Mikołajczyk F.: Bacteriologic studies of skin, tissue fluid, lymph, and lymph nodes in patients with filarial lymphedema. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*: 57; 7-15 (1997).
- 95. Olszewski W. L.,** Jamal S., Manokaran G., Pani S., Kumaraswami V., Kubicka U., Łukomska B., Tripathi F. M., Swoboda E., Meisel-Mikołajczyk F., Stelmach E., Zaleska M.: Bacteriological studies of blood, tissue fluid, lymph and lymph nodes in patients with acute dermatolymphangioadenitis (DLA) in course of filaria lymphedema” *ActaTropica*: 73; 217-224 (1999).
- 96. Olszewski W. L.,** Kubicka U.: Immunohistochemical studies of skin in secondary lymphedema of limbs reveals presence of chronic inflammatory reaction. *Lymphology*: 29 (suppl); 327-330 (1996) b.
- 97. Olszewski W. L.:** Recurrent bacterial dermatolymphangioadenitis (DLA) is responsible for progression of lymphedema. *Lymphology*: 29 (suppl); 331-334 (1996)c.
- 98. Olszewski W. L.:** Lymphangitis in: Lymph stasis: pathophysiology, diagnosis and treatment. Boca Raton, Fla: CRC Press.; 293-298 (1991).
- 99. Palframan R. T.,** Jung S., Cheng G., Weninger W., Luo Y., Dorf M., Littman D. R., Rollins B. J., Zweerink H., Rot A., von Andrian U. H.: Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.*: 194; 1361-1373 (2001).
- 100. Pape K.,** Catron D., Itano A., Jenkins M.: The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity*: 26; 491-502 (2007).

- 101. Pepper M., Jenkins M. K.:** Origins of CD4+effector and central memory T cells. *Nature Immunology*: 12; 467-471 (2011).
- 102. Phan T., Grigorova I., Okada T., Cyster, J.:** Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nature Immunol.*: 8; 992–1000 (2007).
- 103. Raman V. S., Akondy R. S., Rath S., Bal V., George A.** Ligation of CD27 on B Cells In Vivo during Primary Immunization Enhances Commitment to Memory B Cell Responses: *J. Immunol.*: 171; 5876-5881 (2003).
- 104. Read S., Malmstrom V., Powrie F.:** Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.*: 192; 295–302 (2000).
- 105. Rennermalm A., Nilsson M., Flock J-I.** The Fibrinogen Binding Protein of *Staphylococcus epidermidis* Is aTarget for Opsonic Antibodies: *Infection and Immunity*: 72; 3081–3083 (2004).
- 106. Rescigno M.:** Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends in immunology*: 10; 425-431 (2002).
- 107. Sallusto F., Lanzavecchia A., Araki K., Ahmed R.:** From Vaccines to Memory and Back. *Immunity*: 33; 451-463 (2010).
- 108. Sallusto F., Lanzavecchia A.:** Monocytes Join the Dendritic Cell Family. *Cell*: 143; 339-340 (2010).
- 109. Sarawar S. R., Sparshott S. M., Sutton P., Yang C. -P., Bell E. B.:** Rapid re-expression of CD45RC on rat CD4 T cells in vitro correlates with a change in Function. *Eur. J. Immunol.*: 23; 103 (1993).
- 110. SAS Institute Inc.** SAS/STAT® 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc (2012).
- 111. Satpathy S., Gautam N. S., Sheetal K.,Tushar V., Bal V., Rath S.,George A.:** Inhibition of Terminal Differentiation of B Cells Mediated by CD27 and CD40 Involves Signaling through JNK. *The Journal of Immunology*: 185; 6499-6507 (2010).

- 112. Shen W.,** Li W., Hixon J. A., Bouladoux N., Belkaid Y., Dzutsev A., Durum S.K.: Adaptive immunity to murine skin commensals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 111; E2977-86 (2014).
- 113. Shenoy Gautam N.,** Priyadarshini Chatterjee, Sheetal Kaw, Snigdha Mukherjee, Deepak K. Rathore, Vineeta Bal, Satyajit Rath, Anna George: Recruitment of Memory B Cells to Lymph Nodes Remote from the Site of Immunization Requires an Inflammatory Stimulus. *J. Immunol.*: 189; 521-528 (2012).
- 114. Sheridan B. S.,** Lefrancois L.: Regional and mucosal memory T cells. *Nature immunology*: 12; 485-491 (2011)
- 115. Shi Ch.,** Pamer E. G.: Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*: 11; 762-774 (2011).
- 116. Siegrist C. A.:** Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*: 19; 3331-3346 (2001).
- 117. Silva M. T.:** When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology*: 87; 93-106 (2010).
- 118. Slifka M. K.,** Antia R., Whitmire J. K., Ahmed R.: Humoral immunity due to longlived plasma cells. *Immunity*: 8; 363-72 (1998).
- 119. Sochocka M.:** Recognition of pathogens by innate immunity. *Postepy Hig. Med. Dośw.*: 62; 676-687 (2008).
- 120. Sparshott S. M.,** Bell E. B.: Lymphocyte trafficking: CD4 T cells with a 'memory' phenotype (CD45RC-) freely cross lymph node high endothelial venules in vivo. *Immunology*: 93; 447-454 (1998).
- 121. Sparshott S. M.,** Bell E. B.: Membrane CD45R isoform exchange on CD4 T cells is rapid, frequent and dynamic in vivo. *Eur. J. Immunol.*: 24; 2573 (1994).
- 122. Szczęsny G.,** Interewicz B., Swoboda-Kopeć E., Olszewski W. L., Górecki A., Wasilewski P.: Bacteriology of callus of closed fractures of tibia and femur. *J. Trauma*: 65; 837-842 (2008).
- 123. Śledź-Gawrońska B.:** The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in immunopathologies. *Journal of Laboratory Diagnostics*: 46; 147-153 (2010).

- 124. Tadokoro C. E.,** Shakhar G., Shen S., Ding Y., Lino A. C., Maraver A., Lafaille J. J., Dustin M. L.: Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.*: 203; 505-511 (2006).
- 125. Tang Q.,** Adams J.Y., Tooley A. J., Fife B. T., Serra P., Santamaria P., Locksley R. M., Krummel M. F., Bluestone J. A.: Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.*: 7; 83-92 (2006).
- 126. Tangye, S. G.,** Avery D. T., Hodgkin P. D.: A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells. *J. Immunol.*: 170; 261 (2003).
- 127. Tangye S. G.,** Tarlinton D. M.: Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*: 39; 2065-2075 (2009).
- 128. Teijeira A. ,** Russo E., Halina C.: Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Seminars in Immunopathology*.: 36; 261-274 (2014).
- 129. Tessier P. A.,** Naccache P. H., Diener K.R., Gladue R. P., Neote K. S., Clark-Lewis I., McColl S. R.: Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF-alpha. *J. Immunol.* 161; 1204-11 (1998).
- 130. Underhill G. H.,** Kolli K. P., Kansas G. S.: Complexity within the plasma cell compartment of mice deficient in both E- and P-selectin: implications for plasma cell differentiation. *Blood*: 102; 4076 (2003).
- 131. Valladeau J.,** Saeland S.: Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.*: 17; 273-283 (2005).
- 132. Van der Aar A. M.,** Picavet D. I., Muller F. J., de Boer L., van Capel T. M., Zaat S. A., Bos J. D., Janssen H., George T. C., Kapsenberg M. L., van Ham S. M., Teunissen M. B., de Jong E. C.: Langerhans cells favor skin flora tolerance through limited presentation of bacterial antigens and induction of regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol.*: 133; 1240-9 (2013).
- 133. Veneri D.,** Ortolani R., Franchini M. Expression of CD27 and CD23 on peripheral blood B lymphocytes in humans of different ages. *Blood Transfus.*: 7; 29-34 (2009).

- 134. Verinaud L.,** de Souza Souto P. C., Brito V.N.: Thymic atrophy in infectious diseases. *Braz. J. Morphol. Sci.*: 21; 111-116 (2004).
- 135. Vernino L.,** McAnally L. M., Ramberg J., Lipsky P. E.: Generation of nondividing high rate Ig-secreting plasma cells in cultures of human B cells stimulated with anti-CD3-activated T cells. *J. Immunol.*: 148; 404 (1992).
- 136. Ward J. M.,** Erexson C. R., Faucette L. J., Foley J. F., Dijkstra C., Cattoretti G.: Immunohistochemical Markers for the Rodent Immune System. *Toxicologic Pathology*: 34; 616–630 (2006).
- 137. Woodland D. L.,** Kohlmeier J. K.: Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nature reviews*: 9; 153-161 (2009).
- 138. Woolf E.,** Grigorova I., Sagiv A., Grabovsky V., Feigelson S. W., Shulman Z. i wsp.: Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nature Immunol.*: 8; 1076–1085 (2007).
- 139. Xiao Y.,** Hendriks J., Langerak P., Jacobs H., Borst J.: CD27 Is Acquired by Primed B Cells at the Centroblast Stage and Promotes Germinal Center Formation *The Journal of Immunology*: 172; 7432-7441 (2004).
- 140. Yoshida T.,** Mei H., Dörner T., Hiepe F., Radbruch A., Fillatreau S., Hoyer B. F.: Memory B and memory plasma cells. *Immunological Reviews*: 237; 117–139 (2010).

9. TABELE WYNIKÓW

*** $p < 0,001$;

** $p < 0,01$;

* $p < 0,05$;

- * zakażenie pierwotne z wczesną izolacją materiału w stosunku do kontroli,

- * zakażenie pierwotne z wczesną izolacją materiału w stosunku do zakażenia pierwotnego z późną izolacją materiału,

- * zakażenie pierwotne z późną izolacją materiału w stosunku do kontroli,

- * zakażenie wtórne z wczesną izolacją materiału w stosunku do zakażenia pierwotnego z wczesną izolacją materiału,

- * zakażenie wtórne z wczesną izolacją materiału w stosunku do zakażenia pierwotnego z późną izolacją materiału,

- * zakażenie wtórne z wczesną izolacją materiału w stosunku do kontroli.

Tabela 3. Średnie arytmetyczne wartości liczby komórek (\pm SEM) w $10^6/1$ g tkanek podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a.

grupa doświadczalna	kontrola n=26	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=10	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z późną izolacją materiału n=7	wtórne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=18
liczba komórek w $10^6/1$ g węzła	341,5808 \pm 102,5644	1023,321 \pm 298,9874 ***	657,625 \pm 184,8925	981,4328 \pm 267,9678

Tabela 4. Średnie arytmetyczne wartości masy (w gramach \pm SEM) podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a.

grupa doświadczalna	kontrola n=26	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=10	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z późną izolacją materiału n=9	wtórne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=18
masa węzła	0,005243 \pm 0,002033	0,024629 \pm 0,002683 ***	0,0118 \pm 0,002122	0,017353 \pm 0,003627 *** **

Tabela 5. Średnie arytmetyczne (w procentach \pm SEM) odsetka subpopulacji komórkowych w zawieszynie podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w cytometrze przepływowym. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a.

białko powierzchniowe	kontrola n=3	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=4	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z późną izolacją materiału n=4	wtórne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=4
W3/13+	66,968 \pm 0,726	69,650 \pm 3,361	58,047 \pm 6,399	81,203 \pm 1,77 * **
W3/25+	56,858 \pm 3,327	42,972 \pm 1,108 ***	48,287 \pm 1,419	46,157 \pm 1,033
OX8+	26,959 \pm 2,875	32,290 \pm 1,039 *	19,293 \pm 0,801	37,337 \pm 1,709 * ***
B+	31,232 \pm 4,679	30,952 \pm 1,255	32,047 \pm 3,190	20,045 \pm 2,548 * *
OX12+	27,751 \pm 1,823	30,372 \pm 0,693	32,492 \pm 2,827	19,340 \pm 1,755 * **
OX33+	29,734 \pm 1,533	31,650 \pm 1,803	25,472 \pm 1,979	19,723 \pm 1,694 **
OX62+	24,340 \pm 5,560	16,448 \pm 5,278	14,53 \pm 2,872 *	16,602 \pm 1,095 *
ED1+	0,912 \pm 0,859	9,472 \pm 7,007 *	1,25 \pm 1,214	7,922 \pm 3,758 *
CD31+	51,029 \pm 17,337	64,15 \pm 14,79	40,982 \pm 4,719	52,078 \pm 8,165
OX7+	54,391 \pm 25,109	41,29 \pm 6,083	65,662 \pm 4,027	32,865 \pm 0,546 *
OX6+	24,889 \pm 5,095	30,694 \pm 1,621	34,92 \pm 1,647	17,612 \pm 1,404 * **
CD54+	30,422 \pm 4,824	52,1 \pm 5,112 **	26,025 \pm 3,230	32,35 \pm 2,506 *
W3 13+/OX6+	4,280 \pm 0,769	3,695 \pm 0,697	1,663 \pm 0,431	1,403 \pm 0,094 **

Tabela 5. c. d.

W3 25+/OX6+	4,057±0,836	2,352±0,498	4,067±0,737	1,24±0,154 ** *
OX8+/OX6+	3,559±0,494	2,546±0,434	1,350±0,453	2,418±0,303
CD4+/CD25+	3,175±0,108	2,786±0,225	1,612±0,108	3,142±0,441
CD19+/CD27+	3,050±0,316	3,672±0,270	4,482±0,866	12,544±2,833 * *
CD4+/CD45RC-	3,023±0,442	2,870±0,481	7,885±0,331 **	7,262±1,294 **
CD4+/ CD45RC-/CD62L-	5,683±0,455	4,386±0,605	7,045±0,126	11,160±2,717 *
CD4+/ CD45RC-/CD62L+	0,143±0,069	0,462±0,161	0,212±0,047	0,655±0,173
CD8+/CD45RC-	0,947±0,073	1,465±0,161	1,52±0,092	2,287±0,716 *
CD8+/ CD45RC-/CD62L-	2,117±0,136	2,247±0,810	4,275±0,412 *	2,635±0,291
CD8+/ CD45RC-/CD62L+	0,190±0,047	0,295±0,027	0,267±0,099	0,407±0,091

Tabela 6. Średnie arytmetyczne (w procentach \pm SEM) odsetka subpopulacji komórkowych w kolejnych strefach podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage. Analiza statystyczna wykonana metodą porównań wielokrotnych Tukey'a. 1 - strefa brzeżna, 2 - grudki chłonne, 3 - strefa przykorowa, 4 - strefa rdzenna

białko powierzchniowe	strefa węzła	kontrola n=4	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=4	pierwotne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z późną izolacją materiału n=3	wtórne zakażenie skóry <i>S. epidermidis</i> z wczesną izolacją materiału n=4
W3/13+	1	2,44 \pm 0,07	10,25 \pm 1,06 ***	3,10 \pm 0,03	10,36 \pm 1,15 ***
	2	2,02 \pm 0,30	10,05 \pm 0,64 *	6,88 \pm 0,34	12,35 \pm 2,83
	3	22,97 \pm 2,13	30,41 \pm 2,96 *	27,64 \pm 0,61	27,83 \pm 3,60
	4	4,51 \pm 1,05	19,12 \pm 0,80 ***	16,86 \pm 0,61	20,05 \pm 1,43
W3/25+	1	5,49 \pm 0,58	10,12 \pm 1,45 *	6,12 \pm 0,06	9,62 \pm 0,36
	2	5,50 \pm 0,99	14,37 \pm 0,65 ***	6,34 \pm 0,16	13,56 \pm 1,07 **
	3	19,86 \pm 1,27	36,82 \pm 0,75 ***	24,51 \pm 0,45	29,06 \pm 2,00 **
	4	6,67 \pm 0,73	22,46 \pm 1,24 ***	13,24 \pm 1,07	16,45 \pm 0,90 **
OX8+	1	1,45 \pm 0,33	4,87 \pm 0,84 **	5,10 \pm 0,71	2,92 \pm 0,45
	2	0,97 \pm 0,04	3,20 \pm 0,65	4,92 \pm 0,11	5,49 \pm 0,82
	3	18,96 \pm 1,36	31,52 \pm 1,19 ***	17,47 \pm 1,41	30,30 \pm 0,94 ***
	4	5,86 \pm 2,50	9,31 \pm 0,51 **	16,31 \pm 0,71	16,43 \pm 0,60 ***
B+	1	11,02 \pm 0,23	18,70 \pm 1,61 *	19,69 \pm 0,04	19,64 \pm 2,50
	2	20,60 \pm 2,14	28,10 \pm 1,00	25,01 \pm 0,37	31,16 \pm 2,68
	3	1,30 \pm 0,12	6,40 \pm 0,23 ***	6,61 \pm 0,62	5,47 \pm 0,27
	4	1,52 \pm 0,16	4,42 \pm 0,53	2,80 \pm 0,19	3,59 \pm 1,49
OX62+	1	5,27 \pm 0,23	5,65 \pm 1,25	0,81 \pm 0,10	2,75 \pm 0,31 *
	2	12,02 \pm 1,72	8,47 \pm 1,89	1,64 \pm 0,25	10,89 \pm 2,21 *
	3	3,09 \pm 0,29	10,92 \pm 0,58 ***	2,80 \pm 0,12	6,50 \pm 0,94 **
	4	5,29 \pm 0,54	7,10 \pm 0,20	3,08 \pm 0,72	3,61 \pm 0,41 ***

Tabela 6. c. d.

ED1+	1	1,66 ± 0,28	4,54 ± 0,74**	0,94 ± 0,10	2,45 ± 0,40*
	2	0,81 ± 0,11	6,42 ± 1,90*	0,59 ± 0,17	6,55 ± 2,10
	3	5,65 ± 0,25	12,37 ± 0,58*	4,70 ± 0,35	10,53 ± 2,61
	4	5,75 ± 0,77	15,51 ± 2,35*	10,73 ± 0,90	16,83 ± 311
CD31+	1	16,00 ± 1,96	10,86 ± 0,81**	8,90 ± 0,27	3,87 ± 0,27**
	2	3,47 ± 0,17	21,15 ± 0,68***	6,68 ± 0,32	13,15 ± 0,41*** ***
	3	10,94 ± 1,57	10,73 ± 0,87	5,10 ± 0,10	3,66 ± 0,90*
	4	11,97 ± 1,89	11,12 ± 0,69	9,59 ± 0,24	16,58 ± 1,53*
OX7+	1	3,02 ± 0,04	12,37 ± 1,51***	8,83 ± 0,33	9,47 ± 0,15
	2	1,60 ± 0,51	7,93 ± 0,80*	6,22 ± 0,29	8,20 ± 2,18
	3	10,11 ± 3,00	23,99 ± 0,99***	9,00 ± 0,48	13,11 ± 0,89**
	4	8,64 ± 0,73	17,26 ± 0,73***	15,52 ± 0,69	11,78 ± 0,80** *
HiS48+	1	0,00 ± 0,00	3,22 ± 0,73***	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,16**
	2	0,65 ± 0,07	5,15 ± 0,54*	0,31 ± 0,03	5,86 ± 2,25
	3	1,42 ± 0,10	8,29 ± 0,59***	2,90 ± 0,19	8,13 ± 1,61*
	4	1,47 ± 0,12	7,60 ± 0,85*	2,05 ± 0,50	10,4 ± 3,50
OX6+	1	10,47 ± 0,93	29,01 ± 1,75***	24,68 ± 0,82	24,64 ± 1,02
	2	14,99 ± 1,75	33,07 ± 2,47**	24,87 ± 1,73	31,82 ± 5,00
	3	14,78 ± 1,31	24,15 ± 0,43***	18,28 ± 0,67	25,90 ± 1,57**
	4	9,74 ± 0,41	24,68 ± 0,82***	17,57 ± 0,44	27,80 ± 0,67
CD54+	1	6,71 ± 1,56	13,07 ± 0,51*	13,56 ± 0,66	20,27 ± 1,50*** ***
	2	2,91 ± 0,58	19,33 ± 1,25***	22,01 ± 0,16	30,42 ± 1,17***
	3	13,57 ± 0,25	21,30 ± 0,74***	18,48 ± 0,54	19,59 ± 0,73 ***
	4	6,70 ± 0,42	15,44 ± 2,33**	16,73 ± 0,06	19,04 ± 0,56

SPIS TABEL

Tabela 1. Przeciwciała zastosowane do znakowania immunocytochemicznego i immunohistochemicznego.....53

Tabela 2. Subpopulacje komórkowe wyrażające badane białka powierzchniowe u szczura.....54

Tabela 3. Średnie arytmetyczne wartości liczby komórek (\pm SEM) w $10^6/1$ g tkanek podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach.....124

Tabela 4. Średnie arytmetyczne wartości masy (w gramach \pm SEM) podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach.....124

Tabela 5. Średnie arytmetyczne (w procentach \pm SEM) odsetka subpopulacji komórkowych w zawieszynie podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w cytometrze przepływowym.....125

Tabela 6. Średnie arytmetyczne (w procentach \pm SEM) odsetka subpopulacji komórkowych w kolejnych strefach podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....127

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat węzła chłonnego szczura.....	16
Rycina 2. Schemat przedstawiający drogi przenikania różnego typu antygenów do drenującego węzła chłonnego.....	19
Rycina 3. Schemat przedstawiający zaburzenie odpływu chłonnego w kończynie dolnej z postępującym gromadzeniem się penetrujących skórę mikroorganizmów.....	41
Rycina 4. Zdjęcie limfoscyntygraficzne kończyn dolnych chorych z obrzękiem limfatycznym kończyny lewej	42
Rycina 5. Histologiczny obraz fragmentu zwłókniałego węzła chłonnego chorego z kończyną dolną objętą obrzękiem limfatycznym i chronicznym zapaleniem skóry.....	42
Rycina 6. Fragment pachwinowego węzła chłonnego chorego z kończyną dolną objętą obrzękiem chłonnym w stadium III.....	43
Rycina 7. Udział i topografia szczepów bakteryjnych normalnie zasiedlających skórę stopy i podudzia kończyny dolnej człowieka.....	44
Rycina 8. Liczba komórek (w $10^6/g$) w podkolanowych węzłach chłonnych.....	57
Rycina 9. Masa (w g) podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach.....	58
Rycina 10. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w cytometrze przepływowym.....	59
Rycina 11. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w cytometrze przepływowym.....	59
Rycina 12. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w cytometrze przepływowym.....	60

Rycina 13. Zmiany ilościowe poszczególnych subpopulacji komórkowych w podkolanowych węzłach chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w cytometrze przepływowym.....	60
Rycina 14. Strefy funkcjonalne podkolanowego węzła chłonnego szczura.....	64
Rycina 15. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w poszczególnych strefach węzłów chłonnych określone przy użyciu programu Microimage.....	65
Rycina 16. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie brzeżnej podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....	66
Rycina 17. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie brzeżnej podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....	66
Rycina 18. Komórki obecne w świetle naczynia limfatycznego doprowadzającego do podkolanowego węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry <i>S. epidermidis</i> w grupie z wczesną izolacją materiału.....	67
Rycina 19. Komórki strefy brzeżnej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry <i>S. epidermidis</i> w grupie z wczesną izolacją materiału wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku OX62 (komórki dendrytyczne).....	67
Rycina 20. Podkolanowy węzeł chłonny (z widoczną strefą brzeżną) szczura po pierwotnym zakażeniu skóry <i>S. epidermidis</i> w grupie z wczesną izolacją materiału wybarwiony immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku W3/25 (limfocyty T pomocnicze, makrofagi).....	70
Rycina 21. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą brzeżną) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku OX62 (komórki dendrytyczne).....	70
Rycina 22. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą brzeżną) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku ED1 (makrofagi, granulocyty).....	71
Rycina 23. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą brzeżną) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku HiS48 (granulocyty).....	71

Rycina 24. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w grudkach chłonnych podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....	72
Rycina 25. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w grudkach chłonnych podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....	72
Rycina 26. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną grudką) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku OX6 (antygeny klasy II).....	75
Rycina 27. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną grudką) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku W3/25 (limfocyty T pomocnicze, makrofagi).....	75
Rycina 28. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie przykorowej podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....	76
Rycina 29. Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie przykorowej podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....	76
Rycina 30. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą przykorową) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku W3/13 (limfocyty T, granulocyty, monocyty).....	79
Rycina 31. Podkolanowe węzły chłonne (z widoczną strefą przykorową) szczura wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku OX8 (limfocyty T cytotoksyczne).....	79
Rycina 32. Strefa przykorowa podkolanowych węzłów chłonnych szczura wybarwiona immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku OX6 (antygeny klasy II).....	80
Rycina 33. Strefa przykorowa podkolanowych węzłów chłonnych szczura wybarwiona immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku OX62 (komórki dendrytyczne).....	80

- Rycina 34.** Komórki strefy przykorowej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX7** (komórki szpikowe, tymocyty).....81
- Rycina 35.** Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie rdzennej podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....81
- Rycina 36.** Zmiany ilościowe subpopulacji komórkowych w strefie rdzennej podkolanowych węzłów chłonnych szczurów w badanych grupach, ocenione w programie Microimage.....82
- Rycina 37.** Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **W3/25** (limfocyty T pomocnicze, makrofagi).....84
- Rycina 38.** Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX62** (komórki dendrytyczne).....84
- Rycina 39.** Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **ED1** (makrofagi, granulocyty).....85
- Rycina 40.** Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX7** (komórki szpikowe, tymocyty).....85
- Rycina 41.** Komórki strefy rdzennej węzła chłonnego szczura po pierwotnym zakażeniu skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału, wybarwione immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko białku **OX6** (antygeny klasy II).....85