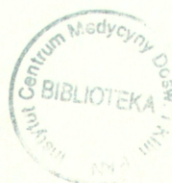


INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ZAKŁAD CHIRURGII TRANSPLANTACYJNEJ

Michał Maksymowicz

**UPOŚLEDZENIE MIGRACJI LIMFOCYTÓW POD WPŁYWEM
CYKLOSPORYNY A**

Praca doktorska



25 192 (dublet)
H3075

Promotor

Prof. dr hab. med. Waldemar Olszewski

Warszawa 1998

Miastu Lwów

i Lwowiakom

w przeszłości, teraźniejszości i przyszłości



Serdecznie dziękuję

Panu Profesorowi dr hab. med. Waldemarowi L. Olszewskiemu
za opiekę naukową, wnikliwą dyskusję wyników i cenne sugestie w czasie
przygotowania pracy.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Chirurgii Transplantacyjnej
dziękuję za okazaną pomoc i koleżeńską atmosferę podczas wykonywanych
doświadczeń.

Michał Maksymowicz

SPIS SKRÓTÓW

| | |
|------------|--|
| APC - | Antigen presenting cell - komórki prezentujące antygen |
| AUG - | Szczur szczepu August |
| CD - | Cluster of differentiation antigens - grupa antygenów związanych z różnicowaniem/dojrzwaniem komórki |
| CTL - | Cytotoxic T lymphocyte - cytotoksyczny limfocyt T |
| CsA - | Cyklosporyna A |
| CsA-TDL | Limfocyty przewodu piersiowego pobrane od szczura który otrzymywał CsA |
| DFCS - | Deactivated fetal calf serum - dezaktywowana płodowa surowica cielęca |
| FITC - | Izotiocyanian fluoresceiny |
| IL | Interleukina |
| LFA - | Antygeny czynnościowe leukocytów |
| MHC - | Major histocompatibility complex - główny kompleks zgodności tkankowej |
| M-TDL - | TDL inkubowane z mytomycyną |
| NaCl-TDL - | Limfocyty przewodu piersiowego pobrane od szczura który otrzymywał 0.9% NaCl |
| NFAT - | Nuclear factor of activated T cells - czynnik jądrowy aktywowanych komórek T |
| PBS - | Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej |
| RT1 - | Główny kompleks zgodności tkankowej szczura |
| SA-TDL - | TDL inkubowane z zaydkiem sodu |
| TDL - | Thoracic duct lymphocytes - limfocyty przewodu piersiowego |
| WAG - | Wsobny szczur szczepu Wistar |

SPIS TREŚCI

| | strona |
|---|--------|
| 1. Wstęp..... | 1 |
| 1.1. Założenia i cel pracy..... | 1 |
| 1.2. Przegląd piśmiennictwa..... | 5 |
| - Migracja limfocytów..... | 5 |
| - Mechanizm działania cyklosporyny..... | 7 |
| 2. Materiał i metody..... | 11 |
| 2.1. Schemat doświadczeń i podział na grupy..... | 11 |
| 2.2. Zwierzęta doświadczalne..... | 15 |
| 2.3. Model migracji limfocytów in vivo do przeszczepu i tkanek biorcy..... | 15 |
| 2.4. Stosowane metody..... | 16 |
| 2.4.1. Dożylne podawanie cyklosporyny..... | 16 |
| 2.4.2. Heterotopowy przeszczep serca..... | 16 |
| 2.4.3. Heterotopowy przeszczep skóry..... | 16 |
| 2.4.4. Kaniulacja przewodu piersiowego chłonnego..... | 16 |
| 2.4.5. Kaniulacja żyły udowej..... | 17 |
| 2.4.6. Dożylne podawanie znakowanych ^{51}Cr limfocytów..... | 17 |
| 2.4.7. Izolacja komórek..... | 17 |
| 2.4.8. Znakowanie limfocytów z przewodu piersiowego izotopem ^{51}Cr | 19 |
| 2.4.9. Ocena rozmieszczenia przeszczepionych dożylnie znakowanych izotopem ^{51}Cr limfocytów..... | 19 |
| 2.4.10. Inkubacja limfocytów z mitomycyną..... | 19 |
| 2.4.11. Inkubacja limfocytów z azydkiem sodu..... | 20 |
| 2.4.12. Znakowanie komórek przeciwciałami monoklonalnymi dla oceny ekspresji | |

| | |
|--|----|
| antygenów powierzchniowych..... | 20 |
| 2.4.13. Cytometria przepływowa..... | 21 |
| 2.4.14. Test migracji in vitro jednojądrzastych komórek krwi obwodowej..... | 21 |
| 2.4.15. Test migracji in vitro jednojądrzastych komórek z węzłów krezkowych chłonnych, śledziony i szpiku kostnego..... | 21 |
| 2.4.16. Oznaczanie poziomu cyklosporyny we krwi..... | 22 |
| 2.4.17. Metody statystyczne..... | 22 |
| 3. Wyniki..... | 23 |
| 3.1. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca..... | 23 |
| 3.2. Dystrybucja CsA TDL u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca..... | 24 |
| 3.3. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry..... | 26 |
| 3.4. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry..... | 28 |
| 3.5. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy po sham-operation..... | 29 |
| 3.6. Migracja in vitro limfocytów pochodzących z krwi obwodowej, węzłów chłonnych, śledziony i szpiku kostnego szczurów..... | 32 |
| 3.7. Fenotyp i ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni limfocytów..... | 32 |
| 3.8. Dystrybucja limfocytów chłonki przewodu piersiowego poddanych działaniu mitomycyny w ustroju biorcy allogenicznego przeszczepu serca... | 33 |
| 3.9. Dystrybucja limfocytów chłonki przewodu piersiowego poddanych działaniu azydku sodu w ustroju biorcy allogenicznego przeszczepu serca... | 34 |
| 4. Dyskusja..... | 36 |
| 5. Wnioski..... | 46 |

| | | |
|----|--------------------|----|
| 6. | Streszczenie..... | 47 |
| 7. | Piśmiennictwo..... | 53 |
| 8. | Tabele..... | 62 |
| 9. | Rysunki..... | 72 |

1. WSTĘP

1.1. Założenia i cel pracy

Zagadnienie migracji komórek odpornościowych w ustroju jest w dalszym ciągu niedoceniane z punktu widzenia praktyki leczniczej. Komórki te wędrując i przekazując informację od miejsca wniknięcia obcego antygeny do narządów limfatycznych, a następnie z powrotem do miejsca gdzie znajduje się obcy antygen, aby go eliminować, upodobniają układ odpornościowy do układu nerwowego, jego aferentnych i eferentnych dróg przewodzenia bodźców. Wytwarzane cytokiny stanowią odpowiedniki neuroprzekazników. Układowi odpornościowemu nadano nawet ostatnio nazwę “szóstego zmysłu”. Migracja komórek odpornościowych to nie tylko ich przybycie do miejsca zapalenia lub alloprzeszczepu, to także umiejscowienie ich w stosunku do innych komórek odpornościowych np. w węzle chłonny (kooperacja komórkowa), także zatrzymywanie się w odpowiednim środowisku dla uzyskania informacji i “edukacji” (grasica), to również droga i tempo przenoszenia obcego antygeny do narządów limfatycznych. Wydaje się więc, iż farmakologiczna kontrola migracji komórek odpornościowych może służyć regulacji kinetyki procesów zapalnych, celowemu skierowaniu komórek np. do tkanki nowotworowej, ograniczaniu tego ruchu do alloprzeszczepów, itp. Uzasadnienie do takiego myślenia dają obserwacje zmian migracji i dystrybucji limfocytów pod wpływem sterydów i katecholamin we wstrząsie, zmian dobowej dystrybucji limfocytów zależnie od rytmu hormonalnego, czy też gromadzenie się limfocytów w miejscach rozwoju zapalenia w zależności od sygnałów cytokinowych.

Proces migracji limfocytów odgrywa podstawową rolę w odrzucaniu alloprzeszczepu.

Alloprzeszczep narządowy (serca, nerek, wątroby) ulega zniszczeniu przez komórki odpornościowe biorcy, głównie przez naciekające limfocyty, a w dalszych etapach przez

makrofagi, granulocyty, tuczne i komórki plazmatyczne. Aczkolwiek proces rozpoznawania alloantygenów na powierzchni komórek śródbłonkowych przeszczepu jest natychmiastowy, zarówno przez receptorowy układ MHC przepływających monocytów i limfocytów, oraz wpływające z przeszczepu do śledziony i węzłów chłonnych biorcy komórki pasażerowe, to wytworzenie się u biorcy dawco-specyficznego cytotoksycznego klonu trwa kilka dni. Pobudzenie i proliferacja populacji limfocytów skierowanych przeciw alloantygenom ma miejsce w narządach limfatycznych takich jak śledziona i węzły chłonne. Tam następuje proces bezpośredniej, a głównie pośredniej prezentacji antygenów przez komórki biorcy i dawcy (APC) limfocytom biorcy. Z tych narządów dawco-specyficzne limfocyty biorcy muszą przedostać się do krążenia, rozpoznać alloantygeny przeszczepu, ulec przyleganiu do powierzchni śródbłonka przeszczepu, a następnie przejść do przestrzeni pozanaczyniowej (proces wynaczyniania). Komórki efektorowe zasiedlające alloprzeszczep dokonują lizy komórek alloprzeszczepu, zarówno w kontakcie bezpośrednim jak i poprzez mediatory chemiczne (np. perforyna). W przebiegu odpowiedzi na alloprzeszczep proliferacja i różnicowanie limfocytów odbywają się głównie pod wpływem IL2. W procesie odpowiedzi gospodarza na alloprzeszczep mamy więc do czynienia z wewnątrzkomórkowymi procesami pobudzenia i przygotowania do fazy efektorowej, jak również z przenoszeniem się limfocytów z miejsca rozpoznania alloantygenów do narządów limfatycznych oraz z tych narządów do alloprzeszczepu (migracja limfocytów). Aktywowane limfocyty wykazują większą ruchliwość *in vitro* (motility). Wiadomo, iż farmakologiczne środki immunosupresyjne jak Cyklosporyna A (CsA), Takrolimus (FK506), Rapamycyna, Deoksypregualina wpływają na wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnału i w efekcie hamują syntezę niektórych interleukin, np. IL2, niezbędnej dla pobudzenia limfocytów (1, 2, 3, 4). Być może leki te mają także ograniczony wpływ na metabolizm limfocytów (5, 6, 7, 8, 9, 10).

Powstaje pytanie, czy wymienione środki immunosupresyjne wpływają na ruchliwość i migrację limfocytów. Wskazywać na to mogą mniejsze nacieki komórkowe w alloprzeszczepach u biorców w czasie stosowania środków immunosupresyjnych. Ograniczenie migracji dotyczy zarówno limfocytów znajdujących się w narządach limfatycznych (zahamowanie mobilizacji z węzłów i śledziony) jak i w przeszczepie (przyleganie i wynaczynianie). Własne badania pilotowe wskazują, iż limfocyty biorcy alloprzeszczepu serca poddane działaniu CsA wykazują ograniczoną tendencję do gromadzenia się w przeszczepie w porównaniu z limfocytami nie traktowanymi CsA. Co więcej limfocyty poddane działaniu CsA, podlegają innej ogólnoustrojowej dystrybucji niż limfocyty nie traktowane (11).

Poznanie mechanizmu ograniczonej migracji limfocytów pod wpływem środków immunosupresyjnych pozwoliłoby, poza wyjaśnieniem istoty tego procesu, na poszukiwanie leków, które w wybiórczy sposób hamowałyby migrację, a nie wpływały na ograniczenie syntezy cytokin i metabolizm komórki. Stosowanie takich leków synergicznych z istniejącymi środkami immunosupresyjnymi pozwoliłoby zmniejszyć dawki a razem z tym efekty uboczne i powikłania obecnie stosowanej immunosupresji.

Celem mojej pracy doktorskiej było uzyskanie odpowiedzi na pytania:

- 1) czy CsA ma bezpośredni wpływ na limfocyty ograniczając ich gromadzenie w alloprzeszczepie;
- 2) czy CsA ma wpływ na ogólnoustrojową recyrkulację i dystrybucję krążących limfocytów, a jeśli tak to czy jest to wynikiem
 - a) zmniejszonej mobilizacji z narządów limfatycznych,
 - b) zmniejszonej spontanicznej ruchliwości,

c) obniżeniem ekspresji powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych na limfocytach, stąd możliwości ograniczonego przylegania do śródbłonka i wynaczyniania?

3) Czy zahamowanie procesów metabolicznych i mitozy, na które ma wpływ CsA, mogą ograniczać gromadzenie się limfocytów w alloprzeszczepie?

1.2. Przegląd piśmiennictwa.

Migracja limfocytów

Migracja limfocytów umożliwia rozpoznawanie obcych antygenów i szybkie na nie reagowanie. Krążenie limfocytów we krwi i ich przechodzenie przez tkanki chłonne i pozachłonne jest niezwykle istotne ponieważ klon limfocytów zdolnych do odpowiedzi na dany antygen jest ilościowo bardzo ograniczony i stąd małe szanse statystyczne na jego kontakt z antygenem. Brak lub ograniczenie zdolności limfocytów do migracji pozwoliło by na wniknięcie i namnożenie się mikroorganizmów w ustroju. Większość limfocytów przepływających przez przewód piersiowy do krwi pochodzi z jelit i krezkowych węzłów chłonnych. Z krwią limfocyty przechodzą do narządów i tkanek chłonnych i pozachłonnych i następnie przechodzą do chłonki. Przez śledzionę przechodzi 10 krotnie więcej limfocytów niż przez wszystkie węzły chłonne (12, 13).

Limfocyty powstają w grudkach limfatycznych ośrodków rozmnażania węzłów chłonnych, przechodzą na obwód grudek, a następnie do zatok promienistych i do rdzenia. Do węzła chłonnego limfocyty napływają głównie drogą krwionośną i w odcinkach żyłek pozawłosowatych (HEV) przechodzą między komórkami śródbłonka do mięszu węzła, głównie w strefie przykorowej. Niewielka liczba limfocytów napływa do węzłów poprzez naczynia chłonne doprowadzające. Pochodzą one z innych obwodowych węzłów chłonnych albo z przestrzeni międzykomórkowej tkanki łącznej. Limfocyty T wędrują następnie przez strefę przykorową, a B-limfocyty przez korę zewnętrzną poprzez zatoki węzła do naczyń odprowadzających.

W śledzionie limfocyty opuszczają naczynia w strefie brzeżnej. T-limfocyty wędrują następnie poprzez pochewki limfatyczne, a B-limfocyty przez grudki limfatyczne do miążgi

czerwonej, a następnie do naczyń żylnych. Niewielka ilość opuszcza śledzionę poprzez naczynia chłonne (14, 15, 16).

Przechodzenie limfocytów przez ścianę naczyń odbywa się przy obecności cząsteczek adhezyjnych, obecnych na powierzchni limfocytów i odpowiednich ligandów na powierzchni komórek śródbłonka naczyń - t.zw. adresyn. Cząsteczki adhezyjne dzielą się na nadrodzinę cząsteczek immunoglobulinowych, integryny i selektyny (17, 18, 19, 20).

Nadrodzina cząsteczek immunoglobulinowych. Funkcjonalnie te cząsteczki są przeznaczone dla rozpoznawania antygenów. Cechą charakterystyczną związków wchodzących w skład rodziny jest wspólny element budowy, zwany immunoglobulinową jednostką. Zawiera ona około 70-110 aminokwasów i posiada centralnie położony mostek dwusiarczkowy. Mostek ten stabilizuje kilka przeciwbieżnie ułożonych pasem β tworząc charakterystyczny fałd immunoglobulinowy.

Integryny, są cząsteczkami odpowiedzialnymi zarówno za wzajemną adhezję komórek, jak i adhezję komórek do białek macierzy międzykomórkowej. Biorą one udział w regulacji zarówno przylegania, jak i przechodzenia leukocytów przez ścianę naczyń. Integryny składają się z dwóch łańcuchów α i β połączonych niekowalentnie. Integryny, które mają różne łańcuchy α i jednakowe β tworzą podrodzaj. Integryny podrodziny $\beta 2$ odpowiadają głównie za łączenia międzykomórkowe, a $\beta 1$ - wiążą głównie białka ECM.

Selektyny, tworzą grupę cząsteczek adhezyjnych biorących udział w interakcji leukocytów z płytkami i śródbłonkiem naczyń. Wiążą one oligosacharydy obecne w glikoproteidach i w glikolipidach. Mają podobną budowę i zawierają: - N-końcową domene, podobną do lektyny, zależnej od wapnia; - domene podobną do EGF; - kilka domen podobnych do dopełniacza; - odcinek śródbłonowy i krótki odcinek cytoplazmatyczny. Receptory selektyn rozpoznają węglowodorany kontrareceptorów (glikoproteiny, glikolipidy). E-selektyny (CD62E, ELAM-1) i P-selektyny (CD62P, GMP-140, PADGEM) rozpoznają sialylowane, fukusylowane struktury. E-

selektyny łączą się z CLA (skórny antygen limfocytarny) wyrażony na T-komórkach pamięci (21, 22, 23, 24).

Adherencja leukocytów do śródbłonka wyznacza się jakościowymi i ilościowymi zmianami molekuł adhezyjnych wśród których najistotniejszymi są integryny. Komórki śródbłonka regulują adherencję poprzez ekspresję powierzchniowych molekuł adhezyjnych - adresyn. Selektynowa rekrutacja krążących limfocytów do ognisk zapalnych i odpowiedzi immunologicznej jest kombinacją interakcji niepobudzonych i pobudzonych receptorów adhezyjnych z czynnikami aktywującymi (25, 26, 27).

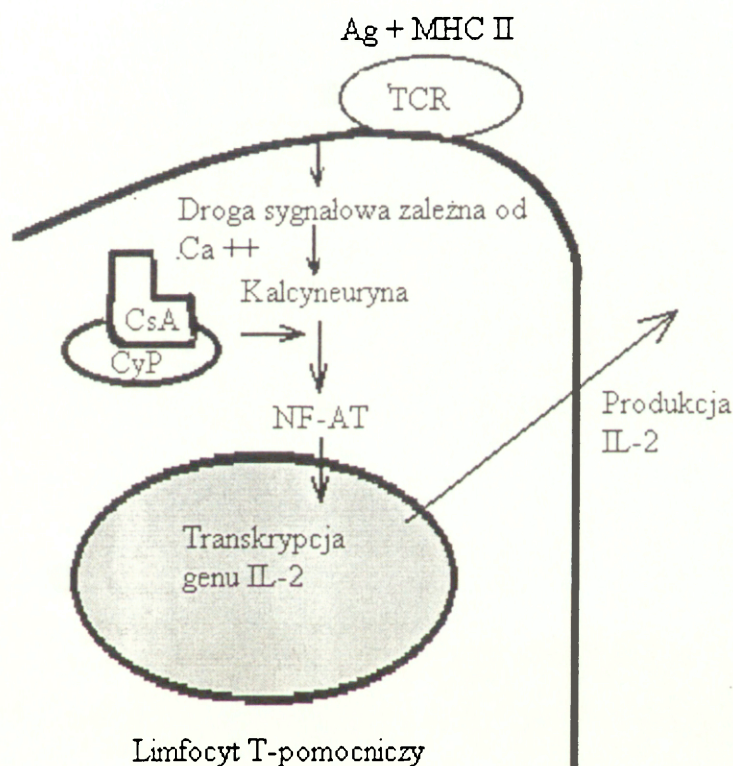
Przyżyciowa mikroskopia pokazała, że leukocyty najpierw toczą się po śródbłonku do miejsca pozanaczyniowego ogniska zapalnego. Niektóre z leukocytów przyklejają się do śródbłonka, przenikają pomiędzy komórkami śródbłonka, a później migrują w macierzy pozakomórkowej. Toczenie się wywołane jest interakcją pomiędzy selektynami i kontrstrukturami węglowodorowymi. Natomiast trwałą adhezję i diapedezę zabezpieczają integryny i Ig-podobne cząsteczki adhezyjne. W procesie tym uczestniczą leukocyty, śródbłonek i tkanka macierzysta (28).

Mechanizm działania cyklosporyny.

Immunosupresyjne właściwości cyklosporyny zostały opisane w 1972 r. przez Borel JF (29). Cyklosporynę wyizolowano z grzyba *Tolypocladium inflatum Gams*, rosnącego w okolicach jeziora Hardangervidda na południu Norwegii (30). Jest to cykliczny peptyd składający się z 11 aminokwasów (31).

Mechanizm działania cyklosporyny polega na modyfikacji ekspresji genów. Wewnątrz komórki CsA wiąże się z cyklofiliną, tworząc aktywny kompleks CsA-cyklofilina. Ten kompleks hamuje aktywność kalcyneuryny (fosfatazy serinowo treoninowej), koniecznej do aktywacji czynników transkrypcji np. jądrowego czynnika aktywowanych T komórek

(NFAT), co, z kolei, hamuje ekspresję IL-2 pobudzonych T limfocytów. *In vivo* CsA w stężeniu 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ we krwi hamuje kalcyneurynę, co uniemożliwia kopiowanie genów takich cytokin jak IL-2, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-4. Funkcjonalnie blokowanie kalcyneuryny prowadzi do ograniczenia produkcji cytokin i hamowania proliferacji limfocytów (Rys. 1) (32).



Rys. 1. Schemat mechanizmu działania cyklosporyny. Obcy antygen (Ag) jest prezentowany poprzez receptor TCR na limfocycie T w kontekście MHC klasy II na powierzchni komórki prezentującej. W wewnątrzkomórkowej drodze sygnałowej zależnej od Ca^{++} skierowanej na produkcję IL-2 pośredniczy kalcyneuryna, która jest blokowana aytworzonym kompleksem cyklosporyna-cyklofilina. (32).

W badaniach doświadczalnych i klinicznych zauważono że CsA powoduje zmniejszenie ilości komórek naciekających (33), zmienia fenotyp naciekających komórek (mniej T-pomocniczych limfocytów i monocyt/makrofagów (34)). Zmiany te zależą od dawki

CsA (ponad 20 mg/kg) (35). W badaniach *in vitro* stwierdzono, że ludzkie leukocyty inkubowane z CsA w większym stopniu wyrażają ekspresję cząsteczek adhezyjnych i więcej ich przykleja się do nabłonka ludzkiej żyły pępowinowej w porównaniu z nieinkubowanymi leukocytami. Inkubacja komórek nabłonka z CsA nie zmienia ekspresji cząsteczek adhezyjnych i nie wpływa na przyklejanie się leukocytów (36). U owcy CsA powoduje mniejszą migrację limfocytów do alloprzeszczepu nerwu (37). Dożylne podanie sefadeksu powoduje zwiększenie ilości leukocytów w oskrzelowo-pęcherzykowym płynie. Podanie CsA powodowało zmniejszenie ilości leukocytów, czyli mniejszą ich migrację do nabłonka oskrzelowego (38, 39). Podczas stosowania CsA dla zapobiegania odrzucania ortotopowego przeszczepu wątroby u szczura stwierdzono mniejszą rekrutację leukocytów dawcy w narządów biorcy w porównaniu z grupą gdzie CsA nie stosowano (40). Wbrew oczekiwaniom mikroskopia przyżyciowa naczyń sieci szczura wykazała, że CsA zmniejsza spowodowaną PAF (platelet activating factor) adhezję i emigrację leukocytów (41).

Przyczyną zmienionej migracji komórek pod wpływem CsA mogą być zmiany ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Badania wpływu CsA na ekspresję cząsteczek adhezyjnych nie są jednoznaczne z powodu stosowania różnych modeli doświadczalnych i protokołów podawania CsA. Według Molossi S (42) podawanie CsA królikom powoduje obniżenie ekspresji ICAM-1 i VCAM-1 na komórkach mięśniowych przeszczepionego serca. Natomiast Cockerill GW (43) stwierdza, że CsA nie zmienia ekspresji VCAM-1 na komórkach śródbłonka. Frishberg Y (44) uważa, że w badaniach *in vitro* małe dawki CsA (0.1 µg/mL) zwiększają ekspresję ICAM-1 i LFA-1 na nabłonku kanalików nerek, natomiast większe dawki (1-5 µg/mL) zmniejszają ekspresję tych cząsteczek adhezyjnych. W dawkach 5 mg/kg CsA nie wpływa na ekspresję, a dawka 20 mg/kg zmniejsza ekspresję VCAM-1 śródbłonka tętniczek alloprzeszczepu u szczura (35). Podawanie CsA zmniejszało ekspresję VCAM-1 nie tylko w przeszczepionym sercu, ale i we własnym. Podobny wpływ ma również

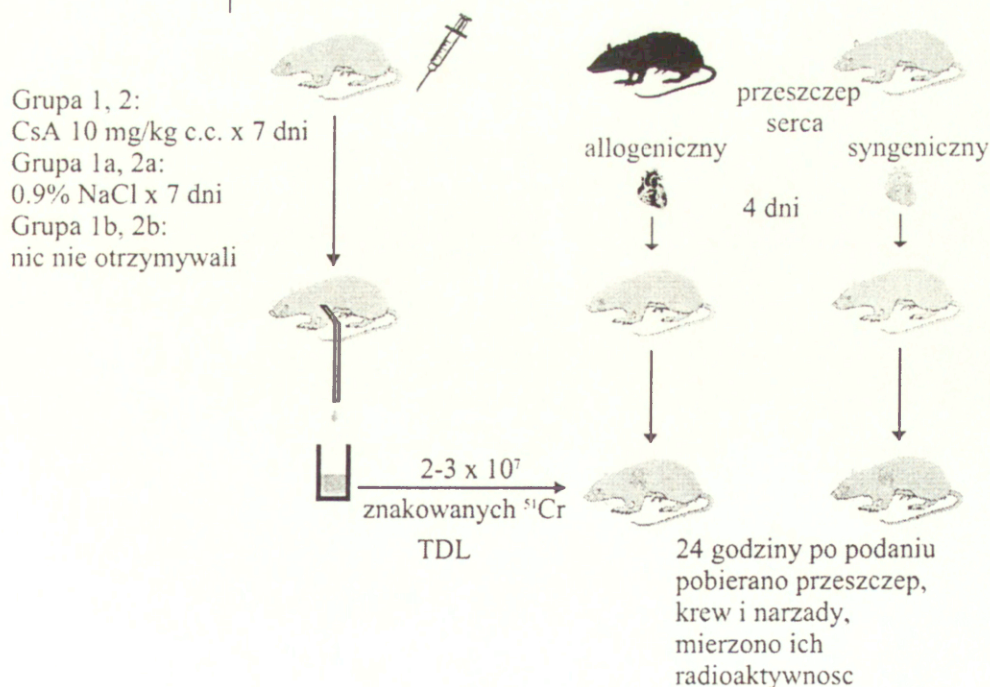
rozpuszczalnik CsA – kremofor, co wysunęło przypuszczenie, że nienasycone kwasy tłuszczowe zawarte w rozpuszczalniku mogą powodować zmiany w ekspresji cząsteczek adhezyjnych (45). Stwierdzono również że CsA zmniejsza poziom m-RNA dla L-selektyny i ekspresję L-selektyny na powierzchni hodowanych komórek Jurkat (46).

Przyczyną podejrzewanej zmienionej pod wpływem CsA migracji komórek mogą być również zmiany metabolizmu i elektrolitowej równowagi komórki, co może wywołać funkcjonalne zmiany. Wykorzystując barwniki kationowe w cytometrii przepływowej stwierdzono że CsA powoduje hiperpolaryzację błony monocytów i limfocytów ludzkiej krwi (47). Badania mikrokalorymetryczne wykazały , że CsA obniża ciepłotwórczość niepobudzonych i pobudzonych ludzkich limfocytów, hamuje syntezę DNA, obniża poziom mleczanów i ATP, wchłanianie Rhodaminy 123 w odpowiedzi na stymulację mitogenem (48). Z innych badań wynika że CsA powoduje nadwyżkę Ca^{2+} w cytozolu i mitochondriach co prowadzi do wystąpienia morfologicznych zmian w mitochondriach (łącznie z utratą grzebieni i obrzękiem) i obniżeniem syntezy ATP (49, 50). CsA wiążąc się z cyklofiliną blokuje przepustowe pory mitochondriów (51), co, z kolei, zmienia mechanizm uwalniania Ca^{2+} (52). Efekt blokowania przepustowych por przez CsA tłumaczy jej ochronne działanie na śródbłonek przy stresie oksydacyjnym w fazie reperfuzji przeszczepianych narządów (51, 53).

1. MATERIAŁ I METODY

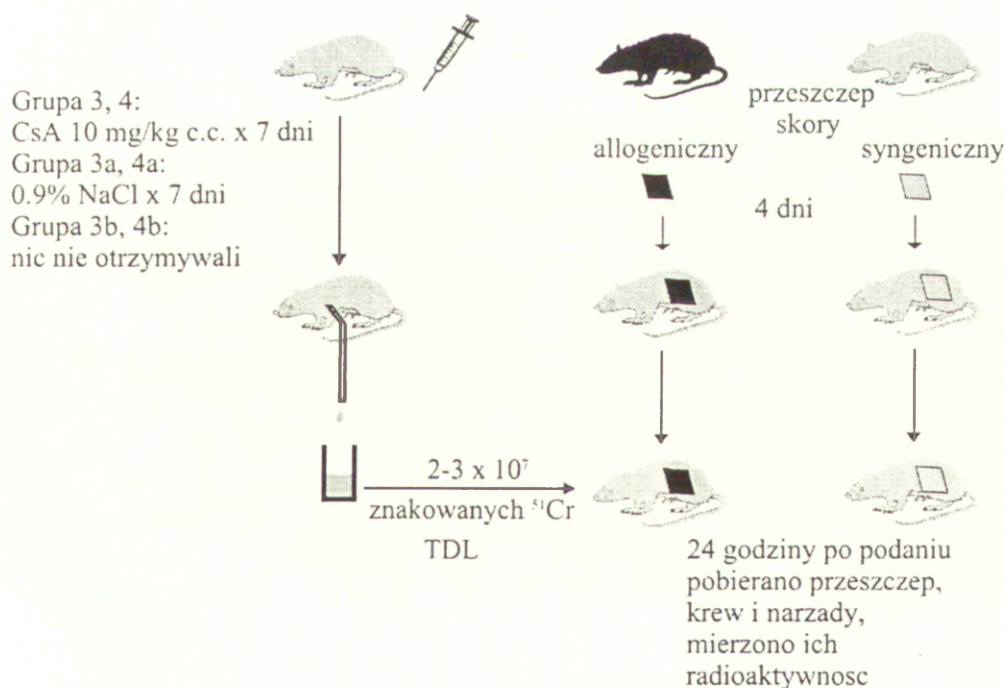
2.1. Schemat doświadczeń i podział na grupy

1. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (Rys. 2).
- 1a (kontrola). Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (Rys. 2).
- 1b (kontrola). Dystrybucja normalnych TDL u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (Rys. 2).
2. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (Rys. 2).
- 2a (kontrola). Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (Rys. 2).
- 2b (kontrola). Dystrybucja normalnych TDL u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (Rys. 2).



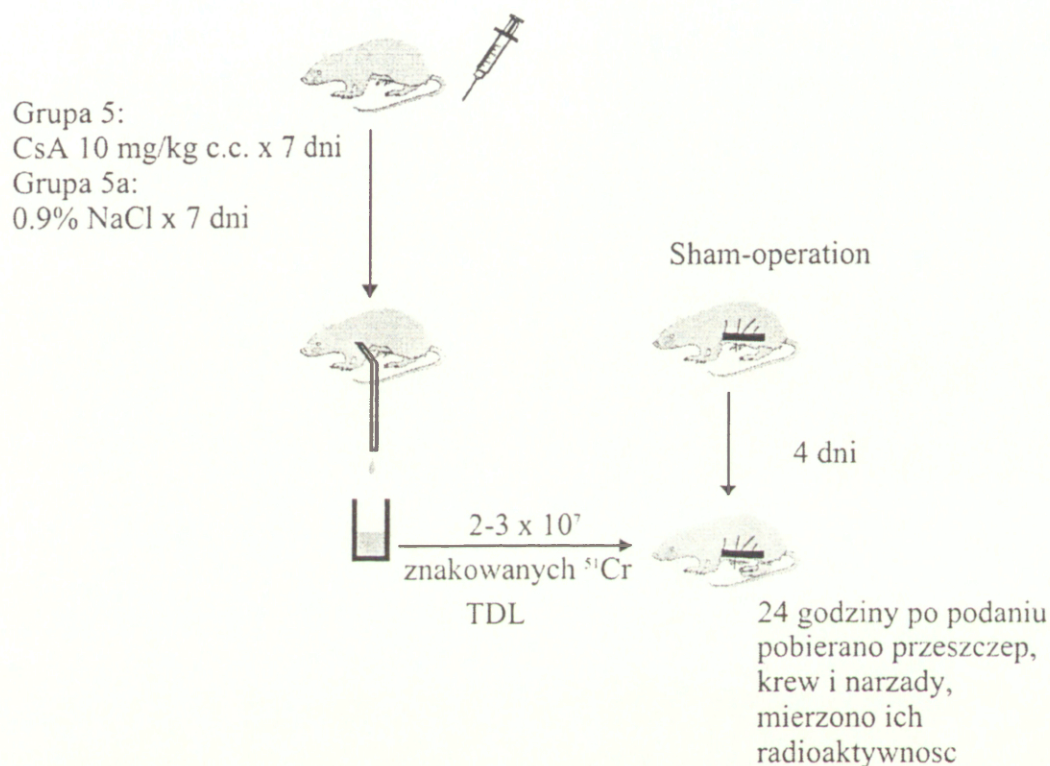
Rys. 2. Schemat doświadczeń w grupach 1, 1a, 1b, 2, 2a, 2b.

3. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry (Rys. 3).
- 3a (kontrola). Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u syngenicznego biorcy allogenicznego przeszczepu skóry (Rys. 3).
- 3b (kontrola). Dystrybucja normalnych TDL u syngenicznego biorcy allogenicznego przeszczepu skóry (Rys. 3).
4. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA u biorcy syngenicznego przeszczepu skóry (Rys. 3).
- 4a (kontrola). Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u biorcy syngenicznego przeszczepu skóry (Rys. 3).
- 4b (kontrola). Dystrybucja normalnych TDL u biorcy syngenicznego przeszczepu skóry (Rys. 3).



Rys. 3. Schemat doświadczeń w grupach 3, 3a, 3b, 4, 4a, 4b.

5. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA u syngenicznego biorcy po sham-operation (Rys. 4).
- 5a (kontrola). Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u syngenicznego biorcy po sham-operation (Rys. 4).

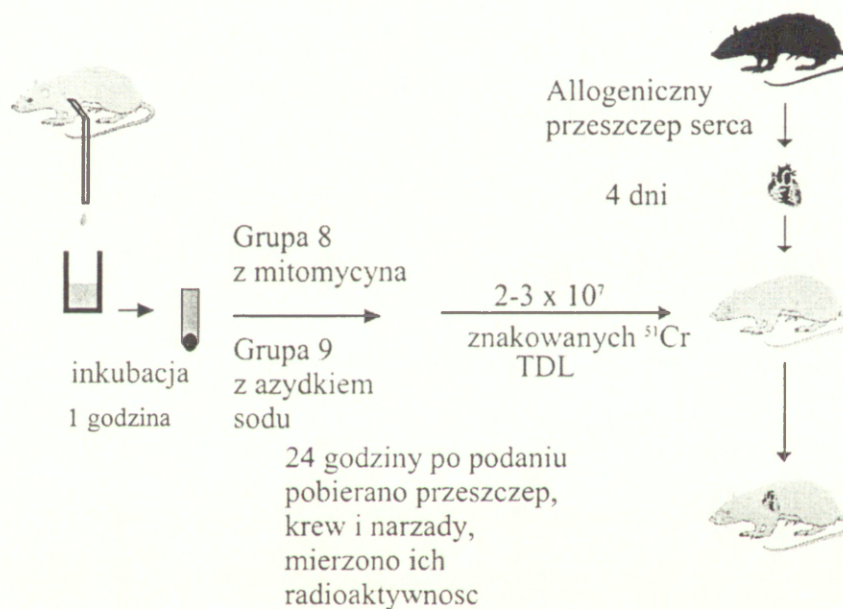


Rys. 4. Schemat doświadczeń w grupach 5, 5a.

6. Migracja *in vitro* limfocytów pochodzących z krwi obwodowej, węzłów chłonnych, śledziony i szpiku kostnego od szczurów otrzymujących CsA
- 6a (kontrola). Migracja *in vitro* limfocytów pochodzących z krwi obwodowej, węzłów chłonnych, śledziony i szpiku kostnego od szczurów otrzymujących 0.9% NaCl.
7. Fenotyp i ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni limfocytów chłonki, krwi obwodowej, węzłów chłonnych i śledziony pobranych od szczurów otrzymujących CsA.
- 7a (kontrola). Fenotyp i ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni limfocytów

chłonki, krwi obwodowej, węzłów kręzkowych chłonnych i śledziony pobranych od szczurów otrzymujących 0.9% NaCl.

8. Dystrybucja TDL poddanych działaniu mitomycyny w ustroju biorcy allogenicznego przeszczepu serca (Rys. 5).
9. Dystrybucja TDL poddanych działaniu azydku sodu w ustroju biorcy allogenicznego przeszczepu serca (Rys. 5).



Rys. 5. Schemat doświadczeń w grupach 8, 9.

2.2. Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenia wykonano na wsobnych szczepach szczurów: Wistar (WAG) (RT1⁴) i August (AUG) (RT1⁶) o wadze 200-250 g w wieku 3-6 miesięcy. Szczepy te różnią się między sobą silnymi antygenami zgodności tkankowej MHC. Szczury szczepu WAG służyły jako dawcy i biorcy limfocytów chłonki przewodu piersiowego (TDL) oraz syngenicznego i allogenicznego przeszczepu serca szczepu AUG.

Doświadczenia były przeprowadzane na zwierzętach znieczulonych wziewną narkozą eterem. Szczury w ostrym eksperymencie otrzymywały dożylny wlew 0.9% NaCl, w przewlekłym eksperymencie otrzymywały wodę pitną i pokarm *ad libitum*. Na badania przeprowadzane na zwierzętach wyraziła zgodę Komisja Nadzoru nad Dokonywaniem Badań na Ludziach i Zwierzętach Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

2.3. Model migracji limfocytów *in vivo* do przeszczepu i tkanek biorcy.

Jako model migracji limfocytów *in vivo* służył dożylny przeszczep limfocytów uzyskanych z chłonki przewodu piersiowego od szczurów otrzymujących CsA lub kontrolnych (TDL). Limfocyty znakowano izotopem ⁵¹Cr, a następnie wstrzykiwano zawiesinę 2-3 x 10⁷ komórek w 1 ml PBS syngenicznemu biorcy dożylnie przez cewnik założony do żyły udowej. Po 24 godzinach od podania znakowanych komórek zabijano szczury przecięciem rdzenia, a następnie pobierano do uprzednio zważonych próbek próbki tkanek: przeszczepu serca i skóry, płuc, wątroby, śledziony, węzłów chłonnych krezkowych i obwodowych, jelita cienkiego, szpiku kości udowej i skóry. Oznaczano radioaktywność materiału przy użyciu licznika promieniowania γ Gamma 5500b (Beckman). Uzyskane wyniki przedstawiano jako procent podanej radioaktywności mierzonej na 1 gram tkanki.

2.4. Stosowane metody.

2.4.1. Dożylne podawanie cyklosporyny.

Szczurom uśpionym eterem do żyły ogonowej przez igłę 27G podawano cyklosporynę A (Sandimmun[®], Sandoz) rozcieńczoną w Intralipidzie w dawce 10 mg/kg c.c. codziennie przez 7 dni. Kontrolne szczury otrzymywały odpowiednią co do objętości dawkę 0.9% NaCl.

2.4.2. Heterotopowy przeszczep serca.

Heterotopowy przeszczep serca wykonywano standartową metodą mikrochirurgiczną (54). Świeżo pobrane i wypłukane roztworem fizjologicznym soli serce wszczepiano do jamy brzusznej biorcy zespalaając tętnicę płucną dawcy z żyłą główną dolną biorcy “koniec do boku”, a następnie aortę wstępującą dawcy z aortą brzuszną biorcy. Zespolenie wykonywano szwem naczyniowym 8.0. Czynność serca oraz jego wielkość oceniano codziennie metodą palpacyjną. Ustanie skurczów serca przyjmowano za moment jego całkowitego odrzucenia.

2.4.3. Heterotopowy przeszczep skóry.

Pobrany fragment skóry grzbietu o wymiarach 1 x 1 cm oczyszczano z tkanki podskórnej, płukano roztworem fizjologicznym soli i umieszczano w jamie brzusznej biorcy jako wolny przeszczep.

2.4.3. Kaniulacja przewodu piersiowego chłonnego.

Kaniulację chłonnego przewodu piersiowego wykonywano standartową metodą mikrochirurgiczną w ogólnym wziewnym znieczuleniu eterem (55). Otwierano jamę otrzewnową poniżej lewego łuku żebrowego. Po odsłonięciu narządów odpreparowywano w przestrzeni pozaaortalnej przewód chłonny piersiowy. Po założeniu podwiązek i nacięciu

ścianki przewodu umieszczano w nim dren wykonany z cewnika Cavafix 16G, którego koniec ukształtowany był na wzór litery V. Cewnik wyprowadzano przez boczną ścianę jamy otrzewnowej. Jamę otrzewnową zamykano szwem ciągłym przez. Zwierzęta umieszczano w klatkach Bolmana. W trakcie zbierania chłonki szczury otrzymywały dożylny wlew roztworu fizjologicznego soli z heparyną 1 U/ml w objętości 2 ml/godz.

2.4.5. Kaniulacja żyły udowej.

Celem umożliwienia ciągłego wlewu 0.9% NaCl z heparyną w trakcie zbierania chłonki z przewodu piersiowego dokonywano kaniulacji żyły udowej umieszczając w niej cewnik (Cavafix 18G).

2.4.6. Dożylne podawanie znakowanych ^{51}Cr limfocytów.

Szczurom w ogólnym wziewnym znieczuleniu eterem podawano do żyły grzbietowej prącia zawiesinę $2-3 \times 10^7$ komórek w 1 ml PBS z szybkością 1 ml/min.

2.4.7. Izolacja komórek.

Limfocytów przewodu piersiowego chłonnego.

Chłonkę przewodu piersiowego zbierano w ciągu 12-16 godzin do jałowego plastikowego naczynia z dodatkiem 50U heparyny umieszczonej w lodzie. Komórki chłonki przewodu piersiowego odwirowywano przez 10 min przy 300g. Osad komórek płukano trzykrotnie w medium (RPMI 1640 (Wytw. Sur. i Szczep. Lublin) + 5% DFCS(Gibco)).

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.

Po otwarciu jamy brzusznej szczura pobierano krew strzykawką z żyły głównej dolnej i umieszczano w probówce z heparyną (20U/ml.). Następnie krew rozcieńczano buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) w stosunku 1:3 i 5 ml, nawarstwiano na 3ml Lymphoprepu (Nyegard, Oslo). Po odwirowaniu przez 40 min przy 300g zbierano komórki z granicy faz gradientu, płukano trzykrotnie w medium (RPMI 1640 +5%DFCS) wirując komórki przez 10min kolejno przy 500, 400 i 300g. Po ostatnim wirowaniu osad komórek zawieszano w medium.

Komórek węzłów chłonnych krezkowych.

Węzły chłonne pobierano po uprzednim skrwawieniu szczura i umieszczano je w probówce zawierającej 0.9% NaCl, następnie przekładano do płytki Petriego z medium (RPMI 1640 +5% DFCS), wyczesywano igłami w celu uzyskania pojedynczych komórek, trzykrotnie płukano w medium wirując przez 10 min. przy 300g.

Komórki śledziony.

Po uprzednim skrwawieniu szczura pobierano śledzionę i wkładano do naczynia z 0.9% NaCl o temperaturze pokojowej. Następnie, do płytki Petriego wlewano 2 ml medium RPMI 1640 z dodatkiem 5% DFCS, przenoszono śledzionę i dokładnie "wyczesywano" za pomocą igieł do wstrzyknięć, w celu uwolnienia pojedynczych komórek. Zawiesinę komórek przepuszczano przez filtr z zestawu do transfuzji płynów, uzupełniano medium (RPMI 1640+5%DFCS) i wirowano 10 min. przy 300g. Komórki płukano dwukrotnie. W celu wyizolowania z pełnej zawiesiny komórek jednojądrowych, po drugim płukaniu osad komórek zawieszano w 5 ml. medium i następnie nawarstwiano za pomocą pipety na 3ml.Lymphoprepu, wirowano 40 minut przy 300g. Pierścień komórek znajdujący się na

granicy faz gradientu zbierano pipetą pasteurowską, płukano 3x w medium wirując komórki przez 10 min kolejno przy 500, 400 i 300 g.

2.4.8. Znakowanie limfocytów z przewodu piersiowego izotopem ^{51}Cr .

Limfocyty zawieszano w PBS (10^6 komórek w 1 ml) i dodawano $50 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham, W. Brytania) i inkubowano przez 45 min. w temp 37°C . Po inkubacji zawiesinę komórek trzykrotnie płukano w RPMI 1640 + 5%DFCS po 10 min. Wirowania przy 300g. Następnie sporządzano zawiesinę o gęstości 2×10^7 komórek w 1 ml PBS i przy pomocy licznika promieniowania γ Gamma 5500B mierzono jej radioaktywność. Żywotność komórek oceniano przy użyciu test z 0.25% błękitem trypanu.

2.4.9. Ocena rozmieszczenia przeszczepionych dożylnie znakowanych izotopem ^{51}Cr limfocytów

Po zakończeniu doświadczenia pobrane narządy i tkanki ważono przy użyciu wagi analitycznej. Radioaktywność próbek mierzono przy użyciu licznika promieniowania γ Gamma 5500b. Uzyskane wyniki przedstawiano jako stosunek radioaktywności odzyskanej do podanej wyrażony w procentach podzielony przez masę tkanki w gramach (tzw. narządowa radioaktywność właściwa).

2.4.10. Inkubacja limfocytów z mitomycyną.

Limfocyty zawieszano w PBS (10^6 komórek w 1 ml), dodawano 2 ml roztworu mitomycyny (2 mg Mitomycyny (Sigma) + 5 ml wody dla iniekcji) i 5 ml RPMI 1640, inkubowano 60 min. w temperaturze 37°C . Po inkubacji do zawiesiny dodawano 5 ml 100% DFCS, odwirowywano 10 min. przy 300g., następnie trzykrotnie płukano w RPMI 1640 + 5%DFCS po 10 min. przy 300g. Następnie limfocyty znakowano izotopem ^{51}Cr .

2.4.11. Inkubacja limfocytów z azydkiem sodu.

Limfocyty zawieszano w PBS (10^8 komórek w 1 ml), dodawano 10 mM azydku sodu i inkubowano 60 min. w temperaturze 37°C . Po inkubacji zawiesinę komórek trzykrotnie płukano w RPMI 1640 + 5%DFCS po 10 min. przy 300g. Następnie limfocyty znakowano izotopem ^{51}Cr .

2.4.12. Znakowanie komórek przeciwciałami monoklonalnymi dla oceny ekspresji antygenów powierzchniowych.

Dla identyfikacji antygenów CD11a, CD18, CD44, CD54, CD62L, CD8, CD4 zastosowano w poszczególnych zawiesinach komórek jednojądrzastych metodę immunofluorescencji pośredniej z użyciem specyficznych mysich przeciwciał monoklonalnych firmy SeroTek oraz immunoglobulin dla kontroli izotypowych. Do probówek wlewano po 100 μl zawiesiny komórek (gęstość $10^7/\text{ml}$), dodawano przeciwciało monoklonalne w ilości ustalonej przez producenta i po wymieszaniu inkubowano 30 min w temp. $+4^{\circ}\text{C}$. Następnie dodawano medium (RPMI 1640 + 5%DFCS) i płukano dwukrotnie wirując przez 10min. przy 300g. Po drugim płukaniu dodawano do osadu komórek $10\mu\text{l}$ fragmentów F(ab) immunoglobuliny króliczej przeciw myszy związanych z fluoresceiną (RAM FITC nr kat. F313, Dako, Glostrup) uprzednio rozcieńczonej w PBS w stosunku 1:20 z dodatkiem 20% normalnej surowicy szczurzej pozbawionej dopełniacza. Jednocześnie z próbami badanymi wykonywano próby kontrolne, w których zamiast przeciwciała monoklonalnego, do komórek dodawano taką samą ilość normalnej immunoglobuliny mysiej odpowiedniego izotypu. Komórki inkubowano 30 min. w temp. $+4^{\circ}\text{C}$ i następnie płukano dwukrotnie w PBS z dodatkiem 2% DFCS. Osad komórek zawieszano w 0,5 ml 1%

paraformaldehydu, dokładnie mieszano i przechowywano w ciemnym miejscu w temp. +4°C do chwili badania w cytometrze przepływowym.

2.4.13. Cytometria przepływowa

Procentową zawartość komórek wyrażających badane antygeny oceniano w cytometrze przepływowym FACStar firmy Becton Dickinson wyposażonym w pojedynczy laser argonowy emitujący światło o długości fali 488 nm. oraz filtr dla FITC 0nm. Za pomocą programu komputerowego FACStar^{PLUS} uzyskiwano i przechowywano dane z 10000 komórek każdej badanej próbki. Analizę statystyczną danych wykonano posługując się programem FlowMATE (DAKO, Glostrup) na podstawie histogramów fluorescencji z uwzględnieniem próby kontrolnej.

2.4.14. Test migracji *in vitro* jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.

Test migracji *in vitro* jednojądrzastych komórek krwi obwodowej wykonywano według modyfikowanej metody Nelsona (56). Krew obwodową wirowano w kapilarze hematokrytowym. Kapilar po nacięciu łamano na granicy osocza i elementów morfotycznych, umieszczano na brzegu baseniku płytki hodowlanej Nunclon Multidish 6 (Nunc, Dania) i dodawano 1 ml RPMI 1640+5%DFCS. Płytkę pozostawiano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂ w powietrzu przez okres 24 godz. Po tym czasie odczytywano, przy użyciu powiększalnika, wielkość pola migracji, obrysowując na papierze jej zasięg. Powierzchnie pola migracji obliczano planimetrem.

2.4.15. Test migracji *in vitro* jednojądrzastych komórek z węzłów krezkowych chłonnych, śledziony i szpiku kostnego.

Test migracji *in vitro* jednojądrzastych komórek krwi obwodowej wykonywano według modyfikowanej metody Nelsona (Nelson 1975). Węzeł kręzkowy chłonny i śledzionę starannie oczyszczano od torebki, cięto na korku na fragmenty wielkością ok. 1 mm³, a następnie umieszczano w środku basenika płytki hodowlanej Nunclon Multidish 6 (Nunc, Dania) i dodawano 1 ml RPMI 1640+5%DFCS. Płytkę pozostawiano w temp. 37⁰C, w atmosferze 5% CO₂ w powietrzu, przez okres 24 godz. Po tym czasie odczytywano, przy użyciu powiększalnika, wielkość pola migracji, obrysowując na papierze jej zasięg. Powierzchnie pola migracji obliczano planimetrem.

2.4.16. Oznaczanie poziomu cyklosporyny we krwi.

We krwi szczurów otrzymujących cyklosporynę A (Sandimmun[®], Sandoz) rozcieńczoną w Intralipidzie w dawce 10 mg/kg c.c. codziennie przez 7 dni oznaczano poziom cyklosporyny przy użyciu metody Fluorescence Polarization Immunoassey.

Poziom cyklosporyny A we krwi wynosił 635±145 ng/mL.

2.4.17. Metody statystyczne.

Z kolejnych pomiarów w grupach doświadczalnych wyliczano średnią. Wyniki uzyskane w poszczególnych grupach doświadczalnych porównywano między sobą posługując się testem nieparametrycznym t-Studenta przy p = 0.05. Wyniki przedstawiono w postaci histogramów podając średnią oraz odchylenie standardowe.

2. WYNIKI

3.1. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA (CsA TDL) u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 1.) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od podania ich dożylnie wynosił: w przeszczepionym sercu 0.346 ± 0.09 , w sercu własnym 0.125 ± 0.08 , w elementach morfotycznych krwi 0.831 ± 0.89 , w osoczu 0.158 ± 0.23 , w płucach 1.892 ± 1.30 , śledzionie 24.565 ± 7.10 , wątrobie 3.311 ± 1.48 , węzłach chłonnych krezkowych 14.739 ± 15.75 , węzłach chłonnych obwodowych 4.815 ± 5.30 , szpiku kostnym 0.456 ± 0.21 , jelicie cienkim 0.409 ± 0.29 , skórze 0.056 ± 0.05 . [Tab. 1].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl przez 7 dni u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 1a) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w sercu przeszczepionym 0.860 ± 0.50 , w sercu własnym 0.108 ± 0.06 , w elementach morfotycznych krwi 0.733 ± 0.90 , w osoczu 0.112 ± 0.05 , w płucach 1.799 ± 0.49 , śledzionie 26.553 ± 10.80 , wątrobie 2.934 ± 0.99 , węzłach chłonnych krezkowych 29.620 ± 14.57 , węzłach chłonnych obwodowych 10.591 ± 5.49 , szpiku kostnym 0.582 ± 0.53 , jelicie cienkim 0.695 ± 0.29 , skórze 0.061 ± 0.05 . [Tab. 1].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 1b) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24

godzinach od podania komórek wynosił: w sercu przeszczepionym 0.943 ± 0.73 , w sercu własnym 0.188 ± 0.18 , w elementach morfotycznych krwi 1.793 ± 1.66 , w osoczu 0.116 ± 0.06 , w płucach 1.672 ± 0.41 , śledzionie 23.958 ± 7.88 , wątrobie 2.788 ± 1.44 , węzłach chłonnych krezkowych 26.016 ± 6.06 , węzłach chłonnych obwodowych 10.188 ± 2.10 , szpiku kostnym 0.461 ± 0.15 , jelicie cienkim 0.725 ± 0.36 , skórze 0.044 ± 0.04 . [Tab. 1].

Przedstawione wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca wykazały niższy procent radioaktywności w przeszczepionym sercu po podaniu TDL od dawcy otrzymującego CsA (grupa 1.) w porównaniu z podaniem limfocytów od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 1a) ($p < 0.01$) i normalnego dawcy (grupa 1b) ($p < 0.05$), niższy poziom we krwi po podaniu TDL od dawcy otrzymującego CsA (grupa 1.) w porównaniu z limfocytami od normalnego dawcy (grupa 1b) ($p < 0.02$), niższy poziom w węzłach chłonnych krezkowych i obwodowy i jelicie cienkim po podaniu TDL od dawcy otrzymującego CsA (grupa 1.) w porównaniu z limfocytami od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 1a) (odpowiednio $p < 0.04$, 0.03, 0.03) i normalnego dawcy (grupa 1b) (odpowiednio $p < 0.05$, 0.01, 0.05). [Rys. 6].

3.2. Dystrybucja CsA TDL u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca.

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA (CsA TDL) u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (grupa 2) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania wynosił: w przeszczepionym sercu 0.181 ± 0.08 , w sercu własnym 0.064 ± 0.04 , w elementach morfotycznych krwi 0.260 ± 0.19 , w osoczu 0.131 ± 0.12 , w płucach 2.516 ± 2.88 , śledzionie 33.598 ± 9.80 , wątrobie 3.445 ± 2.52 , węzłach chłonnych krezkowych 55.939 ± 13.44 , węzłach chłonnych obwodowych 13.530 ± 4.46 , szpiku kostnym 0.411 ± 0.11 , jelicie cienkim 0.780 ± 0.48 , skórze 0.03 ± 0.03 . [Tab. 2].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (grupa 2a) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w przeszczepionym sercu 0.170 ± 0.10 , w sercu własnym 0.096 ± 0.10 , w elementach morfotycznych krwi 0.496 ± 0.54 , w osoczu 0.091 ± 0.03 , w płucach 2.157 ± 1.61 , śledzionie 20.580 ± 9.91 , wątrobie 3.751 ± 1.45 , węzłach chłonnych krezkowych 19.834 ± 16.47 , węzłach chłonnych obwodowych 7.651 ± 6.13 , szpiku kostnym 0.498 ± 0.212 , jelicie cienkim 0.355 ± 0.21 , skórze 0.038 ± 0.04 . [Tab. 2].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (grupa 2b) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od podania komórek dożylnie wynosił: w przeszczepionym sercu 0.292 ± 0.19 , w sercu własnym 0.279 ± 0.30 , e elementach morfotycznych krwi 1.622 ± 1.53 , w osoczu 0.101 ± 0.10 , w płucach 1.959 ± 0.58 , śledzionie 31.536 ± 8.46 , wątrobie 2.638 ± 1.46 , węzłach chłonnych krezkowych 29.966 ± 22.57 , węzłach chłonnych obwodowych 5.858 ± 2.85 , szpiku kostnym 0.509 ± 0.10 , jelicie cienkim 0.420 ± 0.19 , skórze 0.044 ± 0.07 . [Tab. 2].

Przedstawione wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (grupa 2) wykazały że procent radioaktywności w przeszczepionym sercu nie różni się istotnie w porównaniu z podaniem limfocytów od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 2a) i od normalnego dawcy (grupa 2b), niższy we krwi w porównaniu z podaniem limfocytów od normalnego dawcy (grupa 2b) ($p<0.04$), wyższy w węzłach chłonnych krezkowych i obwodowy i jelicie cienkim w porównaniu z podaniem limfocytów od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 2a) (odpowiednio $p<0.002$, 0.05, 0.04) i od normalnego dawcy (grupa 2b) (odpowiednio $p<0.02$, 0.02, 0.03). [Rys.7].

Porównując wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA i 0.9% NaCl u biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 1 i 1a) z wynikami badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA i 0.9% NaCl u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (grupa 2 i 2a) można stwierdzić dwukrotnie wyższą radioaktywność allogenicznego przeszczepu po podaniu CsA-TDL (grupa 1) w porównaniu z syngenicznym (grupa 2) ($p < 0.001$), pieciokrotnie wyższą radioaktywność allogenicznego przeszczepu po podaniu NaCl-TDL (grupa 1a) ($p < 0.003$) w porównaniu z syngenicznym (grupa 2a), niższą radioaktywność śledziony biorcy alloprzeszczepu po podaniu CsA-TDL (grupa 1) w porównaniu z biorcą syngenicznego przeszczepu (grupa 2) ($p < 0.04$), niższą radioaktywność węzłów chłonnych krezkowych i obwodowych biorcy alloprzeszczepu po podaniu CsA-TDL (grupa 1) w porównaniu z biorcą syngenicznego przeszczepu (grupa 2) (odpowiednio $p < 0.001$, 0.01), niższą radioaktywność jelita cienkiego biorcy alloprzeszczepu po podaniu CsA-TDL (grupa 1) w porównaniu z biorcą syngenicznego przeszczepu (grupa 2) ($p < 0.03$), wyższą radioaktywność jelita cienkiego biorcy alloprzeszczepu po podaniu NaCl-TDL (grupa 1a) w porównaniu z biorcą syngenicznego przeszczepu (grupa 2a) ($p < 0.02$) [Rys. 8].

3.3. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry.

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry (grupa 3) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w skórze przeszczepionej 0.08 ± 0.02 , w elementach morfotycznych krwi 0.416 ± 0.12 , w osoczu 0.138 ± 0.03 , w płucach 2.032 ± 2.22 , śledzionie 38.294 ± 13.44 , wątrobie 1.760 ± 0.84 , węzłach chłonnych krezkowych

17.934±11.80, węzłach chłonnych obwodowych 5.901±5.28, szpiku kostnym 0.435±0.14, jelicie cienkim 0.497±0.30, skórze 0.025±0.01. [Tab. 3].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry (grupa 3a) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w skórze przeszczepionej 0.08±0.02, w elementach morfotycznych krwi 0.686±0.12, w osoczu 0.146±0.12, w płucach 1.737±0.82, śledzionie 43.287±6.88, wątrobie 1.743±0.49, węzłach chłonnych krezkowych 30.355±9.98, węzłach chłonnych obwodowych 7.678±3.27, szpiku kostnym 0.473±0.13, jelicie cienkim 0.887±0.35, skórze 0.047±0.03. [Tab. 3].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry (grupa 3b) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w skórze przeszczepionej 0.092±0.03, w elementach morfotycznych krwi 3.877±2.13, w osoczu 0.069±0.01, w płucach 1.893±0.29, śledzionie 54.551±10.38, wątrobie 2.297±0.57, węzłach chłonnych krezkowych 32.829±4.01, węzłach chłonnych obwodowych 10.517±3.80, szpiku kostnym 0.395±0.06, jelicie cienkim 1.034±0.22, skórze 0.038±0.005. [Tab. 3].

Przedstawione wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA u biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry (grupa 3) wykazały że procent radioaktywności w przeszczepionej skórze nie różni się istotnie w porównaniu z podaniem limfocytów od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 3a) i od normalnego dawcy (grupa 3b), niższy we krwi w porównaniu z podaniem limfocytów od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 3a) ($p<0.01$) i od normalnego dawcy (grupa 3b) ($p<0.005$), niższy w węzłach chłonnych krezkowych, jelicie cienkim i skórze w porównaniu z

podaniem limfocytów od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 3a) (odpowiednio $p < 0.04$, 0.03, 0.05), niższy w śledzionie, węzłach chłonnych krezkowych i obwodowych, jelicie cienkim i skórze w porównaniu z podaniem limfocytów od normalnego dawcy (grupa 3b) (odpowiednio $p < 0.02$, 0.01, 0.05, 0.002, 0.004) [Rys.9].

3.4. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry.

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA u biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry (grupa 4) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w skórze przeszczepionej 0.082 ± 0.03 , w elementach morfotycznych krwi 0.397 ± 0.35 , w osoczu 0.082 ± 0.03 , w płucach 3.198 ± 3.93 , śledzionie 45.909 ± 5.75 , wątrobie 3.999 ± 1.93 , węzłach chłonnych krezkowych 34.859 ± 23.44 , węzłach chłonnych obwodowych 8.569 ± 3.71 , szpiku kostnym 0.497 ± 0.12 , jelicie cienkim 0.932 ± 0.62 , skórze 0.035 ± 0.02 [Tab. 4].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry (grupa 4a) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w skórze przeszczepionej 0.121 ± 0.06 , w elementach morfotycznych krwi 1.44 ± 0.94 , w osoczu 0.210 ± 0.29 , w płuca 2.623 ± 2.75 , śledzionie 64.904 ± 23.64 , wątrobie 4.77 ± 0.59 , węzłach chłonnych krezkowych 14.432 ± 14.33 , węzłach chłonnych obwodowych 4.142 ± 3.95 , szpiku kostnym 0.774 ± 0.76 , jelicie cienkim 0.372 ± 0.29 , skórze 0.046 ± 0.02 [Tab. 4].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry (grupa 4b) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzonej na 1 gram tkanki po 24 godzinach od

podania dożylnego komórek wynosił: w skórze przeszczepionej 0.106 ± 0.10 , w elementach morfotycznych krwi 3.971 ± 2.16 , w osoczu 0.073 ± 0.02 , w płucach 1.599 ± 0.30 , śledzionie 518.856 ± 5.68 , wątrobie 2.465 ± 0.87 , węzłach chłonnych krezkowych 27.852 ± 4.56 , węzłach chłonnych obwodowych 8.437 ± 2.63 , szpiku kostnym 0.359 ± 0.05 , jelicie cienkim 0.944 ± 0.45 , skórze $0.042 \pm 0,01$ [Tab. 4].

Przedstawione wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA u biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry (grupa 4) wykazały że procent radioaktywności w przeszczepionej skórze istotnie się nie różni w porównaniu z podanymi limfocytami od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 4a) i od normalnego dawcy (grupa 4b), niższy we krwi w porównaniu z podanymi limfocytami od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 4a) ($p < 0.03$) i od normalnego dawcy (grupa 4b) ($p < 0.001$), wyższy w węzłach chłonnych krezkowych i obwodowych, jelicie cienkim i skórze w porównaniu z podanymi limfocytami od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 4a) (odpowiednio $p < 0.05$, 0.03, 0.04, 0.05) [Rys. 10].

Porównując przedstawione wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL), 0.9% NaCl i bez leków u biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupy 1, 1a, 1b) z dystrybucją u biorcy allogenicznego przeszczepu skóry (grupy 3, 3a, 3b) stwierdzam podobne wartości procentu radioaktywności w węzłach chłonnych krezkowych i obwodowych i jelicie, oraz mniejszy procent radioaktywności węzłów chłonnych krezkowych i obwodowych i jelicie po podaniu CsA-TDL w porównaniu z kontrolą [Rys. 11].

3.5. Dystrybucja CsA TDL u syngenicznego biorcy po sham-operation.

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA u syngenicznego biorcy po sham-operation (grupa 5) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od

dożylnego podania komórek wynosił: w elementach morfotycznych krwi 0.615 ± 0.41 , w osoczu 0.078 ± 0.02 , w płucach 4.345 ± 3.4 , śledzionie 62.736 ± 12.49 , wątrobie 3.437 ± 0.67 , węzłach chłonnych kręzkowych 27.624 ± 8.57 , węzłach chłonnych obwodowych 7.734 ± 3.26 , szpiku kostnym 0.856 ± 0.69 , jelicie cienkim 0.66 ± 0.24 , skórze 0.067 ± 0.05 . [Tab. 5].

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl u syngenicznego biorcy po sham-operation (grupa 5a) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek wynosił: w elementach morfotycznych krwi 1.594 ± 1.36 , w osoczu 0.092 ± 0.02 , w płuca 2.947 ± 1.06 , śledzionie 72.401 ± 19.36 , wątrobie 3.994 ± 0.58 , węzłach chłonnych kręzkowych 11.897 ± 5.66 , węzłach chłonnych obwodowych 4.314 ± 1.56 , szpiku kostnym 0.426 ± 0.06 , jelicie cienkim 0.327 ± 0.1 , skórze 0.037 ± 0.02 [Tab. 5].

Przedstawione wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od dawcy otrzymującego CsA u syngenicznego biorcy po sham-operation (grupa 5) wykazały że procent radioaktywności wyższy w węzłach chłonnych kręzkowych i obwodowych i w jelicie cienkim w porównaniu z podanymi limfocytami od dawcy otrzymującego 0.9% NaCl (grupa 5a) (odpowiednio $p < 0.002$, 0.03, 0.01). [Rys. 12].

Porównanie danych dystrybucji CsA-TDL we krwi i narządach limfatycznych u zwierząt z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 1) z analogicznymi danymi u zwierząt bez przeszczepu (grupa 5) wykazały w grupie z przeszczepem tendencje do zwiększenia liczby krążących CsA-TDL we krwi i ich mniejsze gromadzenie się w śledzionie, węzłach chłonnych i jelicie. Wartości wynosiły dla grupy z przeszczepem w elementach morfotycznych krwi 0.831 ± 0.89 , śledzionie 24.565 ± 7.1 , węzłach chłonnych kręzkowych 14.739 ± 15.75 , obwodowych 4.815 ± 5.3 i jelicie 0.409 ± 0.29 zaś dla grupy bez przeszczepu we krwi 0.62 ± 0.41 , śledzionie 62.736 ± 12.49 , węzłach kręzkowych 27.624 ± 8.57 , obwodowych

7.734±3.26 oraz jelicie 0.66±0.24 [Tab 6]. W grupie kontrolnej z NaCl-TDL nie stwierdzano różnic w stężeniu krążących NaCl-TDL we krwi między zwierzętami z (grupa 1a) i bez przeszczepu (grupa 5a). Natomiast w grupie z przeszczepem wyraźnie obniżone było gromadzenie się tych komórek w śledzionie, podwyższone zaś w węzłach i jelicie. W grupie z przeszczepem (grupa 1a) wartości wynosiły we krwi 0.733±0.9, w śledzionie 26.553±10.8, w węzłach chłonnych krezkowych 29.62±14.57, obwodowych 10.591±5.49, zaś w grupie bez przeszczepu (grupa 5a) we krwi 1.594±1.36, w śledzionie 72.401±19.36, w węzłach chłonnych krezkowych 11.897±5.66, obwodowych 4.314±1.56 i jelicie 0.327±0.1 [Tab. 6], [Rys. 13].

Porównanie danych dystrybucji CsA-TDL we krwi i narządach limfatycznych u zwierząt z syngenicznym przeszczepem serca (grupa 2) z analogicznymi danymi u zwierząt bez przeszczepu (grupa 5) wykazały w grupie z przeszczepem tendencje do zmniejszenia liczby krążących CsA-TDL we krwi i ich większe gromadzenie się w śledzionie, węzłach chłonnych i jelicie. Wartości wynosiły dla grupy z przeszczepem w elementach morfotycznych krwi 0.26±0.19, śledzionie 33.598±9.8, węzłach chłonnych krezkowych 55.939±13.44, obwodowych 13.53±4.46 i jelicie 0.78±0.48 zaś dla grupy bez przeszczepu we krwi 0.62±0.41, śledzionie 62.736±12.49, węzłach krezkowych 27.624±8.57, obwodowych 7.734±3.26 oraz jelicie 0.66±0.24 [Tab 7]. W grupie kontrolnej z NaCl-TDL nie stwierdzano różnic w stężeniu krążących NaCl-TDL we krwi między zwierzętami z i bez przeszczepu. Natomiast w grupie z przeszczepem wyraźnie obniżone było gromadzenie się tych komórek w śledzionie, podwyższone zaś w węzłach i jelicie. W grupie z przeszczepem wartości wynosiły we krwi 0.496±0.54, w śledzionie 20.58±9.91, w węzłach chłonnych krezkowych 19.834±16.47, obwodowych 7.651±6.13, zaś w grupie bez przeszczepu we krwi 1.594±1.36, w śledzionie 72.401±19.36, w węzłach chłonnych krezkowych 11.897±5.66, obwodowych 4.314±1.56 i jelicie 0.327±0.1 [Tab. 7], [Rys. 13].

Z przytoczonych danych wynika, iż już sam przeszczep allogeniczny zmienia dystrybucję limfocytów biorcy zubożając w nie śledzionę i wzbogacając węzły chłonne i tkankę chłonną jelita. Jeśli po przeszczepieniu serca podano limfocyty znajdujące się przez 7 dni pod farmakologicznym wpływem CsA, wówczas następowały dalsze zmiany w dystrybucji. CsA-TDL pozostawały w krążeniu a mniej ich gromadziło się w narządach i tkankach limfatycznych.

3.6. Migracja *in vitro* limfocytów pochodzących z krwi obwodowej, węzłów chłonnych, śledziony i szpiku kostnego szczurów.

Badania migracji *in vitro* limfocytów od szczurów otrzymujących CsA (grupa 6) wykazały że rozmiary powierzchni pola migracji mierzone w mm² wynosiły: limfocyty pochodzące z krwi obwodowej 241.1±68.6, śledziony 672.0±443.1, węzłów chłonnych kregkowych 763.0±455.9, szpiku kostnego 763.0±864.2 [Tab. 8].

Badania migracji *in vitro* limfocytów od szczurów otrzymujących 0.9% NaCl (grupa 6a) wykazały że rozmiary powierzchni pola migracji mierzone w mm² wynosiły: limfocyty pochodzące z krwi obwodowej 287.9±94.7, śledziony 723.7±441.3, węzłów chłonnych kregkowych 772.3±465.7, szpiku kostnego 962.6±1174.4 [Tab. 8].

Przedstawione wyniki badań migracji *in vitro* limfocytów pochodzących z krwi obwodowej, śledziony, węzłów chłonnych kregkowych i szpiku kostnego od szczurów otrzymujących CsA i NaCl (grupa 6 i 6a) nie wykazały różnic rozmiarów powierzchni pola migracji. [Rys. 14].

3.7. Fenotyp i ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni limfocytów.

Badania ekspresji CD11a, CD18, CD44, CD54, CD62L, CD8, CD4 na powierzchni limfocytów od szczurów otrzymujących CsA (grupa 7) wykazały w chłonce przewodu piersiowego odpowiednio 98.133±2.38, 94.667±8.72, 87.600±6.10, 0.700±0.36, 34.400±7.01, 30.533±2.08, 70.867±5.36 % pozytywnych komórek, w krwi obwodowej odpowiednio

96.9±3.1, 90.5±14.0, 76.82±17.2, 1.93±1.3, 53.33±5.1, 46.73±23.8, 54.40±4.4 % pozytywnych komórek, w węzłach krezkowych chłonnych odpowiednio 97.73±0.4, 96.37±3.1, 82.52±5.5, 1.20±0.7, 41.87±10.5, 29.07±1.0, 53.90±1.0 % pozytywnych komórek, w śledzionie odpowiednio 95.27±6.4, 92.40±10.8, 78.17±8.0, 1.73±1.2, 53.97±15.3 %, 29.1±6.4, 56.7±4.5 pozytywnych komórek [Tab. 9].

Badania ekspresji CD11a, CD18, CD44, CD62L, CD8, CD4 na powierzchni limfocytów od szczurów otrzymujących 0.9% NaCl (grupa 7a) wykazały w chłonce przewodu piersiowego odpowiednio 92.967±4.99, 87.800±8.53, 75.733±8.35, 54.800±5.85, 28.000±2.01, 64.967±8.32 % pozytywnych komórek, w krwi obwodowej odpowiednio 94.03±5.7, 87.57±8.3, 78.40±12.1, 64.97±0.6, 35.70±3.8, 52.60±1.7 % pozytywnych komórek, w węzłach krezkowych chłonnych odpowiednio 98.30±0.8, 95.57±3.8, 82.93±5.5, 0.8±1.0, 55.97±8.3, 28.0±46, 54.83±3.6% pozytywnych komórek, w śledzionie odpowiednio 96.20±4.2, 95.77±4.6, 82.63±9.7, 1.2±1.1, 55.47±6.6, 32.6±6.1, 54.4±3.8 % pozytywnych komórek. [Tab. 9].

Przedstawione wyniki badań ekspresji CD11a, CD18, CD44, CD54, CD62L, CD8, CD4 na powierzchni limfocytów wykazują niższą ekspresję L-selektyny (CD62L) na powierzchni limfocytów chłonki przewodu piersiowego i krwi obwodowej od szczurów otrzymujących CsA (grupa 7) w porównaniu z limfocytami od szczurów otrzymujących 0.9% NaCl (grupa 7a) (odpowiednio $p < 0.01$, 0.05). [Rys. 15].

3.8. Dystrybucja limfocytów chłonki przewodu piersiowego poddanych działaniu mitomycyny w ustroju biorcy allogenicznego przeszczepu serca.

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr i inkubowanych z mitomycyną limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 8) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzony na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek

wynosił: w przeszczepionym sercu 0.202 ± 0.20 , w sercu własnym 0.036 ± 0.02 , w elementach morfotycznych krwi 0.073 ± 0.08 , w osoczu 0.235 ± 0.33 , w płucach 0.302 ± 0.26 , śledzionie 42.080 ± 8.29 , wątrobie 3.068 ± 0.60 , kręzkowych węzłach chłonnych 8.479 ± 18.97 , węzłach chłonnych obwodowych 3.061 ± 7.243 , szpiku kostnym 0.612 ± 0.25 , jelicie cienkim 0.285 ± 0.12 , skórze 0.021 ± 0.02 . [Tab. 10].

Przedstawione wyniki badań dystrybucji inkubowanych z mitomycyną znakowanych ^{51}Cr limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 8) świadczą że procent radioaktywności niższy w sercu przeszczepionym i własnym, elementach morfotycznych krwi, płucach, węzłach chłonnych kręzkowych, węzłach chłonnych obwodowych, jelicie cienkim w porównaniu z podaniem nie inkubowanych limfocytów od normalnego dawcy (grupa 1b) (odpowiednio $p < 0.03$, 0.03 , 0.02 , 0.001 , 0.001 , 0.04 , 0.03 , 0.02), procent radioaktywności nie różni się statystycznie znamienne w sercu przeszczepionym, elementach morfotycznych krwi, węzłach chłonnych kręzkowych, węzłach chłonnych obwodowych, jelicie cienkim w porównaniu z podaniem nie inkubowanych limfocytów od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 1) [Tab. 10, Rys. 16].

3.9. Dystrybucja limfocytów chłonki przewodu piersiowego poddanych działaniu azydku sodu w ustroju biorcy allogenicznego przeszczepu serca.

Badania dystrybucji znakowanych ^{51}Cr i inkubowanych z azydkiem sodu limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 9) wykazały że procentowy udział podanej radioaktywności mierzonej na 1 gram tkanki po 24 godzinach od dożylnego podania komórek: w przeszczepionym sercu 0.872 ± 0.41 , w sercu własnym 0.063 ± 0.02 , w elementach morfotycznych krwi 0.432 ± 0.33 , w osoczu 0.069 ± 0.02 , w płucach 1.104 ± 0.38 , śledzionie 31.401 ± 12.82 , wątrobie 1.646 ± 0.19 , węzłach chłonnych kręzkowych 43.570 ± 13.17 , węzłach

chłonnych obwodowych 13.350 ± 4.09 , szpiku kostnym 0.380 ± 0.06 , jelicie cienkim 0.862 ± 0.34 , skórze 0.036 ± 0.04 [Tab. 10].

Przedstawione wyniki badań dystrybucji znakowanych ^{51}Cr i inkubowanych z azydkiem sodu limfocytów chłonki przewodu piersiowego od normalnego dawcy u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 9) świadczą że procent radioaktywności w przeszczepionym sercu nie różni się istotnie, niższy w sercu własnym, elementach morfotycznych krwi, osoczu, płucach i wątrobie (odpowiednio $p < 0.04$, 0.03 , 0.03 , 0.01 , 0.03), wyższy w węzłach chłonnych krezkowych ($p < 0.01$) w porównaniu z nie inkubowanymi limfocytami od normalnego dawcy (grupa 1b), wyższy w przeszczepionym sercu, węzłach chłonnych krezkowych i obwodowych i jelicie (odpowiednio $p < 0.007$, 0.001 , 0.001 , 0.007), niższy w sercu własnym, płucach i wątrobie (odpowiednio $p < 0.02$, 0.05 , 0.003) w porównaniu z nie inkubowanymi limfocytami od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 1) [Tab. 10. Rys.17].

4. DYSKUSJA.

Aczkolwiek odrzucanie przeszczepów allogenicznych przebiega w samej przeszczepionej tkance prowadząc do jej zniszczenia (eliminacji antygenów transplantacyjnych dawcy), to jednak rozpoczyna się ono i jest regulowane przez procesy rozwijające się we wtórnych tkankach limfatycznych (secondary lymphoid organs) takich jak śledziona, węzły chłonne i inne skupiska tkanki chłonnej w narządach mięszzowych (jelito, płuca, skóra). Odrzucanie przeszczepu allogenicznego jest procesem ogólnoustrojowym, a nie jedynie miejscowym. Warunkiem rozpoczęcia reakcji ustroju na obecność u biorcy antygenów transplantacyjnych dawcy jest dopłynięcie tych ostatnich z prądem krwi lub limfy do narządów limfatycznych. Antygeny transplantacyjne dawcy znajdują się na powierzchni komórek parenchymalnych przeszczepu, komórek "pasażerowych" przeszczepu (limfocyty dawcy w naczyniach przeszczepianego narządu, komórki dendrytyczne tego narządu), w postaci "złuszczonej" z błony komórkowej dawcy, rozpuszczalnej, wnikającej do płynów ustrojowych biorcy, wreszcie w postaci peptydów MHC uwolnionych z zagłębienia (groove) w receptorze limfocyta lub komórki dendrytycznej dawcy. Antygen dawcy musi przedostać się do zorganizowanej tkanki limfatycznej biorcy i tam być rozpoznany jako obcy w procesie tzw. bezpośredniej lub pośredniej prezentacji. Tak więc lokalizacja antygenów transplantacyjnych dawcy reguluje w sposób dawko- i czasozależny odpowiedź biorcy przeszczepu (57).

Zasadnicza masa antygeny transplantacyjnego dawcy dostaje się do tkanek limfatycznych biorcy w postaci komórek "pasażerowych" przeszczepu lub własnych komórek limfoidalnych, które przepływając przez przeszczepiony narząd rozpoznają i przyswoiły antygen dawcy. Podstawowym warunkiem dla rozwoju reakcji allogenicznej u biorcy jest więc zachowanie zarówno miejscowego jak i ogólnoustrojowego krążenia limfocytów i

komórek dendrytycznych prezentujących antygen innym komórkom odpornościowym biorcy (APC- antigen presenting cells) (58, 59, 60, 61, 62). Dotyczy to zarówno tzw fazy aferentnej rozpoznania obcości (non-self) antygenów dawcy przez krążące komórki biorcy i komórki w jego narządach limfatycznych, jak i tzw fazy efektorowej, w której z narządów limfatycznych wydostają się specyficznym aktywowane limfocyty T skierowane w swej migracji do miejsca przeszczepu. Stosowane w praktyce klinicznej farmakologiczne środki immunosupresyjne powodują na różnych etapach wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału "allogenicznego" hamowanie procesu proliferacji specyficznych klonów cytotoksycznych, oraz wytwarzanie i wydzielanie cytokin prozapalnych. W tym kierunku prowadzona jest większość badań uzasadnianych poszukiwaniem możliwości uzyskania największej specyficzności i jednocześnie ograniczenia nadmiernej toksyczności leków. W badaniach mechanizmu działania tych leków *in vivo* małą uwagę zwraca się na ich negatywny wpływ na proces ogólnoustrojowej migracji komórek odpornościowych i tą drogą ograniczanie procesu odrzucania. Badania takie są trudne w warunkach klinicznych i mogą być prowadzone głównie na zwierzętach. Dokładne poznanie mechanizmu upośredzającego procesy migracyjne mogłyby dać możliwość uspecyfikowania działania leku właśnie w kierunku ograniczania specyficznej migracji i być może ograniczania podawanych jego dawek.

W Zakładzie Chirurgii Transplantacyjnej zauważyliśmy zarówno u zwierząt, jak i w pojedynczych przypadkach u ludzi, iż CsA podawana w terapeutycznych dawkach prowadzi do ogromnego zubożenia tkanek limfatycznych, a w szczególności węzłów chłonnych i tkanki chłonnej jelita w elementy limfoidalne. Zrodziło to pytanie czy efektem działania CsA nie jest, poza ograniczeniem proliferacji limfocytów, także ograniczenie procesu ogólnoustrojowej migracji limfocytów. Wiadomo bowiem, iż w ustroju ma miejsce stały proces migracji limfocytów między narządami limfatycznymi np. śledzioną i węzłami krezkowymi i obwodowymi, śledzioną i tkanką chłonną jelitem, czy też krwią i węzłami.

Pierwszym i głównym sygnałem do migracji jest wprowadzenie do tkanki chłonnej obcego antygeny (58). Można by się spodziewać, iż limfocyty osobnika otrzymującego CsA wykazywałyby zmniejszona tendencje do migracji do alloprzeszczepu. Nie tylko więc ograniczona proliferacja ale także zmniejszona zdolnością migracji możnaby tłumaczyć mniejsze nacieki przeszczepu u chorych leczonych CsA.

W badaniach prowadzonych w tym kierunku, będących przedmiotem pracy doktorskiej, udało się wykazać, iż rzeczywiście limfocyty ogólnoustrojowej puli krążącej (limfocyty z przewodu piersiowego, thoracic duct lymphocytes-TDL) znajdujące się przez okres 7 dni pod farmakologicznym wpływem CsA (CsA-TDL) mniej migrują do alloprzeszczepu serca. Obniżenie poziomu gromadzenia się CsA-TDL osiągnęło wartości gromadzenia się normalnych limfocytów w przeszczepie syngenicznym. Zauważono również, iż CsA-TDL mają mniejszą tendencję do gromadzenia się w przeszczepie syngenicznym, aczkolwiek zjawisko to nie było statystycznie znamienne. Inną tkanką allogeniczną przeszczepianą w identycznym protokóle jak przeszczep serca była skóra. Skóra ma większe zdolności immunogenne niż tkanka serca i specyficzny system migracji przez nią komórek odpornościowych. To ostatnie jest związane z jej ekspozycją na antygeny otoczenia. Przeszczep skóry umieszczano w jamie brzusznej, a nie umieszczano na powierzchni ciała, z dwóch powodów: a) proces mobilizacji i rekrutacji komórek prezentujących antygen i limfocytów jest w jamie otrzewnej wielokrotnie szybszy niż byłby w nieunaczynionym powierzchniowym przeszczepie skórnym, a podobny do tego jak w unaczynionym przeszczepie narządowym (serce), b) skóra tak jak serce były przeszczepiane do jamy brzusznej, zachowana więc została geografia przeszczepu odgrywająca zasadniczą rolę w procesie immunizacji biorcy (57). Nie stwierdzono, w porównaniu z przeszczepem serca, mniejszego gromadzenia się CsA-TDL w allogenicznym przeszczepie skórnym, ale był to wynik teoretycznie (63, 64) oczekiwany. Z metodycznego punktu widzenia wartości

radioaktywności w małych przeszczepionych fragmentach skóry były niskie, stąd mogły zacierać się różnice z wartościami kontrolnymi. Z biologicznego punktu widzenia żaden z farmakologicznych środków immunosupresyjnych stosowanych po przeszczepach narządowych nie jest skuteczny w hamowaniu procesu odrzucania allogenicznego przeszczepu skóry (65). Środki te w minimalnym stopniu hamują chemoatrakcję komórek odpornościowych do zapalnych ognisk skóry.

Niezależnie od obserwacji dotyczących migracji CsA-TDL do alloprzeszczepów, nieoczekiwanie zauważono, iż CsA ma wpływ na ogólnoustrojowy proces migracji i dystrybucji krążącej puli limfocytów. Wpływ ten dodatkowo nakładał się na zmieniony proces migracji limfocytów wywołany zarówno allogenicznym przeszczepem serca jak i skóry.

I tak, CsA-TDL podane normalnemu syngenicznemu szczurowi w grupie po sham-operation (nacięcie powłok bez przeszczepu) pozostawały we krwi na podobnym poziomie jak NaCl-TDL (kontrolne), natomiast miały wyraźną tendencję, w porównaniu do NaCl, do gromadzenia się w tkankach limfoidalnych, poza śledzioną. Nie udało się rozstrzygnąć na obecnym etapie pracy czy mamy tu do czynienia ze zwiększonym zatrzymywaniem CsA-TDL w tkance limfatycznej, co ma np miejsce przy uszkodzeniu błony komórkowej, apoptozie, zahamowaniu ekspresji receptorów niezbędnych do migracji przez substancje międzykomórkową, czy też z wolniejszym przechodzeniem CsA-TDL przez zorganizowaną tkankę limfatyczną wskutek upośledzenia wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych limfocyta przez CsA.

Wykonany syngeniczny przeszczep serca nie powodował większych zmian w dystrybucji CsA-TDL w porównaniu z grupą po sham-operation, z wyjątkiem nieco większego gromadzenia się limfocytów w węzłach chłonnych krezkowych. Ten efekt mógł

być częściowo tłumaczony urazem węzłów krezki przy heterotopowym przeszczepianiu serca do naczyń brzusznych.

Natomiast allogeniczny przeszczep serca powodował zatrzymanie CsA-TDL we krwi i ich zmniejszone gromadzenie się w tkankach limfoidalnych włącznie ze śledzioną. Był to efekt prawie odwrotny od obserwowanego po przeszczepie syngenicznym. Uogólniając uzyskane obserwacje należy stwierdzić, iż CsA miała wpływ na TDL: a) u zwierząt normalnych i po sham-operation oraz u otrzymujących przeszczep syngeniczny kierujący je do gromadzenia się w narządach i tkankach limfatycznych, b) u zwierząt otrzymujących przeszczep allogeniczny do zatrzymywania ich we krwi, a nie w narządach limfatycznych. Należy tu dodać dla jasności zagadnienia, iż NaCl-TDL podawane biorcom allogenicznego przeszczepu gromadziły się w tkankach limfatycznych. Podobny do obserwowanego po przeszczepieniu serca kierunek zmian w ogólnoustrojowej dystrybucji krążących limfocytów obserwowano po przeszczepieniu skóry.

Ograniczenie gromadzenia się limfocytów pod wpływem CsA w aktywowanych tkankach chłonnych obserwowano po pobudzeniu krwinkami barana (66)

Mniejsze gromadzenie się CsA-TDL w alloprzeszczepie i narządach i tkankach limfatycznych biorcy może świadczyć o upośledzeniu ich zdolności rozpoznawania nie tylko aktywowanych komórek alloprzeszczepu, ale i własnych aktywowanych strukturalnych komórek zorganizowanej tkanki chłonnej. Tak więc jest to proces niespecyficzny ograniczony do odśrodkowej (eferentnej) fazy reakcji allogenicznej. W tej sytuacji CsA-TDL w ich subpopulacji specyficznie cytotoksycznej nie rozpoznawałyby docelowych komórek przeszczepu. Nie rozpoznawałyby też lub miały ograniczoną aktywność we współdziałaniu z aktywowanymi przez alloantygeny własnymi (syngenicznymi) komórkami dendrytycznymi i limfocytami węzłów chłonnych i tkanki chłonnej jelita.

Obserwowane zmniejszone gromadzenie się zarówno CsA-TDL jak i NaCl-TDL w śledzeniu można interpretować: a) trudnościami oceny ilościowej zawartych w śledzenie limfocytów ze względu na obkurczanie się tego narządu pod wpływem bodźców antygenowych i neurohormonalnych, oraz b) wychwytywanie przez ten narząd limfoidalny przede wszystkim antygeny rozpuszczalnego i cząsteczkowego, wolnego lub związanego z leukocytami krwi, co w badanym modelu odgrywało mniejszą rolę.

Okres prowadzonych obserwacji był ograniczony do 24 godzin po podaniu CsA-TDL, nie można więc było dodatkowo określić ilościowo międzynarodowej migracji CsA-TDL i wpływu na nią CsA. Można przypuszczać, iż również ta faza procesu dystrybucji krążących limfocytów była upośledzona. CsA-TDL były podawane biorcy w 4-tym dniu po wykonanym przeszczepie allogenicznym, a więc na szczycie procesu linwazji przez komórki gospodarza (67). Był to więc optymalny okres, w którym aktywowany był receptorowy układ dawcy (aktywacja komórek śródbłonkowych dawcy) i łatwo jest śledzić kinetykę adhezji i wynaczynienia atakujących komórek biorcy.

Badanie ruchliwości CsA-TDL *in vitro* nie wykazało różnic w porównaniu z NaCl-TDL. Obserwacja ta jedynie pozornie pozostaje w sprzeczności z obserwacjami uzyskanymi *in vivo*, gdzie miało miejsce wyraźne ograniczenie procesu migracji. W warunkach *in vitro* badamy jedynie spontaniczną, nie docelową ruchliwość (random migration, motility), determinowaną działaniem wewnątrzkomórkowych elementów kurczliwych, poziomem metabolizmu komórki, tłokiem komórkowym (crowding), rodzajem medium i czynnikami fizycznymi hodowli. Spontaniczna ruchliwość jest zwykle ograniczona przez obniżenie metabolizmu wewnątrzkomórkowego. W warunkach *in vivo* komórki są przenoszone z prądem płynów ustrojowych, zatrzymywane przez układ molekuł adhezyjnych i ich ligandów, oraz pobudzane do lokalnej migracji przez chemokiny (68). Uzyskane w tej pracy obserwacje wskazują, iż CsA nie hamowała podstawowych etapów metabolizmu limfocytów. W

badaniach innych autorów CsA wykazywał właściwości hamowania migracji *in vitro* ale głównie przy wysokich stężeniach leku (69, 2).

Wszystkie powyżej opisane obserwacje są całkowicie oryginalne i nie znajdują odpowiedników do dyskusji w literaturze. Głównie przedstawiane obserwacje dotyczące ograniczonych nacieków zapalnych po stosowaniu CsA zarówno w doświadczalnych przeszczepach jak w stanach zapalnych tkanek. Najbliższa przedstawianej pracy jest publikacja Hare et al (37) wykazująca ograniczenia nacieków limfocytarnych w allogenicznych przeszczepach nerwów obwodowych. W pracy tej zarówno krążące limfocyty jak cała tkanka limfatyczna biorcy i sam przeszczep znajdowały się pod wpływem CsA. W naszym modelu badaliśmy wybiórczo zachowanie się samych limfocytów biorcy znajdujących się pod farmakologicznym wpływem CsA i przeniesionych do biorcy alloprzeszczepu, który nie otrzymywał CsA. Lord et al. stwierdzili, iż CsA ograniczała wielkość nacieków w ortotopowych przeszczepach wątroby, nie ustosunkowując się do możliwości ograniczania miejscowej proliferacji limfocytów biorcy przez CsA podawaną ogólnoustrojowo (40). CsA ograniczała nacieki jednojądrzaste w alloprzeszczepach serca (50, 52). W innych pracach wykazano, iż CsA ogranicza gromadzenie się limfocytów i eozynofili w tkance chłonnej płuca (70, 39), bez interpretacji czy chodziło tu o ograniczoną migrację czy też zmniejszoną miejscową proliferację komórkową.

Zasadniczą kwestią pozostaje wyjaśnienie mechanizmu ograniczonej migracji CsA-TDL do alloprzeszczepów i zmienionego przez CsA wzoru ogólnoustrojowej migracji i dystrybucji krążącej puli limfocytów, głównie populacji T. Pierwsze postawione pytanie to czy CsA hamuje ekspresję molekuł adhezyjnych niezbędnych dla przylegania limfocytów do aktywowanych komórek śródbłonna alloprzeszczepu i dla przechodzenia limfocytów do przestrzeni pozanaczyniowej? Siedmiodniowe podawanie CsA nie wykazało wpływu CsA na ekspresję na TDL cząsteczek LFA1, CD 44 czy CD 54. Aczkolwiek te pierwsze dwie

molekuły znajdują się konstytutywnie na powierzchni większości limfocytów T, to molekula CD 54 występuje tylko w populacji pobudzonych limfocytów (71). Stąd prawie zerowe wartości tej ostatniej w przedstawionych badaniach. Natomiast CsA w sposób wyraźny ograniczała ekspresję CD62L (46), selektyny odpowiedzialnej za przyleganie i wynacznienie limfocytów w populacji TDL, krwi obwodowej i krezkowych węzłów chłonnych (72). Obserwacja ta może częściowo tłumaczyć mniejsze gromadzenie się CsA TDL w alloprzeszczepie i w tkankach limfatycznych biorcy. Inni autorzy również obserwowali obniżenie ekspresji L selektyny po podawaniu CsA (46). Natomiast jak tłumaczyć nasilone gromadzenie się CsA-TDL w narządach limfatycznych bez przeszczepu allogenicznego? L-selektyna odgrywa zasadniczą rolę w wynacznieniu limfocytów w ognisku przewlekle zapalnym i w pobudzonych węzłach chłonnych. Mniejsza jest jej rola w warunkach normalnego procesu zatrzymywania limfocytów na poziomie żyłek pozakapilarnych w węzłach chłonnych, gdzie współdziałają dodatkowe układy molekularne specyficzne dla tkanki węzłowej. Wydaje się, iż CsA powoduje powstanie dodatkowych dotychczas niepoznanych zmian strukturalnych na błonie limfocyta, które mogą być odpowiedzialne za ich zatrzymywanie w tkance chłonnej. Istnieją odwrotne obserwacje mówiące o obniżającym wpływie na przyleganie i emigrację działaniu CsA w węzłach chłonnych (41, 73, 74). Obserwowano również, w odróżnieniu od naszych wyników, obniżenie po stosowaniu CsA ekspresji na powierzchni limfocytów LFA-1, ale nie CD54 (75). Różne były jednak dawki i czas podawania CsA.

Kolejnym pytaniem dotyczącym mechanizmu obserwowanych zmian było że zahamowanie procesu syntezy DNA i mitozy nie jest sprzężone z ograniczonym procesem migracji. Wiadomo bowiem, iż CsA hamują mitozę limfocytów (50) oraz limfocyty w stadium S zmieniają swój schemat migracji i zatrzymują się głównie w węzłach krezkowych i tkance chłonnej jelita (76). CsA hamuje niektóre transkrypcyjne czynniki jądrowe jak np

NFAT (Nuclear factor of activated T cells) (39). TDL inkubowane z mitomycyna (M-TDL) zachowywały się bardzo podobnie do CsA-TDL wykazując zarówno ograniczoną migrację do alloprzeszczepu jak i obniżoną zdolność do gromadzenia się w tkance chłonnej. Znikały prawie całkowicie z krwi, ich poziomy były bardzo niskie w węzłach i jelicie, natomiast wysokie w śledzionie. TDL podawane w naszych doświadczeniach zawierały znikomy procent pobudzonych komórek. Antymitotyczny efekt zarówno CsA jak i mitomycyny nie mógł byćdecydujący. Niemniej jednak zaistniało ogromne podobieństwo zachowań obydwu populacji, CsA-TDL i M-TDL. Można sądzić, iż obydwie leki hamują ekspresje podobnych grup molekuł regulujących proces adhezji i wynaczynienia, który ulega aktywizacji w pobudzonych alloantygenowa populacjach.

Ostatnim pytaniem dotyczącym mechanizmu zmian migracji CsA-TDL było czy mogło w nim odgrywać rolę antymetaboliczne działanie CsA. Wiadomo, iż CsA ma wpływ na energetyczne procesy komórki. CsA hamuje procesy mitochondrialne, głównie syntezę ATP w sytuacjach nadmiernego gromadzenia się Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej (49). Obniża ona mitochondrialny współczynnik oddechowy w sposób dawko-zależny (77). CsA ma wpływ hamujący na przepustowe kanały o wysokiej zdolności transportowej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (78). Zastosowany w pracy azydek sodu, z którym inkubowano TDL (SA-TDL), hamuje wewnątrzkomórkowe procesy fosforylacji. Nie miał on żadnego wpływu na gromadzenie się SA TDL w alloprzeszczepie serca, różniąc się w tym całkowicie od CsA-TDL. SA-TDL migrowały u zwierząt z allogenicznym przeszczepem głównie do narządów i tkanek limfatycznych i w sposób ograniczony do śledziony. Ten obraz migracji można tłumaczyć następująco. Pomimo zahamowania procesów energetycznych istniejący układ receptorowy S.A.-TDL pozostał niezmienny i był taki sam jak w kontrolnych TDL, co pozwalało na zatrzymanie SA-TDL w przeszczepie w stężeniu jak normalnych TDL. Wyższe gromadzenie w tkankach limfatycznych mogło wynikać z

dłuższego czasu przechodzenia przez te tkanki. Nie można wykluczyć wypłukania azydku z komórek w ciągu 24 godzinnej obserwacji. Pośrednio obserwacje z tej grupy doświadczeń wskazują, iż samo hamowanie metabolizmu limfocytu ma niewielki wpływ na jego specyficzną migrację *in vivo*.

5. WNIOSKI

1. Cyklosporyna A ma bezpośredni i wybiórczy wpływ na krążące limfocyty T ograniczając ich gromadzenie się w alloprzeszczepie.
2. Cyklosporyna A ma wyraźny wpływ na ogólnoustrojowy proces migracji i dystrybucji krążących limfocytów T, różny w zależności od rozwijającej się w ustroju reakcji allogenicznej lub syngenicznej.
3. Cyklosporyna A nie wpływa na spontaniczną ruchliwość limfocytów T *in vitro*.
4. Obniżona ekspresja na limfocytach L-selektyny wywołana przez cyklosporynę A może być częściowo odpowiedzialna za ograniczoną migrację.
5. Pośrednio można wnioskować, iż hamowanie syntezy DNA przez cyklosporynę A może być sprzężone z ograniczeniem procesu migracji, natomiast hamowanie procesów metabolicznych ma niespecyficzny wpływ na migrację i dystrybucję limfocytów.

7. STRESZCZENIE

Zagadnienie migracji komórek odpornościowych w ustroju jest w dalszym ciągu niedoceniane z punktu widzenia praktyki leczniczej. Komórki te wędrując i przekazując informację od miejsca wniknięcia obcego antygeny do narządów limfatycznych, a następnie z powrotem do miejsca gdzie znajduje się obcy antygen, aby go eliminować, upodabiają układ odpornościowy do układu nerwowego, jego aferentnych i eferentnych dróg przewodzenia bodźców. Migracja komórek odpornościowych to nie tylko ich przybycie do miejsca zapalenia lub alloprzeszczepu, to także umiejscowienie ich w stosunku do innych komórek odpornościowych np. w węzle chłonnym (kooperacja komórkowa), także zatrzymywanie się w odpowiednim środowisku dla uzyskania informacji i "edukacji" (grasica), to również droga i tempo przenoszenia obcego antygeny do narządów limfatycznych.

Proces migracji limfocytów odgrywa podstawową rolę w odrzucaniu alloprzeszczepu. Alloprzeszczep narządowy (serca, nerek, wątroby) ulega zniszczeniu przez komórki odpornościowe biorcy, głównie przez naciekające limfocyty, a w dalszych etapach przez makrofagi, granulocyty, tuczne i komórki plazmatyczne. Aczkolwiek proces rozpoznawania alloantygenów na powierzchni komórek śródbłonkowych przeszczepu jest natychmiastowy, zarówno przez receptorowy układ MHC przepływających monocytów i limfocytów, oraz wypływające z przeszczepu do śledziony i węzłów chłonnych biorcy komórki pasażerowe, to wytworzenie się u biorcy dawco-specyficznego cytotoksycznego klonu trwa kilka dni. Pobudzenie i proliferacja populacji limfocytów skierowanych przeciw alloantygenom mają miejsce w narządach limfatycznych takich jak śledziona i węzły chłonne. Tam następuje proces bezpośredniej, a głównie pośredniej prezentacji antygeny przez komórki biorcy i dawcy (APC) limfocytom biorcy. Z tych narządów dawco-specyficzne limfocyty biorcy

muszą przedostać się do krążenia, rozpoznać alloantygeny przeszczepu, ulec przyleganiu do powierzchni śródbłonna przeszczepu, a następnie przejść do przestrzeni pozanaczyniowej (proces wynaczyniania). Farmakologiczne środki immunosupresyjne jak Cyklosporyna A (CsA), Takrolimus (FK506), Rapamycyna, Deoksypergualina wpływają na wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnału i w efekcie hamują syntezę niektórych interleukin, np. IL2, niezbędnej dla pobudzenia limfocytów. Być może leki te mają także ograniczony wpływ na metabolizm limfocytów.

Powstaje takie pytanie, czy wymienione środki immunosupresyjne mogą mieć wpływ na ruchliwość i migrację limfocytów. Wskazywać na to mogliby mniejsze nacieki komórkowe w alloprzeszczepach u biorców w czasie stosowania środków immunosupresyjnych. Ograniczenie migracji dotyczyłyby zarówno limfocytów znajdujących się w narządach limfatycznych (zahamowanie mobilizacji z węzłów i śledziony) jak i w przeszczepie (przyleganie i wynaczynianie). Własne badania pilotowe wykazały, iż limfocyty biorcy alloprzeszczepu serca poddane działaniu CsA wykazują ograniczoną tendencję do gromadzenia się w przeszczepie w porównaniu z limfocytami nie będącymi pod wpływem CsA. Co więcej limfocyty poddane działaniu CsA, podlegały innej ogólnoustrojowej dystrybucji niż limfocyty nie traktowane.

Poznanie mechanizmu ograniczonej migracji limfocytów pod wpływem środków immunosupresyjnych pozwoliłoby, poza wyjaśnieniem istoty tego procesu, na poszukiwanie leków, które w wybiórczy sposób hamowałyby migrację, a nie wpływały na ograniczenie syntezy cytokin i metabolizm komórki. Stosowanie takich leków synergicznych z istniejącymi środkami immunosupresyjnymi pozwoliłoby zmniejszyć dawki a razem z tym efekty uboczne i powikłania obecnie stosowanej immunosupresji.

Celem mojej pracy doktorskiej było uzyskanie odpowiedzi na pytania:

- 1) czy CsA ma bezpośredni wpływ na limfocyty ograniczając ich gromadzenie się w alloprzeszczepie;
- 2) czy CsA ma wpływ na ogólnoustrojową recyrkulację i dystrybucję krążących limfocytów, a jeśli tak to czy jest to wynikiem
 - a) zmniejszonej mobilizacji z narządów limfatycznych,
 - b) zmniejszonej spontanicznej ruchliwości,
 - c) obniżeniem ekspresji powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych na limfocytach, stąd możliwości ograniczonego przylegania do śródbłonna i wynaczyniania?
- 3) Czy zahamowanie procesów metabolicznych i mitozy, na które ma wpływ CsA, mogą ograniczać gromadzenie się limfocytów w alloprzeszczepie?

Jako model migracji limfocytów *in vivo* służył dożylny przeszczep limfocytów uzyskanych z chłonki przewodu piersiowego (TDL) od szczurów otrzymujących CsA (CsA-TDL) lub kontrolnych (NaCl-TDL). Limfocyty znakowano izotopem ^{51}Cr , a następnie wstrzykiwano zawiesinę $2-3 \times 10^7$ komórek w 1 ml PBS syngenicznemu biorcy dożylnie przez cewnik założony do żyły udowej. Po 24 godzinach od podania znakowanych komórek zabijano szczury przecięciem rdzenia, a następnie pobierano do uprzednio zważonych próbek tkanek: przeszczepu serca i skóry, płuc, wątroby, śledziony, węzłów chłonnych krezkowych i obwodowych, jelita cienkiego, szpiku kości udowej i skóry. Oznaczano radioaktywność materiału przy użyciu licznika promieniowania γ Gamma 5500b (Beckman). Uzyskane wyniki przedstawiano jako procent podanej radioaktywności mierzonej na 1 gram tkanki.

Przeprowadzono badania dystrybucji CsA-TDL i NaCl-TDL w ustroju biorcy z allo- i syngenicznym heterotopowym przeszczepem serca i skóry. Porównano wyniki tych badań z dystrybucją w ustroju syngenicznego biorcy bez przeszczepu (sham-operation), oraz z dystrybucją TDL, poddanych działaniu mitomycyny i azydku sodu. Przeprowadzono badania

migracji *in vitro* limfocytów, pochodzących z krwi obwodowej, śledziony, węzłów krezkowych chłonnych i szpiku kostnego pobranych od szczurów który otrzymowali CsA i 0.9% NaCl. Zbadano ekspresję cząsteczek adhezyjnych i fenotyp jednojądrzastych komórek chłonki, krwi, węzłów krezkowych chłonnych i śledziony pobranych od szczurów które otrzymowały CsA i 0.9% NaCl.

Wykazano, że limfocyty ogólnoustrojowej puli krążącej (limfocyty z przewodu piersiowego, thoracic duct lymphocytes-TDL) znajdujące się przez okres 7 dni pod farmakologicznym wpływem CsA (CsA-TDL) mniej migrują do alloprzeszczepu serca. Obniżenie poziomu gromadzenia się CsA-TDL osiągnęło wartości gromadzenia się normalnych limfocytów w przeszczepie syngenicznym. Zauważono również, iż CsA-TDL mają mniejszą tendencję do gromadzenia się w przeszczepie syngenicznym, aczkolwiek zjawisko to nie było statystycznie znamienne.

Inną tkanką allogeniczną przeszczepianą w identycznym protokole jak przeszczep serca była skóra. Nie stwierdzono, w porównaniu z przeszczepem serca, mniejszego gromadzenia się CsA-TDL w allogenicznym przeszczepie skórnym, ale był to wynik oczekiwany. Z metodycznego punktu widzenia wartości radioaktywności w małych przeszczepionych fragmentach skóry były niskie, stąd mogły zacierać się różnice z kontrolami. Z biologicznego punktu widzenia żaden z farmakologicznych środków immunosupresyjnych stosowanych po przeszczepach narządowych nie jest skuteczny w hamowaniu procesu odrzucania allogenicznego przeszczepu skóry. Środki te w minimalnym stopniu hamują chemoatrakcję komórek odpornościowych do zapalnych ognisk skóry.

Niezależnie od obserwacji dotyczących migracji CsA-TDL do alloprzeszczepów, nieoczekiwanie zauważono, iż CsA ma wpływ na ogólnoustrojowy proces migracji i dystrybucji krążącej puli limfocytów. Wpływ ten dodatkowo nakładał się na zmieniony proces migracji limfocytów wywołany zarówno allogenicznym przeszczepem serca jak i

skóry. I tak, CsA-TDL podane normalnemu syngenicznemu szczurowi w grupie sham-operation (nacięcie powłok bez przeszczepu) pozostawały we krwi na podobnym poziomie jak NaCl-TDL (kontrolne), natomiast miały wyraźną tendencję w porównaniu do NaCl do gromadzenia się w tkankach limfoidalnych poza śledzioną. Nie udało się rozstrzygnąć na obecnym etapie pracy czy mamy tu do czynienia ze zwiększonym zatrzymywaniem CsA-TDL w tkance limfatycznej, co ma np miejsce przy uszkodzeniu błony komórkowej, apoptozie, zahamowaniu ekspresji receptorów niezbędnych do migracji przez substancję międzykomórkową, czy też z wolniejszym przechodzeniem CsA-TDL przez zorganizowaną tkankę limfatyczną wskutek upośledzenia wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych limfocytu przez CsA.

Wykonany syngeniczny przeszczep serca nie powodował większych zmian w dystrybucji CsA-TDL w porównaniu z grupą sham-operation, z wyjątkiem nieco większego gromadzenia się limfocytów w węzłach chłonnych krezkowych. Ten efekt mógł być częściowo tłumaczony urazem węzłów krezki przy heterotopowym przeszczepianiu serca do naczyń brzusznych.

Natomiast allogeniczny przeszczep serca powodował zatrzymanie CsA-TDL we krwi i ich zmniejszone gromadzenie się w tkankach limfoidalnych włącznie ze śledzioną. Był to efekt prawie odwrotny od obserwowanego po przeszczepie syngenicznym.

Uogólniając uzyskane obserwacje należy stwierdzić, iż CsA miała wpływ na TDL a) u zwierząt normalnych i po sham-operation oraz u otrzymujących przeszczep syngeniczny kierujący je do gromadzenia się w narządach i tkankach limfatycznych, b) u zwierząt otrzymujących przeszczep allogeniczny do zatrzymywania ich we krwi a nie w narządach limfatycznych. Należy tu dodać dla jasności zagadnienia, iż NaCl-TDL podawane biorcom allogenicznego przeszczepu gromadziły się w tkankach limfatycznych.

Podobny do obserwowanego po przeszczepieniu serca kierunek zmian w ogólnoustrojowej dystrybucji krążących limfocytów obserwowano po przeszczepieniu skóry.

Mniejsze gromadzenie się CsA-TDL w alloprzeszczepie i narządach i tkankach limfatycznych biorcy może świadczyć o upośledzeniu ich zdolności rozpoznawania nie tylko aktywowanych komórek alloprzeszczepu ale i własnych aktywowanych strukturalnych komórek zorganizowanej tkanki chłonnej. Tak więc byłby to proces niespecyficzny ograniczony do odśrodkowej (eferentnej) fazy reakcji allogenicznej. CsA-TDL w ich subpopulacji specyficznie cytotoksycznej nie rozpoznawałyby docelowych komórek przeszczepu. Nie rozpoznawałyby też, lub miały ograniczoną aktywność we współdziałaniu z aktywowanymi przez alloantygeny własnymi (syngenicznymi) komórkami dendrytycznymi i limfocytami węzłów chłonnych i tkanki chłonnej jelita.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzam że:

1. Cyklosporyna A ma bezpośredni i wybiórczy wpływ na krążące limfocyty T ograniczając ich gromadzenie się w alloprzeszczepie.
2. Cyklosporyna A ma wyraźny wpływ na ogólnoustrojowy proces migracji i dystrybucji krążących limfocytów T, różny w zależności od rozwijającej się w ustroju reakcji allogenicznej lub syngenicznej.
3. Cyklosporyna A nie wpływa na spontaniczną ruchliwość limfocytów T *in vitro*.
4. Obniżona ekspresja na limfocytach L-selektyny wywołana przez cyklosporynę A może być częściowo odpowiedzialna za ograniczoną migrację.
5. Pośrednio można wnioskować, iż hamowanie syntezy DNA przez cyklosporynę A może być sprzężone z ograniczeniem procesu migracji, natomiast hamowanie procesów metabolicznych ma niespecyficzny wpływ na migrację i dystrybucję limfocytów.

PIŚMIENICTWO

1. Ryffel B. (1989): Pharmacology of cyclosporine. *Pharmacological Reviews* 41, 407-434
2. Adams D.H., Wang L.F., Neuberger J.M et al. (1990): Inhibition of leukocyte chemotaxis by immunosuppressive agents. *Transplantation* 50, 845-950
3. Didlake R., Grogan J. (1991): Effect of FK506 on rat leukocyte chemotaxis. *Transplant. Proc.* 23, 2959-2960
4. Baumann G. (1992): Molecular mechanism of immunosuppressive agents. *Transplant. Proc.* 24, 4-7
5. Hailer N.P., Blaheta R.A., S.Harder et al. (1994): In vitro studies on immunosuppression with verapamil. *Zentralbl-Chir.* 119, 347-354
6. Kosugi A., Sharrow S., Scheerer G.M. (1989): Effect of cyclosporin A on lymphopoiesis. *J Immunol.* 142, 3026-3032
7. Zheng B., Shorthouse R., Masek M.A. et al. (1991): Effects of the new and highly active immunosuppressant, rapamycin, on lymphoid tissue and cells in vivo. *Transplant. Proc.* 23, 851-855
8. Erlanger B.F. (1992): Do we know the site of action of cyclosporin? *Immunology Today.* 13, 487-490
9. McFadden R.G., Fraher L.J. (1990): Inhibitors of membrane transmethylation reactions prevent the lymphocyte chemocinetic response. *Immunol. Lett.* 26, 211-215
10. Tanner M.K., Wellhausen S.R., Klein J.B. (1993): Flow cytometric analysis of altered mononuclear cell transmembrane potential induced by cyclosporin. *Cytometry.* 14, 59-69

11. Maksymowicz M., Olszewski W.L. Szczęsny G. (1994): Adoptively transferred lymphocytes from donor treated with cyclosporine reveal less prediction to migrate to allografts. *Transplant. Proc.* 26, 4119
12. Pabst R., Rothkotter HJ. (1997): Lymphocyte migration: an essential step in understanding the effects of vaccination. *Behring Institute Mitteilungen.* 98, 56-62
13. Goodnow C.C., Cyster J.G. (1997): Lymphocyte homing: the scent of a follicle. *Current Biology.* 7(4), R219-22
14. Vachula M., Van Epps D.E. (1992): In vitro models of lymphocyte transendothelial migration. *Invasion Metastasis.* 12, 66-81
15. Picker L.J. (1992): Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* 10 561-581
16. Dianzani U., Malavasi F. (1995): Lymphocyte adhesion to endothelium. *Critical Reviews in Immunology.* 15(2), 167-200
17. Ager A. (1997): Regulation of lymphocyte migration into lymph nodes by high endothelial venules. *Biochemical Society Transactions.* 25(2), 421-8
18. Binns R.M., Whyte A., Licence S.T. (1996): Constitutive and inflammatory lymphocyte trafficking. *Veterinary Immunology & Immunopathology.* 54(1-4), 97-104
19. Bradley L.M., Watson S.R. (1996): Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Current Opinion in Immunology.* 8(3), :312-20
20. Hauzenberger D., Klominek J., Bergstrom S.E. et al. (1995): T lymphocyte migration: the influence of interactions via adhesion molecules, the T cell receptor, and cytokines. *Critical Reviews in Immunology.* 15(3-4), 285-316
21. Shimizu Y., Newman W., Tanaka Y., Shaw S. (1992): Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today.* 13, 3,106-112

22. Dustin M.L., Springer T.A. (1991): Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev.* 9, 27-66
23. Springer T.A. (1990): Adhesion receptors in the immune system. *Nature.* 346, 425-434
24. Moser B., Loetscher M., Piali L. Et al. (1998): Lymphocyte responses to chemokines. *International Reviews of Immunology.* 16(3-4), 323-44
25. Mackay C.R., Imhof B. (1993): Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today.* 14, 3, 99-102
26. Mackay C. (1995): Lymphocyte migration. A new spin on lymphocyte homing. *Current Biology.* 5(7), 733-6
27. Girard J.P., Springer T.A. (1995): High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunology Today.* 16(9), 449-57
28. Adams D.H., Shaw S. (1994): Leucocyte-endothelium interactions and regulation of leucocyte migration. *The Lancet.* 343, 2, 831-836
29. Borel J.F. (1983): Cyclosporine: historical perspectives. *Transplant. Proc.* 15, 2219-2229.
30. Kahan B.D. (1986): Prologue: of Hardangervidda, tolypocladium, trolls, Askelad, and cyclosporine. *Transplant. Proc.* 18, (6 Suppl 5), 3-5
31. Shaw L.M. (1987): Critical issues in cyclosporine monitoring: report of the taskforce on cyclosporine monitoring. *Clin.Chem.* 33, 1269-1288
32. Gerber D.A., Bonham C.A., Thomson A.W. (1998): Immunosuppressive agents: recent developments in molecular action and clinical application. *Transplant. Proc.* 30, 1573-1579
33. Schmid C., Heemann U., Azuma H., Tilney N.L. (1995): Rapamycin inhibits transplant vasculopathy in long-surviving rat heart allografts. *Transplantation.* 15; 60(7), 729-33

34. Lemström K.B., Räisänen-Sokolowski A.K., Häyry P.J., Koskinen P.K. (1996): Triple drug immunosuppression significantly reduces aortic allograft arteriosclerosis in the rat. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 4, 553-64
35. Koskinen PK; Lemström KB; Häyry PJ How cyclosporine modifies histological and molecular events in the vascular wall during chronic rejection of rat cardiac allografts. *Am J Pathol*, 146: 4, 1995 Apr, 972-80
36. Gallego M.J., Zoja C., Morigi M. et al. (1996): Cyclosporine enhances leukocyte adhesion to vascular endothelium under physiologic flow conditions. *American Journal of Kidney Diseases.* 28(1), 23-31
37. Hare G.M., Mackinnon S.E., Midha R. et al. (1996): Cyclosporine A inhibits lymphocyte migration into ovine peripheral nerve allografts. *Microsurgery.* 17(12), 697-705
38. Nogueira de Francischi J., Conroy D.M., Maghni K., Sirois P. (1993): Inhibition by rapamycin of leukocyte migration and bronchial hyperreactivity induced by injection of Sephadex beads to guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology.* 110(4), 1381-6
39. Williams C.M., Smith L., Flanagan B.F. et al. (1997): Tumour necrosis factor-alpha expression and cell recruitment in Sephadex particle-induced lung inflammation: effects of dexamethasone and cyclosporin A. *British Journal of Pharmacology.* 122(6), 1127-34
40. Lord R., Goto S., Vari F. et al. (1997): Differences in the rate of donor leucocyte migration between natural and drug-assisted tolerance following rat liver transplantation. *Clinical & Experimental Immunology.* 108(2), 358-65
41. Asako H., Kubes P., Baethge B.A. et al. (1992): Reduction of Leukocyte Adherence and Emigration by Cyclosporine and L683,590 (FK506) in Postcapillary Venules. *Transplantation.* 54, 4 686-690

42. Molossi S., Clausell N., Sett S., Rabinovitch M. (1995): ICAM-1 and VCAM-1 expression in accelerated cardiac allograft arteriopathy and myocardial rejection are influenced differently by cyclosporine A and tumour necrosis factor-alpha blockade. *Journal of Pathology*. 176(2), 175-82
43. Cockerill G.W., Bert A.G., Ryan G.R. et al. (1995): Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT. *Blood*, 86: 7, 2689-98
44. Frishberg Y., Meyers C.M., Kelly C.J. (1996): Cyclosporine A regulates T cell-epithelial cell adhesion by altering LFA-1 and ICAM-1 expression. *Kidney International*. 50(1), 45-53
45. De Caterina R., Tanaka H., Nakagawa T. Et al. (1995): The direct effect of injectable cyclosporine and its vehicle, cremophor, on endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression. Ricinoleic acid inhibits coronary artery endothelial activation. *Transplantation*, 60: 3, 270-5
46. Kaldjian E.P., Stoolman L.M. (1995): Regulation of L-selectin mRNA in Jurkat cells. Opposing influences of calcium- and protein kinase C- dependent signaling pathways. *J Immunol*. 154: 9, 4351-62
47. Tanner M.K., Wellhausen S.R., Klein J.B. (1993): Flow Cytometric Analysis of Altered Mononuclear Cell Transmembrane Potential Induced by Cyclosporin. *Cytometry*. 14. 1 59-69
48. Karlsson H., DePierre J.W., Nassberger L. (1997): Energy levels in resting and mitogen-stimulated human lymphocytes during treatment with FK506 or cyclosporin A in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1319(2-3), 301-10
49. Simon N., Albengres E., Barre J. et al. (1997): [Value of protecting mitochondrial functions during treatment with cyclosporin A]. *Therapie*. 52(2), 151-4,

50. Yang J.J., Finn W.F. (1998): Effect of oxypurinol on cyclosporine toxicity in cultured EA, LLC-PK1 and MDCK cells. *Renal Failure*. 20(1), 85-101
51. Halestrap A.P., Connern C.P., Griffiths E.J. et al (1997): Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 174(1-2), 167-72
52. Wood P.G., Gillespie J.I. (1998): Evidence for mitochondrial Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in permeabilised endothelial cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 246(2), 543-8
53. Madesh M., Balasubramanian K.A. (1998): Cyclosporin A inhibits oxidant and calcium stimulated phospholipase D activity in the rat intestinal mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1389(3), 206-12
54. Ono K., Lindsey E.S. (1969): Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac. Card. Surg.* 57, 225.
55. Glenn W.W.L., Gresson S.L., Bauer F.X. et al. (1949): Experimental thoracic duct. *Surg. Gynecol. Obstet.* 89, 200
56. Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L. (1975): Chemotaxis under agarose. A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *J. Immunol.* 115, 1650
57. Zinkernagel R.M., Ehl S., Aichele P. et al. (1997): Antigen localisation regulates immune responses in a disease- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity *Immunological Reviews* 156, 199-209
58. Ford W.L. (1975): Lymphocyte migration and immune responses. *Prog. Allergy*. 19, 1-59

59. Tew J.G., Kosco M.H., Burton G.F. et al. (1990): Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 117, 185-212
60. Frey J.R., Wenk P. (1997): Experimental studies on the pathogenesis on contact eczema in the guinea pig. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 11, 81-94
61. Bachmann M.F., Kündig T.M., Odermatt B. et al. (1994): Free recirculation of memory B cells versus antigen-dependent differentiation to antibody-forming cells. *J. Immunol.* 153, 3386-3397
62. Barker C.F., Billingham R.E. (1997) The role of regional lymphatics in the skin homograft response. *Transplantation.* 5, 962-974
63. Issekutz T.B. (1989): Effects of anti-inflammatory agents on lymphocyte migration stimulated by the interferons, tumor necrosis factor and cutaneous inflammation. *Int. J. Immunopharmacol.* 11(7), 725-32
64. Issekutz T.B. (1992): Inhibition of lymphocyte endothelial adhesion and in vivo lymphocyte migration to cutaneous inflammation by TA-3, a new monoclonal antibody to rat LFA-1. *J. of Immunol.* 149, 10, 3394-3402
65. Dausset J., Rapaport F.T. (1996): The fundamental role of human leukocyte antigen (HLA) in transplantation. In: *Transplantation biology: cellular and molecular aspects.* By Tilney N.L., Strom T.B., Paul L.C. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia 1996. 307-310
66. Ali A.T.M.M., Morlej J., Rumjanek V.M. (1982): Cyclosporin-A inhibits accumulation of lymphocytes within lymph nodes. *Immunology.* 47, 345-349
67. Nemlander A., Soots A., Von Willebrand E., et al. (1982): Redistribution of renal allograft-responding leukocytes during rejection. II. Kinetics and specificity. *J. Exp. Med.* 156, 1087-1100

68. Springer T.A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76, 301-14
69. Ross J.S., Bacpon K.B., Camp R.D. (1990): Potent and selective inhibition of in vitro lymphocyte migration by cyclosporine and dexamethasone. *Immunopharmacol-Immunotoxicol.* 12(3), 439-55
70. Teofoli P., Mancini A., Lotti T. (1996): Cyclosporine A inhibits tPA mRNA transcription in A431 cell line. *Skin Pharmacology*. 9(2), 137-40
71. Mackay C.R. (1993): Homing of naive, memory and effector lymphocytes *Current Opinion in Immunology*. 5, 423-427
72. Picker L.J. (1992): Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 561-581
73. Goldberg E.D. (1991): [Effect of cyclosporine on the lymphoid organs of CBA mice]. *Antibiot.-Khimioter.* 36(10), 33-35
74. Heeg K., Bendigs S., Wagner H. (1989): Cyclosporine A prevents the generation of single positive (Lyt2⁺ L3T4⁻, Lyt2-L3T4⁺) mature T cells, but not single positive (Lyt2⁺ T3⁻) immature thymocytes, in newborn mice. *Scand. J. Immunol.* 30(6), 703-710
75. Poritz L.S., Olt G.J., Ruggiero F.M. et al. (1998): Increased LFA-1 expression in intestines of rats with GVHD after small bowel transplantation. *Digestive Diseases & Sciences*. 43(2), 221-8
76. Parrott D.M.V., Ferguson A. (1974): Selektive migration of lymphocytes within the mouse small intestine *Immunology* 26, 571
77. Zini R., Simon N., Morin C. et al. (1996): Inhibition of rat cerebral mitochondrial respiration by cyclosporins A, D, and G and restoration with trimetazidine. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie Iii, Sciences de la Vie*. 319(12), 1087-92

78. Bernardi P. (1996): The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1275(1-2), 5-9

Tab. 1. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 1), 0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 1a) i bez leków (grupa 1b) u syngenicznego biorcy z **allogenicznym** przeszczepem serca.

| Grupy | Serce | | Krew | | Płuca | Śledziona | Wątroba | Węzły chłonne | | Szpik kostny | Jelito | Skóra |
|----------------|------------|--------|---------|--------|-------|-----------|---------|---------------|----------|--------------|--------|-------|
| | przeszczep | własne | komórki | osocze | | | | kręzkowe | obwodowe | | | |
| 1. | 0,346 | 0,125 | 0,831 | 0,158 | 1,892 | 24,565 | 3,311 | 14,739 | 4,815 | 0,456 | 0,409 | 0,056 |
| | ±0,09 | ±0,08 | ±0,89 | ±0,23 | ±1,30 | ±7,10 | ±1,48 | ±15,75 | ±5,30 | ±0,21 | ±0,29 | ±0,05 |
| 1a. | 0,860 | 0,108 | 0,733 | 0,112 | 1,799 | 26,553 | 2,934 | 29,620 | 10,591 | 0,582 | 0,695 | 0,061 |
| | ±0,50 | ±0,06 | ±0,90 | ±0,05 | ±0,49 | ±10,80 | ±0,99 | ±14,57 | ±5,49 | ±0,53 | ±0,29 | ±0,05 |
| 1b. | 0,943 | 0,188 | 1,793 | 0,116 | 1,672 | 23,958 | 2,788 | 26,016 | 10,188 | 0,461 | 0,725 | 0,044 |
| | ±0,73 | ±0,18 | ±1,66 | ±0,06 | ±0,41 | ±7,88 | ±1,44 | ±6,06 | ±2,10 | ±0,15 | ±0,36 | ±0,04 |
| P< | | | | | | | | | | | | |
| 1 vs 1a | 0,01 | NS | NS | NS | NS | NS | NS | 0,04 | 0,03 | NS | 0,03 | NS |
| 1 vs 1b | 0,05 | NS | 0,02 | NS | NS | NS | NS | 0,05 | 0,01 | NS | 0,05 | NS |

Tab. 2. Dystrybuca TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 2), 0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 2a) i bez leków (grupa 2b) u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca.

| Grupa | Serce | | Krew | | Płuca | Śledziona | Wątroba | Węzły chłonne | | Szpik kostny | Jelito | Skóra |
|----------------|------------|--------|---------|--------|-------|-----------|---------|---------------|--------|--------------|--------|-------|
| | przeszczep | własne | komórki | osocze | | | | kręzkowe | obwod | | | |
| 2. | 0,181 | 0,064 | 0,260 | 0,131 | 2,516 | 33,598 | 3,445 | 55,939 | 13,530 | 0,411 | 0,780 | 0,03 |
| | ±0,08 | ±0,04 | ±0,19 | ±0,12 | ±2,88 | ±9,80 | ±2,52 | ±13,44 | ±4,46 | ±0,11 | ±0,48 | ±0,03 |
| 2a. | 0,170 | 0,096 | 0,496 | 0,091 | 2,157 | 20,580 | 3,751 | 19,834 | 7,651 | 0,498 | 0,355 | 0,038 |
| | ±0,10 | ±0,10 | ±0,54 | ±0,03 | ±1,61 | ±9,91 | ±1,45 | ±16,47 | ±6,13 | ±0,212 | ±0,21 | ±0,04 |
| 2b. | 0,292 | 0,279 | 1,622 | 0,101 | 1,959 | 31,536 | 2,638 | 29,966 | 5,858 | 0,509 | 0,420 | 0,044 |
| | ±0,19 | ±0,30 | ±1,53 | ±0,10 | ±0,58 | ±8,46 | ±1,46 | ±22,57 | ±2,85 | ±0,10 | ±0,19 | ±0,07 |
| P< | | | | | | | | | | | | |
| 2 vs 2a | NS | NS | NS | NS | NS | 0,02 | NS | 0,002 | 0,05 | NS | 0,04 | NS |
| 2 vs 2b | NS | 0,04 | 0,04 | NS | NS | NS | NS | 0,02 | 0,02 | 0,05 | 0,03 | NS |

Tab. 3. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 3), 0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 3a) i bez leków (grupa 3b) u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry

| Grupy | Przeszczep skóry | Krew | | Płuca | Śledziona | Wątroba | Węzły chłonne | | Szpik kostny | Jelito | Skóra |
|----------------|------------------|---------|--------|-------|-----------|---------|---------------|----------|--------------|--------|--------|
| | | komórki | osocze | | | | kręzkowe | obwodowe | | | |
| 3. | 0,08 | 0,416 | 0,138 | 2,032 | 38,294 | 1,760 | 17,934 | 5,901 | 0,435 | 0,497 | 0,025 |
| | ±0,02 | ±0,12 | ±0,03 | ±2,22 | ±13,44 | ±0,84 | ±11,80 | ±5,28 | ±0,14 | ±0,30 | ±0,01 |
| 3a. | 0,08 | 0,686 | 0,146 | 1,737 | 43,287 | 1,743 | 30,355 | 7,678 | 0,473 | 0,887 | 0,047 |
| | ±0,02 | ±0,12 | ±0,12 | ±0,82 | ±6,88 | ±0,49 | ±9,98 | ±3,27 | ±0,13 | ±0,35 | ±0,03 |
| 3b. | 0,092 | 3,877 | 0,069 | 1,893 | 54,551 | 2,297 | 32,829 | 10,517 | 0,395 | 1,034 | 0,038 |
| | ±0,03 | ±2,13 | ±0,01 | ±0,29 | ±10,38 | ±0,57 | ±4,01 | ±3,80 | ±0,06 | ±0,22 | ±0,005 |
| P< | | | | | | | | | | | |
| 3 vs 3a | NS | 0,01 | NS | NS | NS | NS | 0,04 | NS | NS | 0,03 | 0,05 |
| 3 vs 3b | NS | 0,005 | 0,001 | NS | 0,02 | NS | 0,01 | 0,05 | NS | 0,002 | 0,004 |

Tab. 4. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 4), 0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 4a) i bez leków (grupa 4b) u biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry.

| Grupy | Przeszczep skóry | Krew | | Płuca | Śledziona | Wątroba | Węzły chłonne | | Szpik kostny | Jelito | Skóra |
|----------------|---------------------|---------|--------|-------|-----------|---------|---------------|----------|-----------------|--------|-------|
| | | komórki | osocze | | | | kręzkowe | obwodowe | | | |
| 4. | 0,082 | 0,397 | 0,082 | 3,198 | 45,909 | 3,999 | 34,859 | 8,569 | 0,497 | 0,932 | 0,035 |
| | ±0,03 | ±0,35 | ±0,03 | ±3,93 | ±5,75 | ±1,93 | ±23,44 | ±3,71 | ±0,12 | ±0,62 | ±0,02 |
| 4a. | 0,121 | 1,44 | 0,210 | 2,623 | 64,904 | 4,277 | 14,432 | 4,142 | 0,774 | 0,372 | 0,046 |
| | ±0,06 | ±0,94 | ±0,29 | ±2,75 | ±23,64 | ±0,59 | ±14,33 | ±3,95 | ±0,76 | ±0,29 | ±0,02 |
| 4b. | 0,106 | 3,971 | 0,073 | 1,599 | 51,856 | 2,465 | 27,852 | 8,437 | 0,359 | 0,944 | 0,042 |
| | ±0,10 | ±2,16 | ±0,02 | ±0,30 | ±5,68 | ±0,87 | ±4,56 | ±2,63 | ±0,05 | ±0,45 | ±0,01 |
| P< | | | | | | | | | | | |
| 4 vs 4a | NS | 0,03 | NS | NS | 0.04 | NS | 0,05 | 0,03 | NS | 0,04 | NS |
| 4 vs 4b | NS | 0,001 | NS | NS | 0.05 | 0.05 | NS | NS | 0.01 | NS | NS |

Tab. 5. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA TDL) (grupa 5) i 0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 5a) u syngenicznego biorcy

po sham-operation.

| Grupy | Krew | | Płuca | Śledziona | Wątroba | Węzły chłonne | | Szpik kostny | Jelito | Skóra |
|---------|---------|--------|-------|-----------|---------|---------------|----------|--------------|--------|-------|
| | Komórki | Osocze | | | | kręzkowe | obwodowe | | | |
| 5 | 0,615 | 0,078 | 4,345 | 62,736 | 3,437 | 27,624 | 7,734 | 0,856 | 0,660 | 0,067 |
| | ±0,41 | ±0,02 | ±3,40 | ±12,49 | ±0,67 | ±8,57 | ±3,26 | ±0,69 | ±0,24 | ±0,05 |
| 5a | 1,594 | 0,092 | 2,947 | 72,401 | 3,994 | 11,897 | 4,314 | 0,426 | 0,327 | 0,037 |
| | ±1,36 | ±0,02 | ±1,06 | ±19,36 | ±0,58 | ±5,66 | ±1,56 | ±0,06 | ±0,10 | ±0,02 |
| P< | | | | | | | | | | |
| 5 vs 5a | NS | NS | NS | NS | NS | 0,002 | 0,03 | NS | 0,01 | NS |

Tab. 6. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA TDL) i 0.9% NaCl (NaCl-TDL) u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupy 1, 1a) i po sham-operation (grupy 5, 5a).

| Grupy | Krew | | Śledziona | Węzły chłonne | | Jelito |
|------------|---------|--------|-----------|---------------|----------|--------|
| | Komórki | Osocze | | kręzkowe | obwodowe | |
| 1. | 0,831 | 0,158 | 24,565 | 14,739 | 4,815 | 0,409 |
| | ±0,89 | ±0,23 | ±7,10 | ±15,75 | ±5,30 | ±0,29 |
| 1a. | 0,733 | 0,112 | 26,553 | 29,620 | 10,591 | 0,695 |
| | ±0,90 | ±0,05 | ±10,80 | ±14,57 | ±5,49 | ±0,29 |
| 5. | 0,615 | 0,078 | 62,736 | 27,624 | 7,734 | 0,660 |
| | ±0,41 | ±0,02 | ±12,49 | ±8,57 | ±3,26 | ±0,24 |
| 5a. | 1,594 | 0,092 | 72,401 | 11,897 | 4,314 | 0,327 |
| | ±1,36 | ±0,02 | ±19,36 | ±5,66 | ±1,56 | ±0,10 |

Tab. 7. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA TDL) i 0.9% NaCl (NaCl-TDL) u syngenicznego biorcy z syngenicznym przeszczepem serca (grupy 2, 2a) i po sham-operation (grupy 5, 5a).

| Grupy | Krew | | Śledziona | Węzły chłonne | | Jelito |
|-------|---------|--------|-----------|---------------|----------|--------|
| | Komórki | Osocze | | kręzkowe | obwodowe | |
| 2. | 0,260 | 0,131 | 33,598 | 55,939 | 13,530 | 0,780 |
| | ±0,19 | ±0,12 | ±9,80 | ±13,44 | ±4,46 | ±0,48 |
| 2a. | 0,496 | 0,091 | 20,580 | 19,834 | 7,651 | 0,355 |
| | ±0,54 | ±0,03 | ±9,91 | ±16,47 | ±6,13 | ±0,21 |
| 5. | 0,615 | 0,078 | 62,736 | 27,624 | 7,734 | 0,660 |
| | ±0,41 | ±0,02 | ±12,49 | ±8,57 | ±3,26 | ±0,24 |
| 5a. | 1,594 | 0,092 | 72,401 | 11,897 | 4,314 | 0,327 |
| | ±1,36 | ±0,02 | ±19,36 | ±5,66 | ±1,56 | ±0,10 |

Tab. 8. Badania migracji *in vitro* limfocytów pochodzących z krwi obwodowej, śledziony, węzłów krezkowych chłonnych i szpiku kostnego szczurów otrzymujących CsA (grupa 6) i 0.9% NaCl (grupa 6a) (pole migracji w mm²).

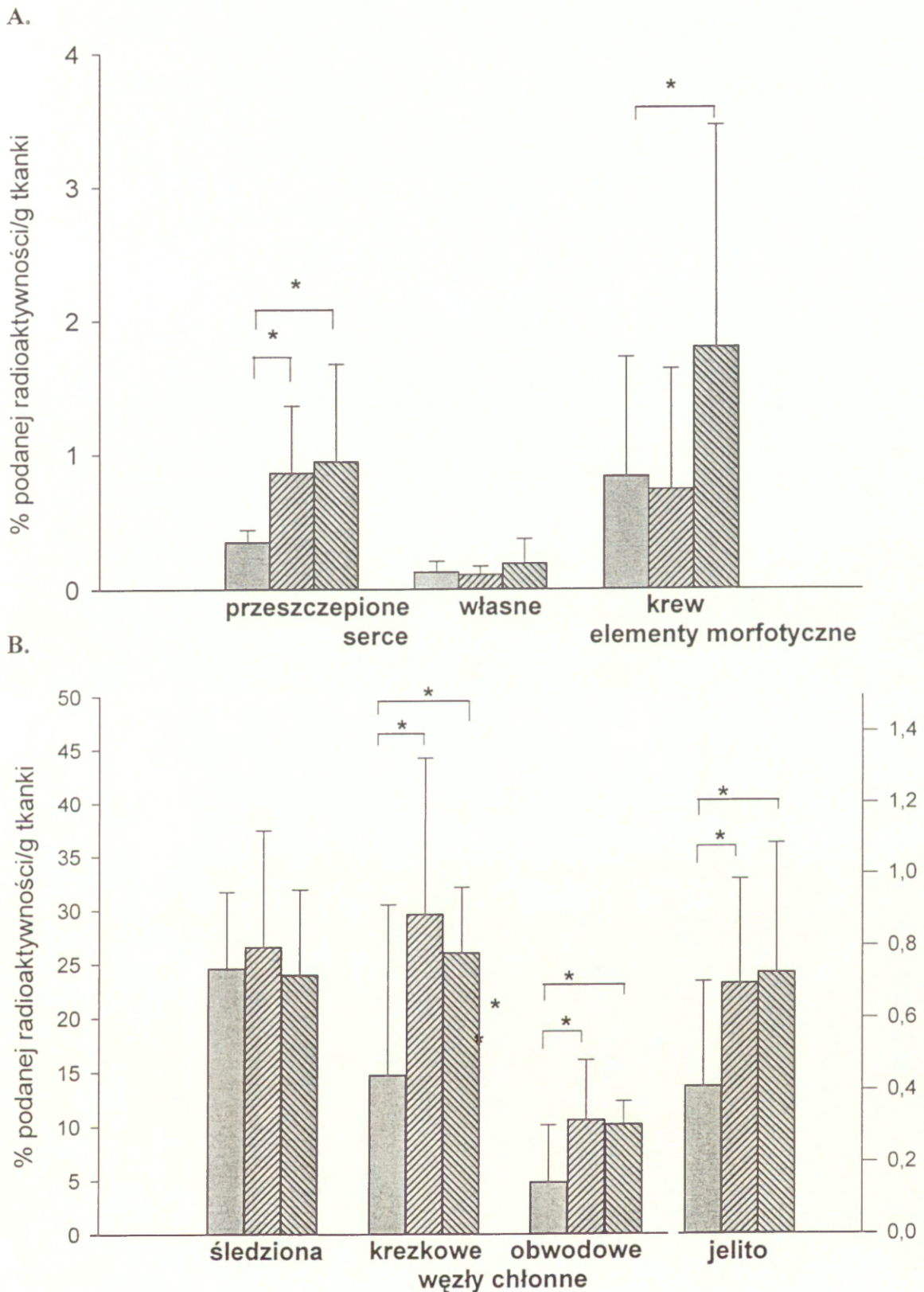
| | PBL | SpL | MLNL | BMC |
|--------------------------|------------|------------|-------------|------------|
| CsA 10 mg/kg x 7d | 241,1 | 672,0 | 763,0 | 763,0 |
| | ±68,6 | ±443,1 | ±455,9 | ±864,2 |
| 0.9% NaCl x 7d | 287,9 | 723,7 | 772,3 | 962,6 |
| | ±94,7 | ±441,3 | ±465,7 | ±1174,4 |
| P< | NS | NS | NS | NS |

Tab. 9. Ekspresja CD11a, CD18, CD54, CD62L, CD8, CD4 na powierzchni limfocytów chłonki przewodu piersiowego, krwi obwodowej, węzłów krezkowych chłonnych i śledziona od szczurów otrzymujących CsA (grupa 7) i 0.9% NaCl (grupa 7a).

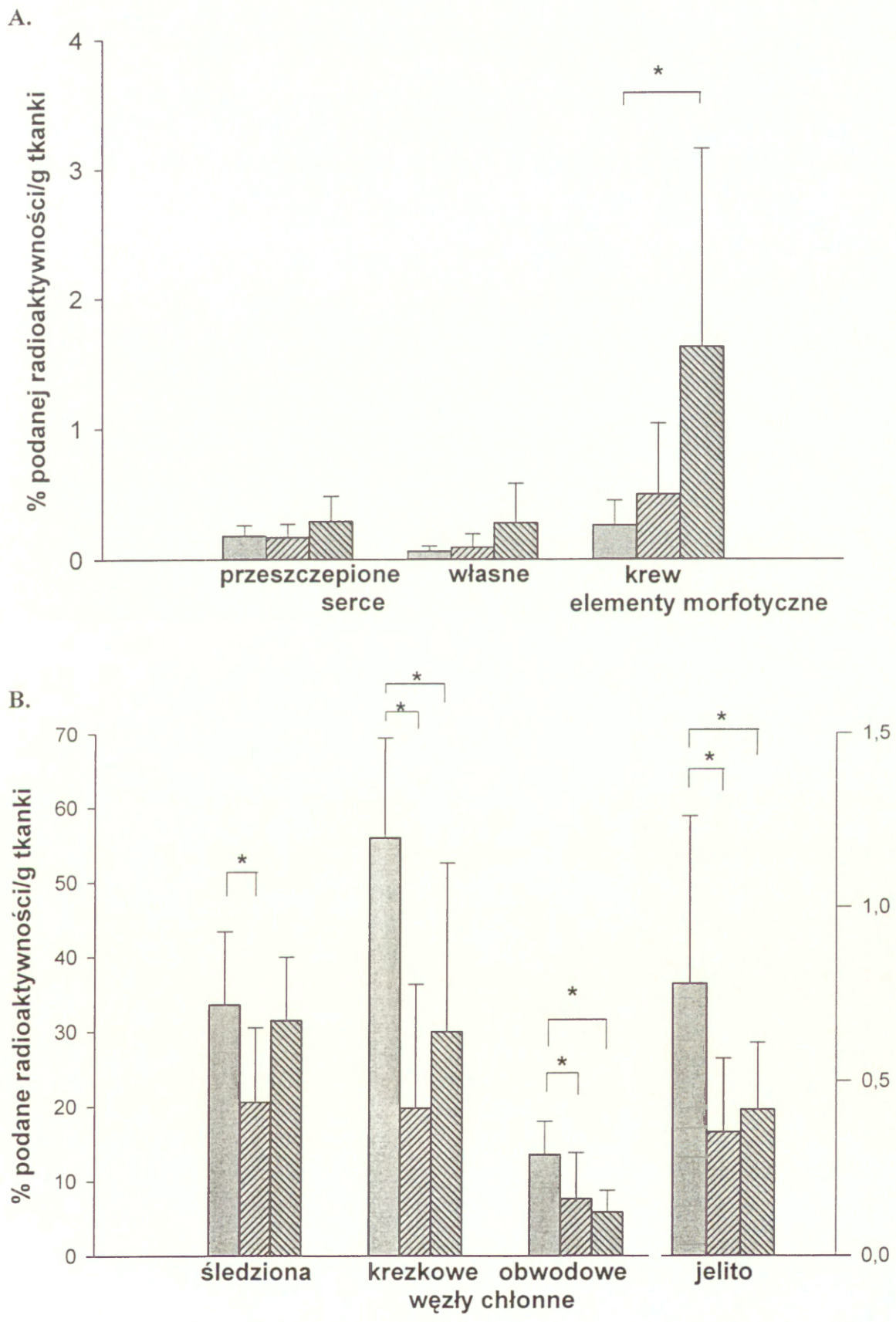
| | | CD11a | CD18 | CD44 | CD54 | CD62L | CD8 | CD4 |
|-------------------|------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|------------|
| TDL | CsA | 98,1±2,4 | 94,7±8,7 | 87,6±6,1 | 0,7±0,4 | 34,4±7,0 | 30,5±2,1 | 70,9±5,4 |
| | NaCl | 93,0±5,0 | 87,8±8,5 | 75,7±8,4 | 0,75±1,0 | 54,8±5,8 | 28,0±2,0 | 65,0±8,3 |
| PBL | CsA | 96,9±3,1 | 90,5±14,0 | 76,8±17,2 | 1,9±1,3 | 53,3±5,1 | 46,7±23,8 | 54,4±4,4 |
| | NaCl | 94,0±5,7 | 87,6±8,3 | 78,4±12,1 | 2,25±2,6 | 65,0±0,6 | 35,7±3,8 | 52,6±1,7 |
| MLNL | CsA | 97,7±0,4 | 96,4±3,1 | 82,5±5,5 | 1,2±0,7 | 41,9±10,5 | 29,1±1,0 | 53,9±1,0 |
| | NaCl | 98,3±0,8 | 95,6±3,8 | 82,9±5,5 | 0,8±1,0 | 56,0±8,3 | 28,0±4,6 | 54,8±3,6 |
| Splenocyty | CsA | 95,3±6,4 | 92,4±10,8 | 78,2±8,0 | 1,7±1,2 | 54,0±15,3 | 29,1±6,4 | 56,7±4,5 |
| | NaCl | 96,2±4,2 | 95,8±4,6 | 82,6±9,7 | 1,2±1,1 | 55,5±6,6 | 32,6±6,1 | 54,4±3,8 |

Tab. 10. Dystrybucja normalnych TDL inkubowanych z mitomycyną i azydkiem sodu u syngenicznego biorcy z **allogenicznym** przeszczepem serca.

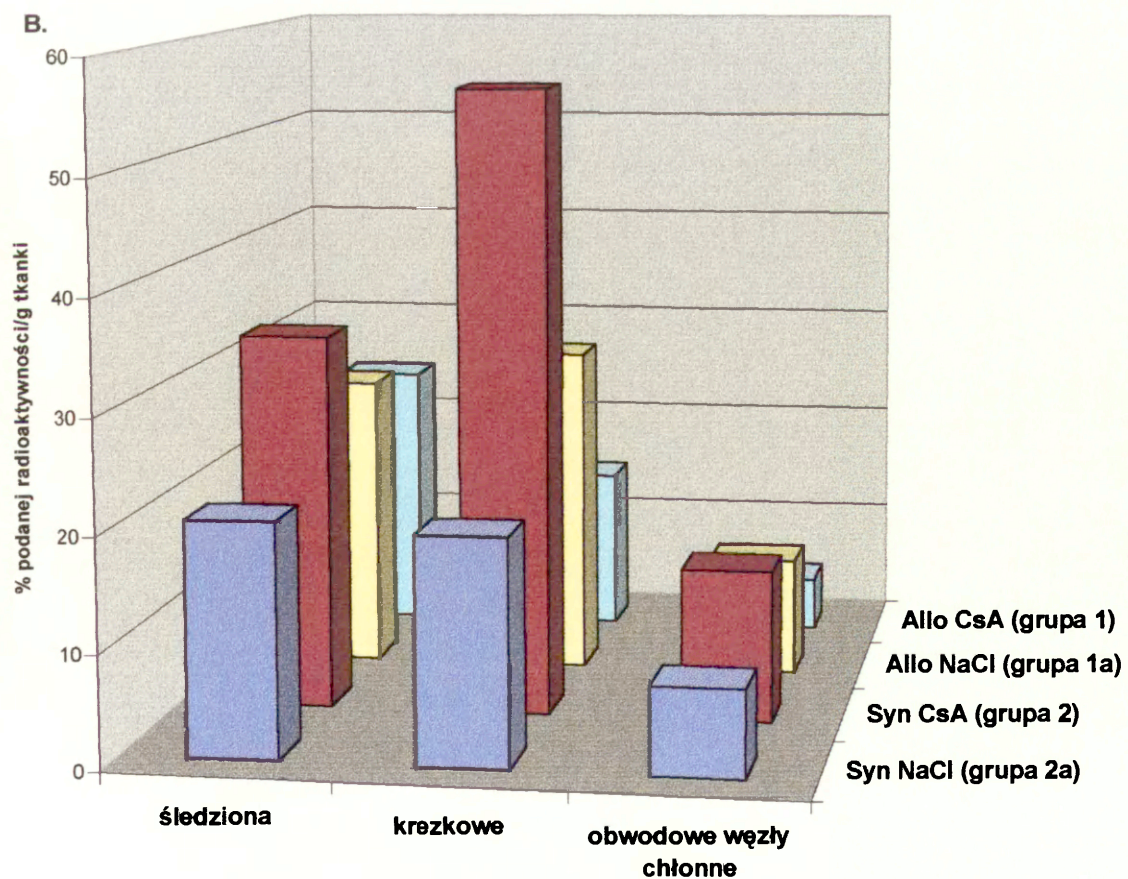
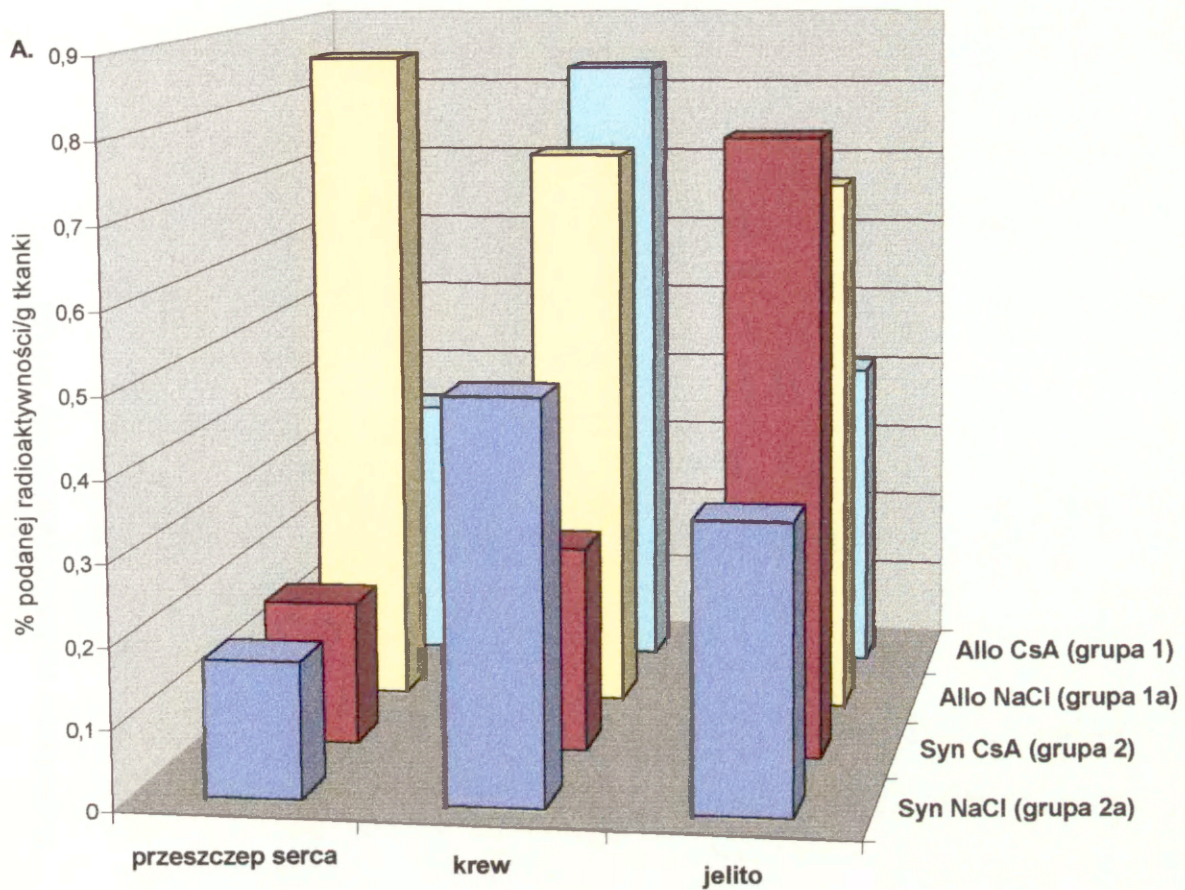
| | Serce | | Krew | | Płuca | Śledziona | Wątroba | Węzły chłonne | | Szpik kostny | Jelito | Skóra |
|--------------------|------------|--------|---------|--------|-------|-----------|---------|---------------|----------|--------------|--------|-------|
| | przeszczep | własne | komórki | osocze | | | | kręzkowe | obwodowe | | | |
| Mitomycyna | 0,202 | 0,036 | 0,073 | 0,235 | 0,302 | 42,080 | 3,068 | 8,479 | 3,061 | 0,612 | 0,285 | 0,021 |
| | ±0,20 | ±0,02 | ±0,08 | ±0,33 | ±0,26 | ±8,29 | ±0,60 | ±18,97 | ±7,24 | ±0,25 | ±0,12 | ±0,02 |
| Azydek sodu | 0,872 | 0,063 | 0,432 | 0,069 | 1,104 | 31,401 | 1,646 | 43,570 | 13,350 | 0,380 | 0,862 | 0,036 |
| | ±0,41 | ±0,02 | ±0,33 | ±0,02 | ±0,38 | ±12,82 | ±0,19 | ±13,17 | ±4,09 | ±0,06 | ±0,34 | ±0,04 |



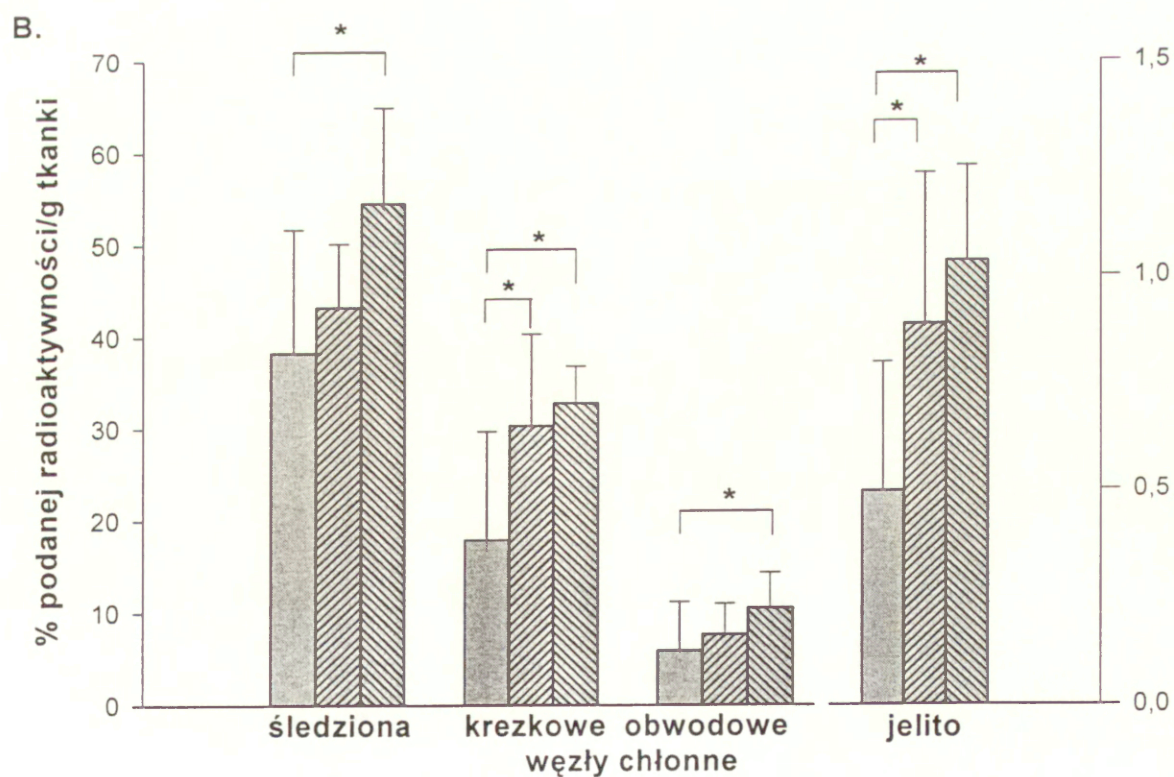
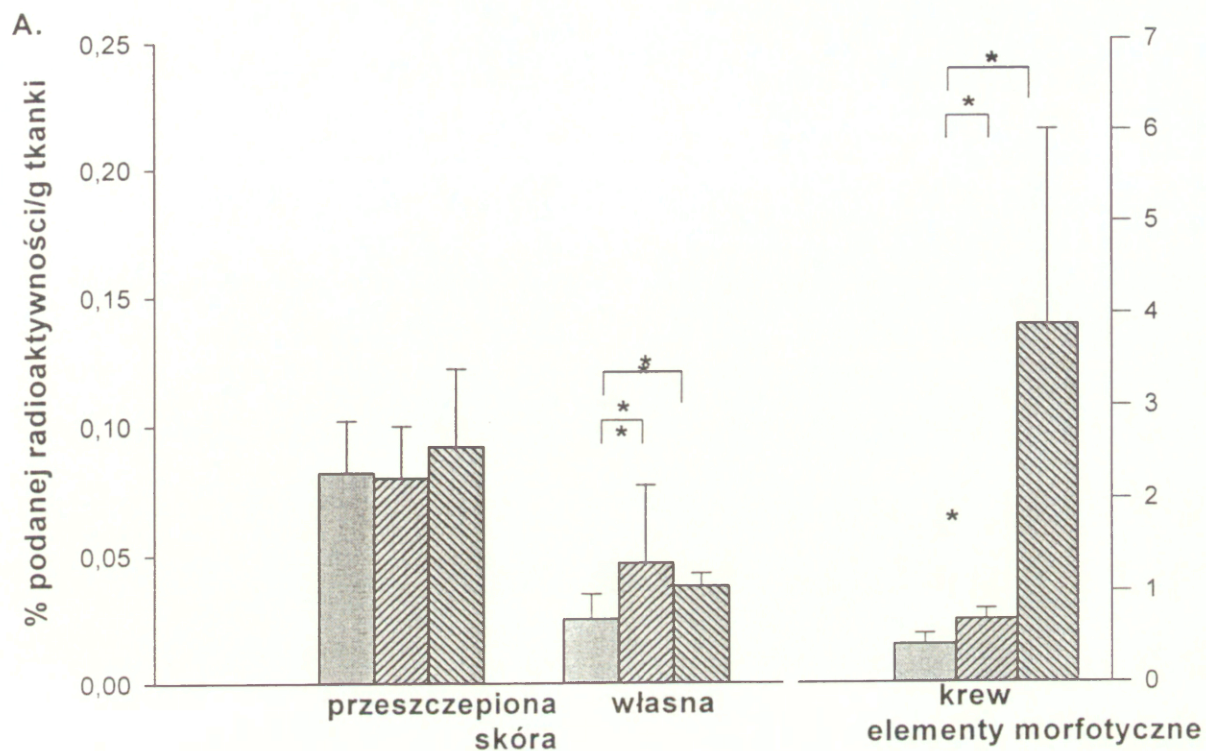
Rys. 6. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 1) , 0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 1a) i normalnego (grupa 1b) u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca w 24 godzinach po podaniu limfocytów (* $p < 0.05$).



Rys. 7. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 2) ,0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 2a) i normalnego (grupa 2b) u biorcy z syngenicznym przeszczepem serca w 24 godziny po podaniu limfocytów (* p<0.05).

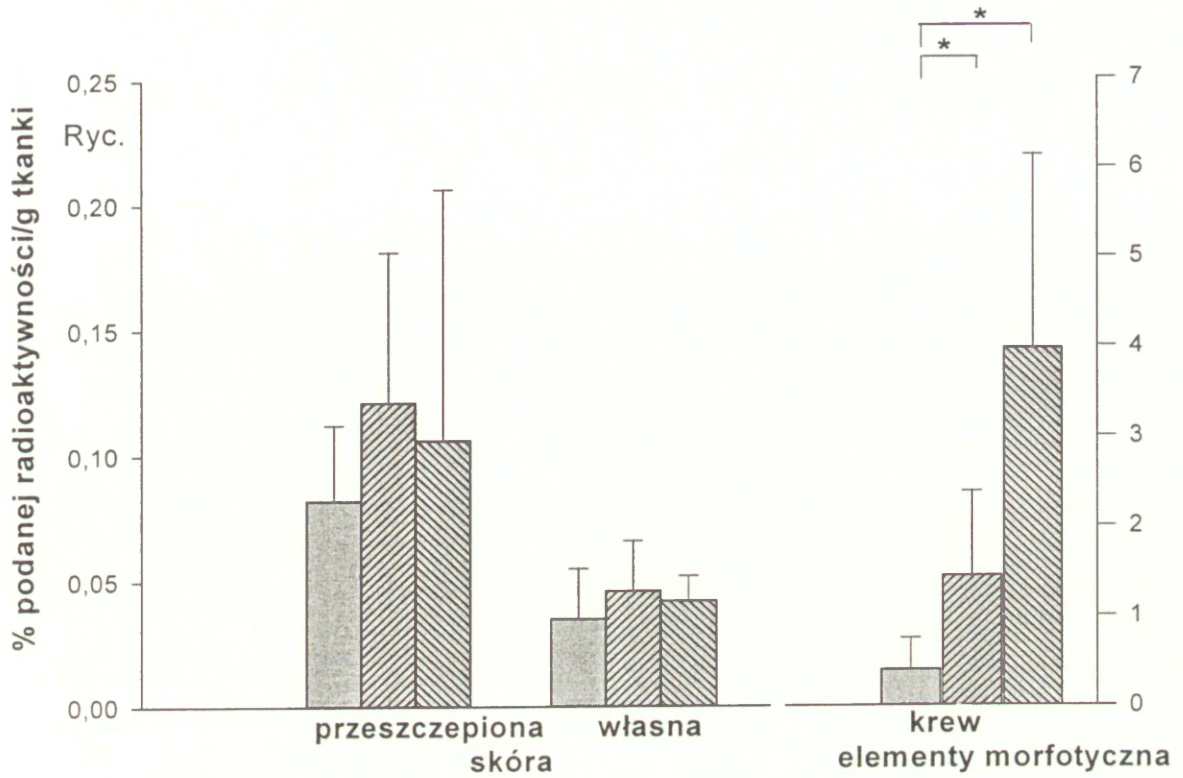


Rys. 8. Porównanie dystrybucji TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) i 0.9% NaCl (NaCl-TDL) u syngenicznego biorcy z allo- lub syngenicznym przeszczepem serca w 24 godziny po podaniu limfocytów.

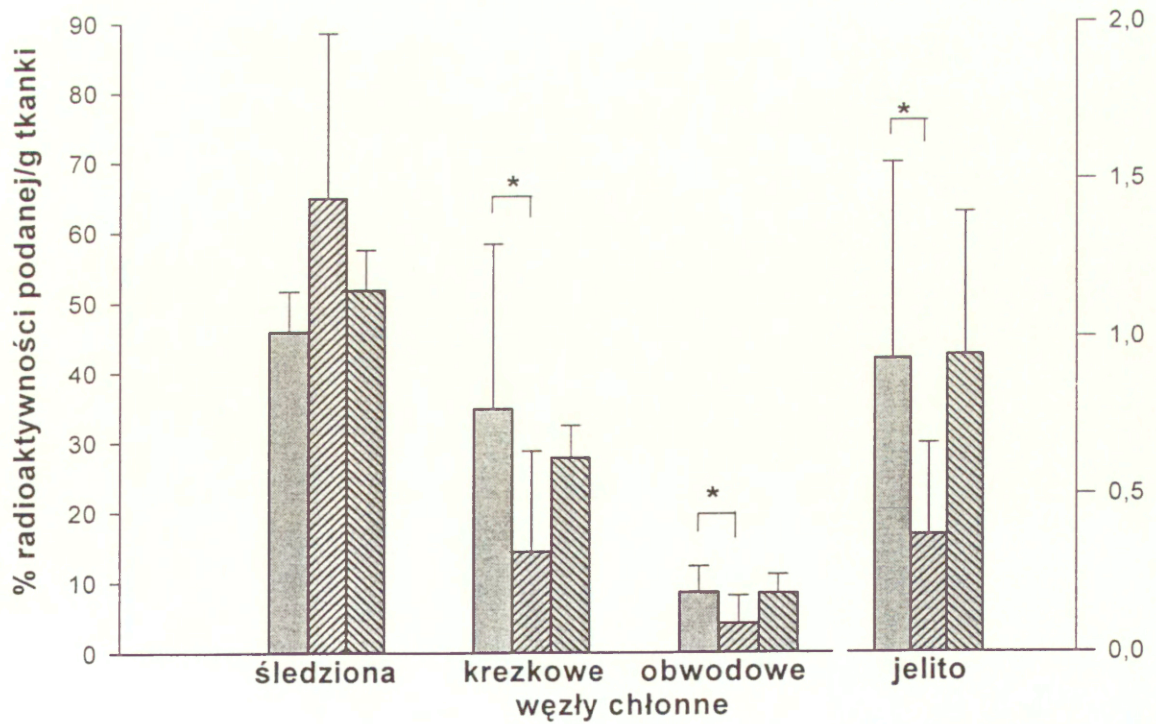


Rys. 9. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 3) , 0,9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 3a) , i normalnego (grupa 3b) u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem skóry w 24 godziny po podaniu limfocytów (* $p < 0.05$).

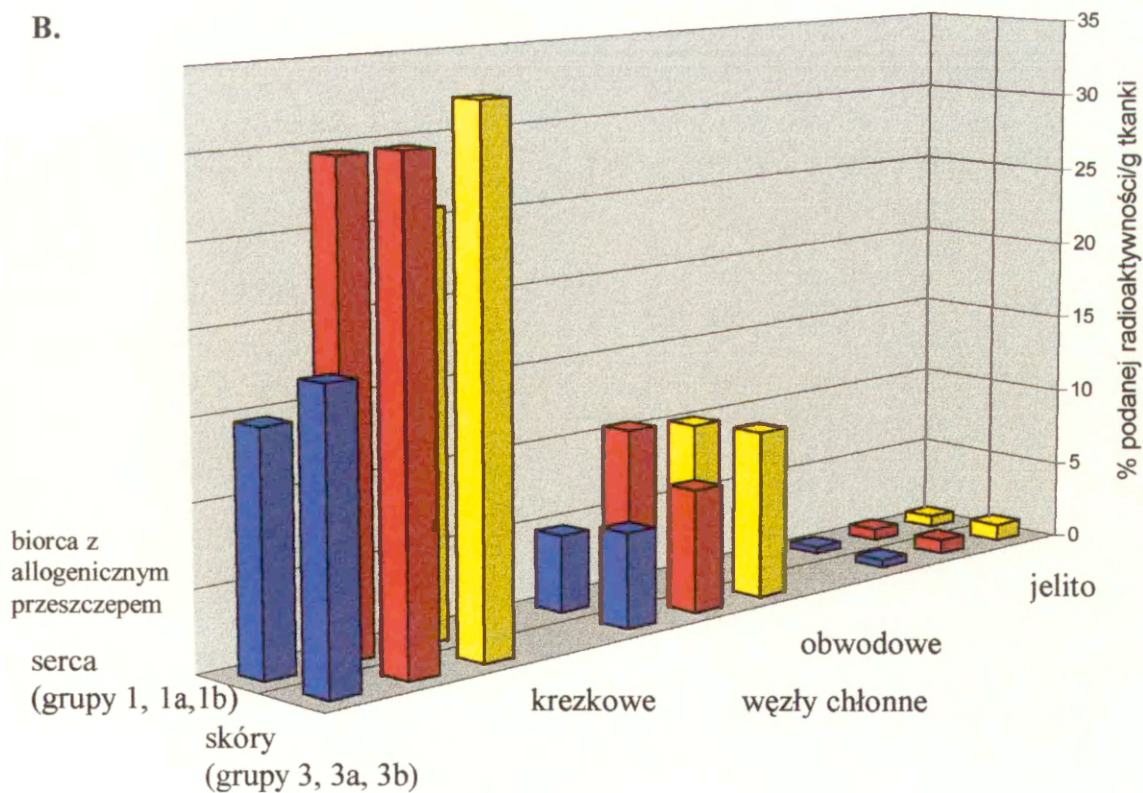
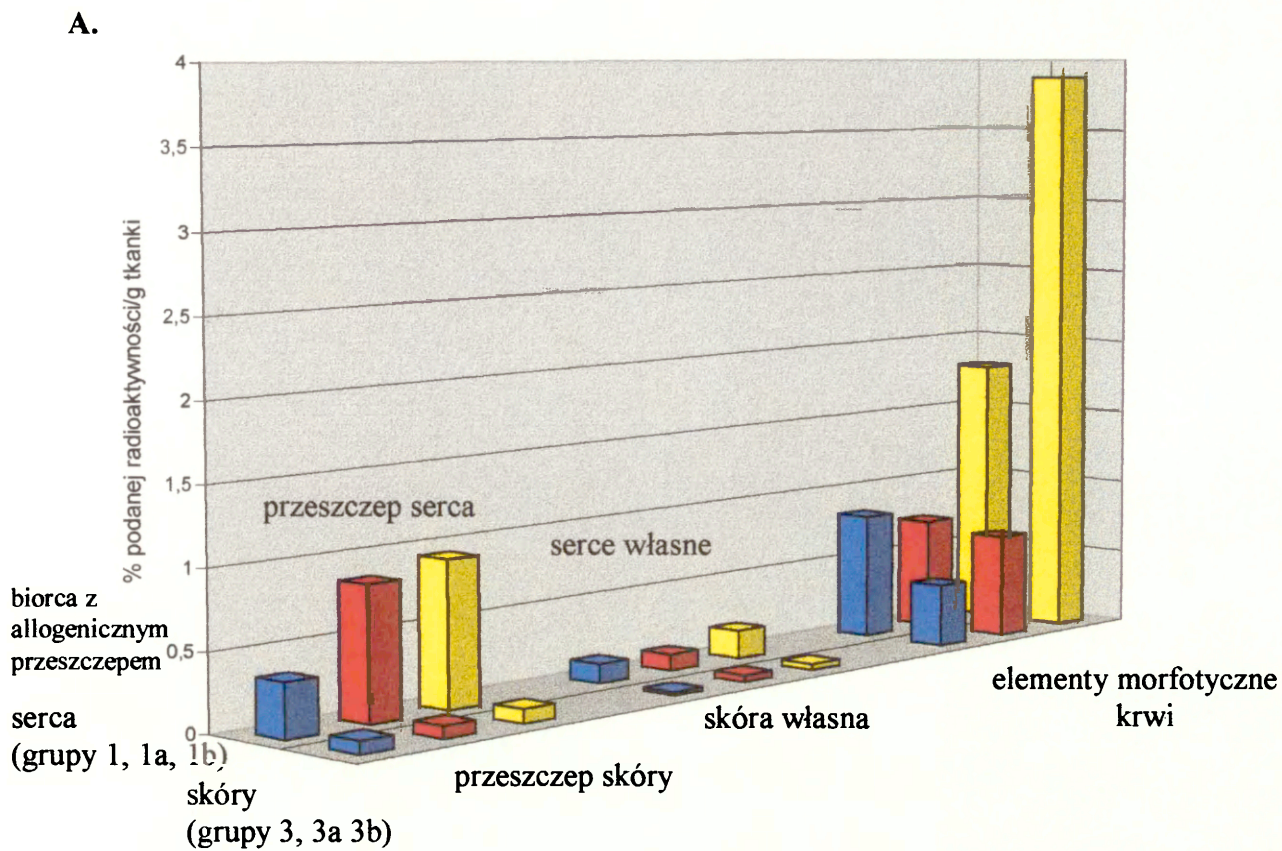
A.



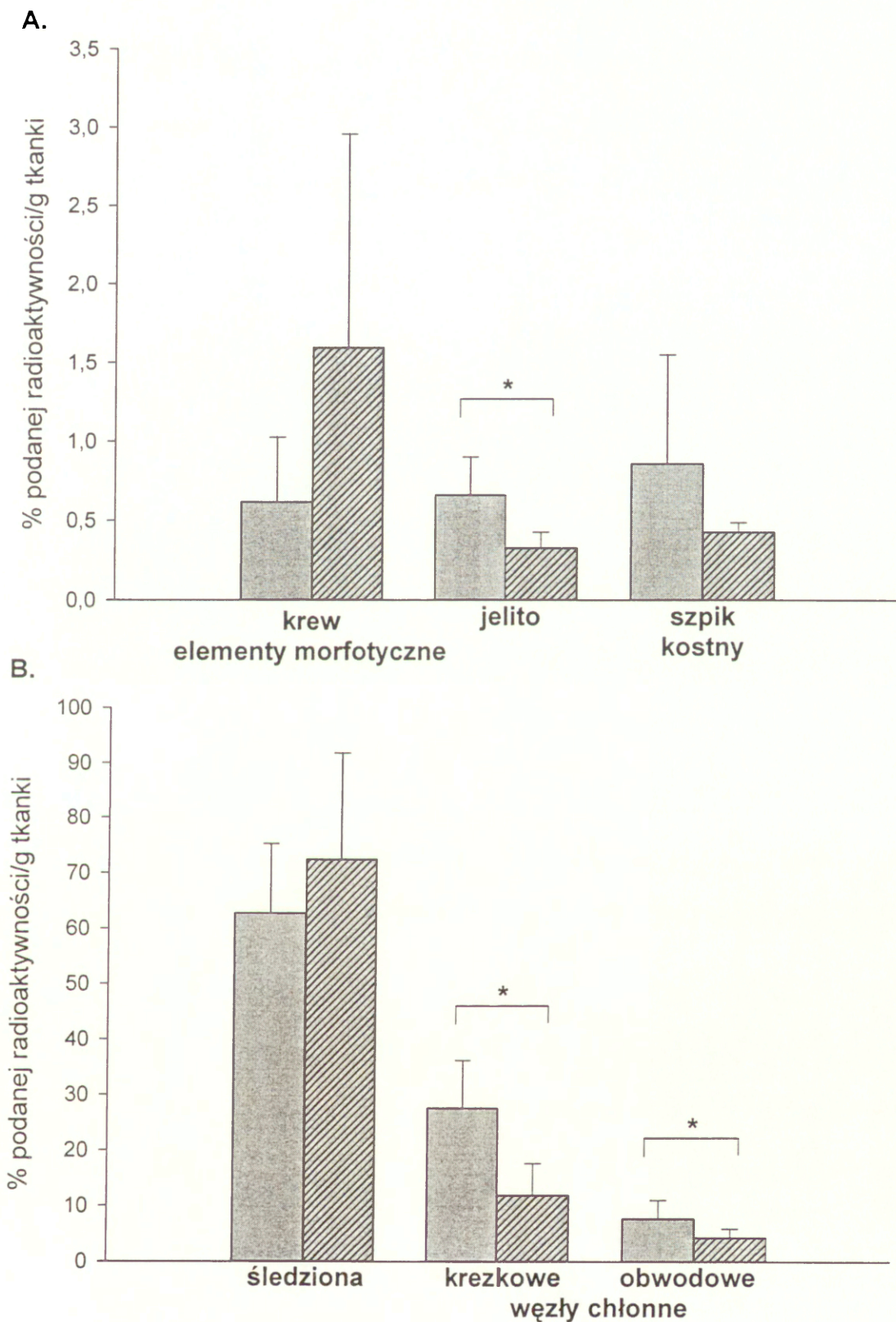
B.





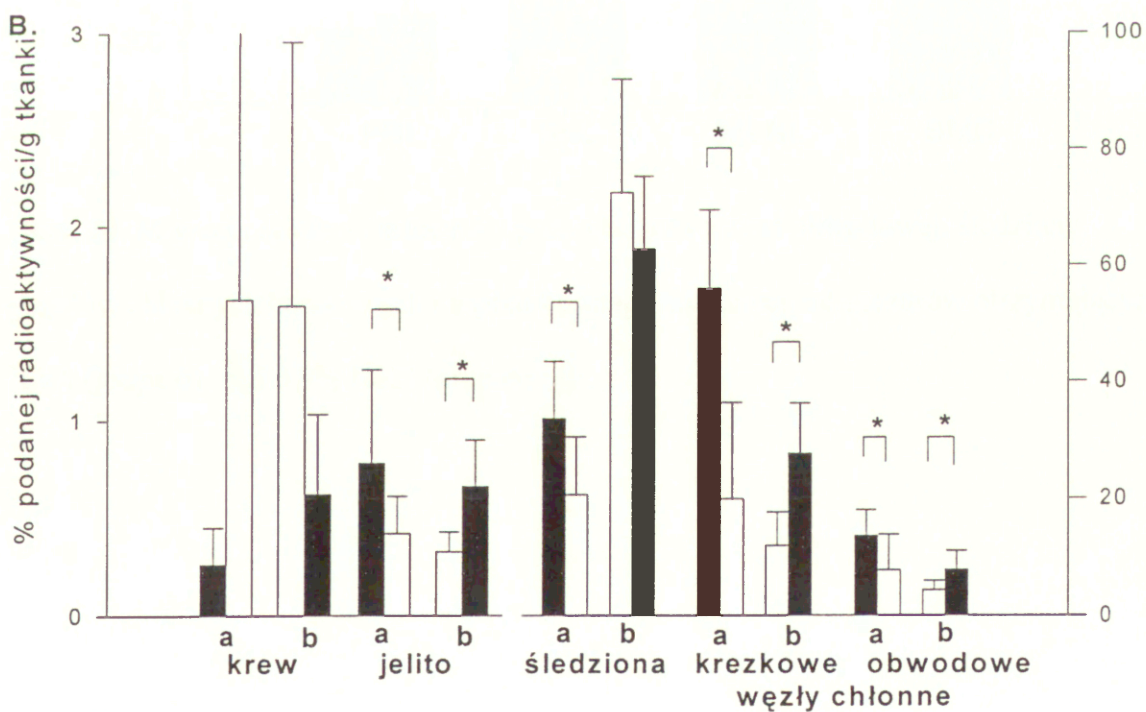
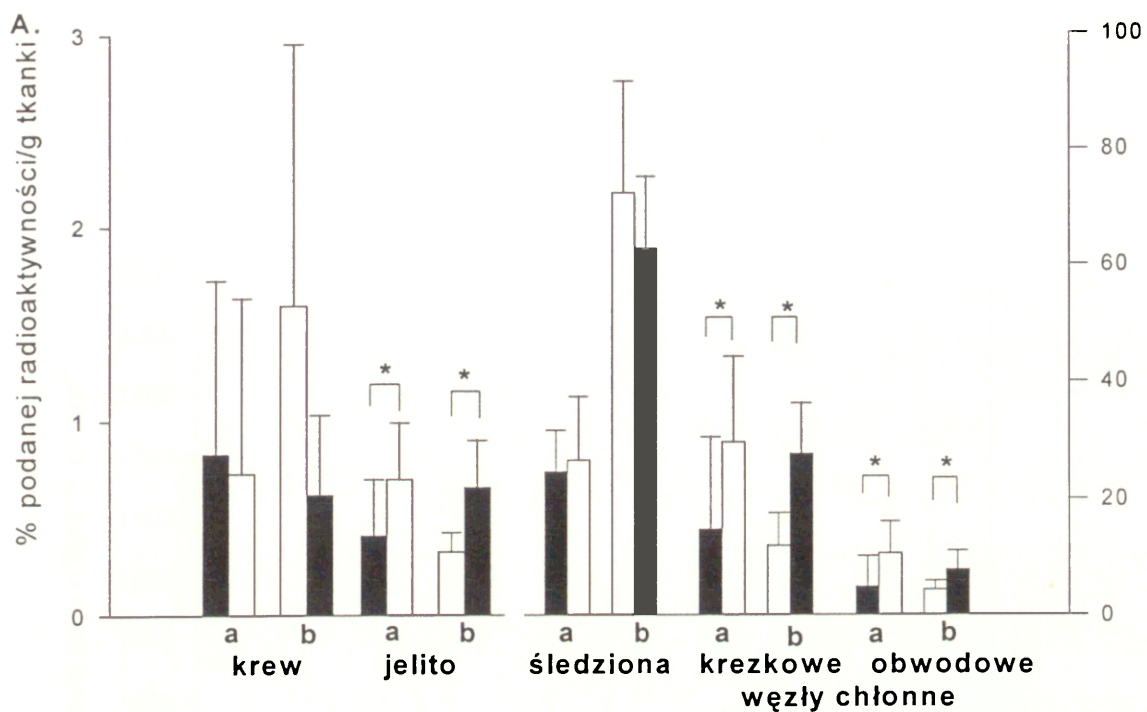
Rys. 10. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 4) , 0.9% NaCl (NaCl-TDL) (grupa 4a) i normalnego (grupa 4b) u biorcy z syngenicznym przeszczepem skóry w 24 godziny po podaniu limfocytów (* $p < 0.05$).



Rys. 11. Porównanie dystrybucji TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) ■, 0.9% NaCl (NaCl-TDL) ■ i normalnego ■ u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca i skóry w 24 godziny po podaniu limfocytów (grupy 1, 1a, 1b, 3, 3a, 3b).

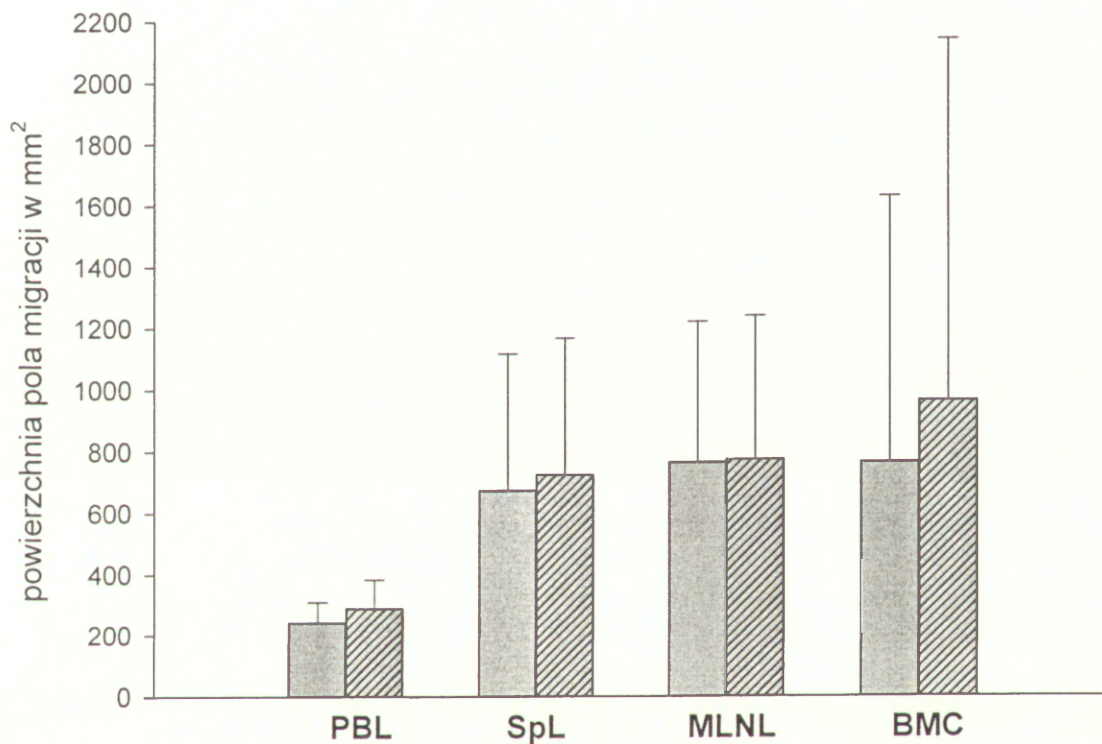




Rys. 12. Dystrybucja TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) grupa 5)  i 0.9% NaCl (NaCl-TDL0 (grupa 5a)  u syngenicznego biorcy po sham-operation w 24 godziny po podaniu limfocytów (* $p < 0.05$).

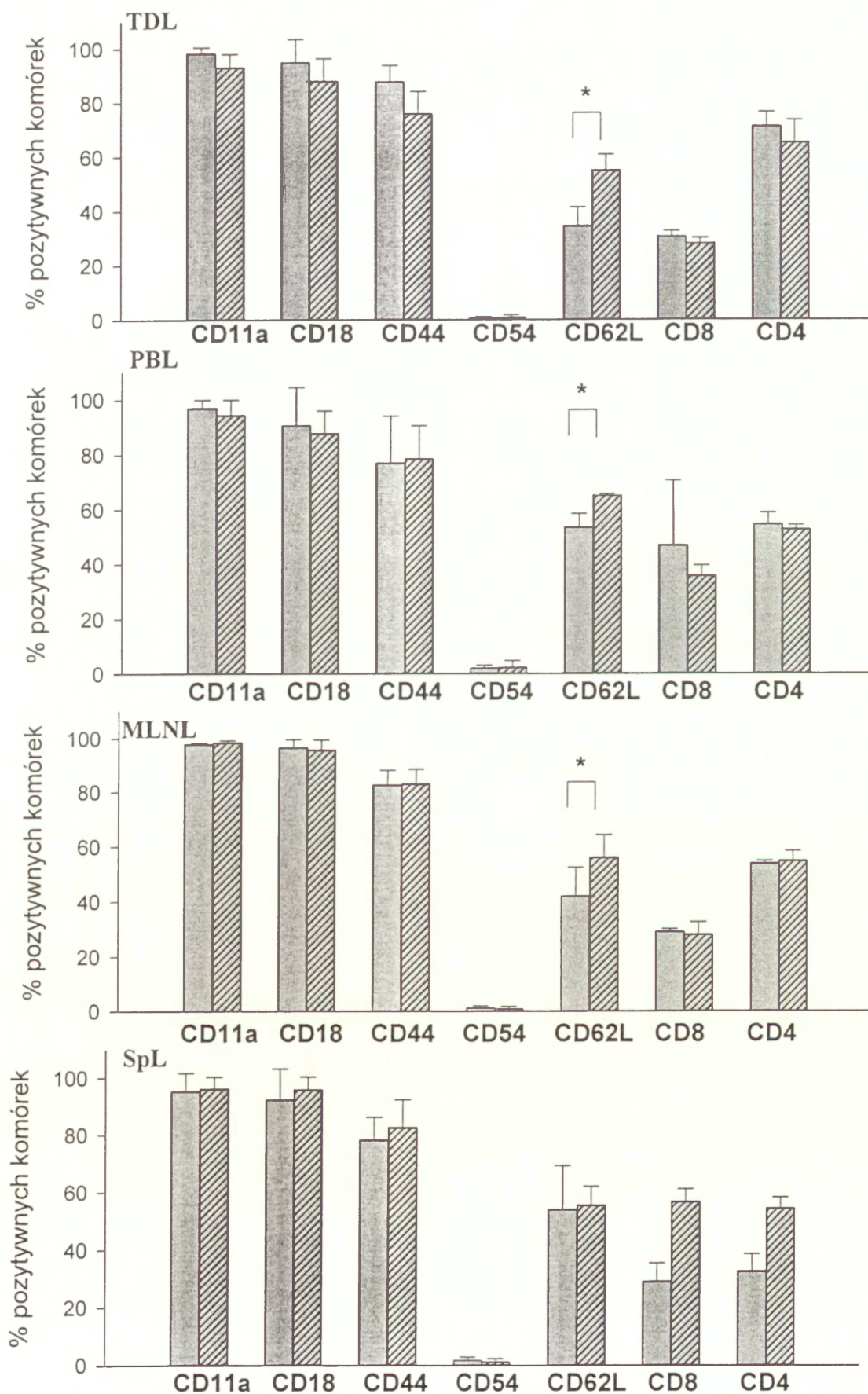


Rys. 13. Dystrybucja CsA-TDL i NaCl-TDL u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (grupa 1, 1a) (A. a), z syngenicznym przeszczepem serca (grupa 2, 2a) (B. a) i po sham-operation (grupa 5, 5a) (A. B. b) (* p<0.05).

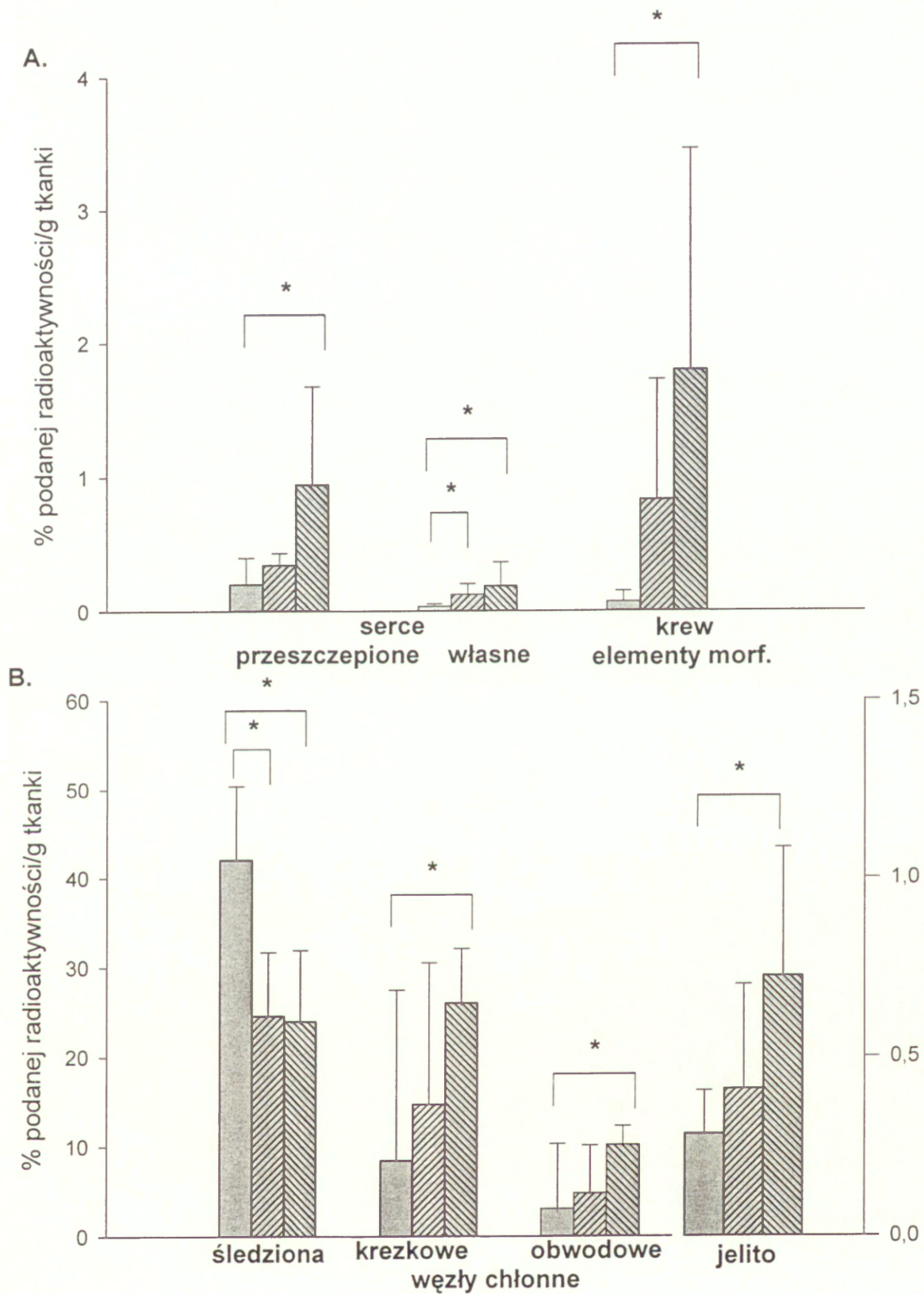
(a - przeszczep serca, b - sham-operation)



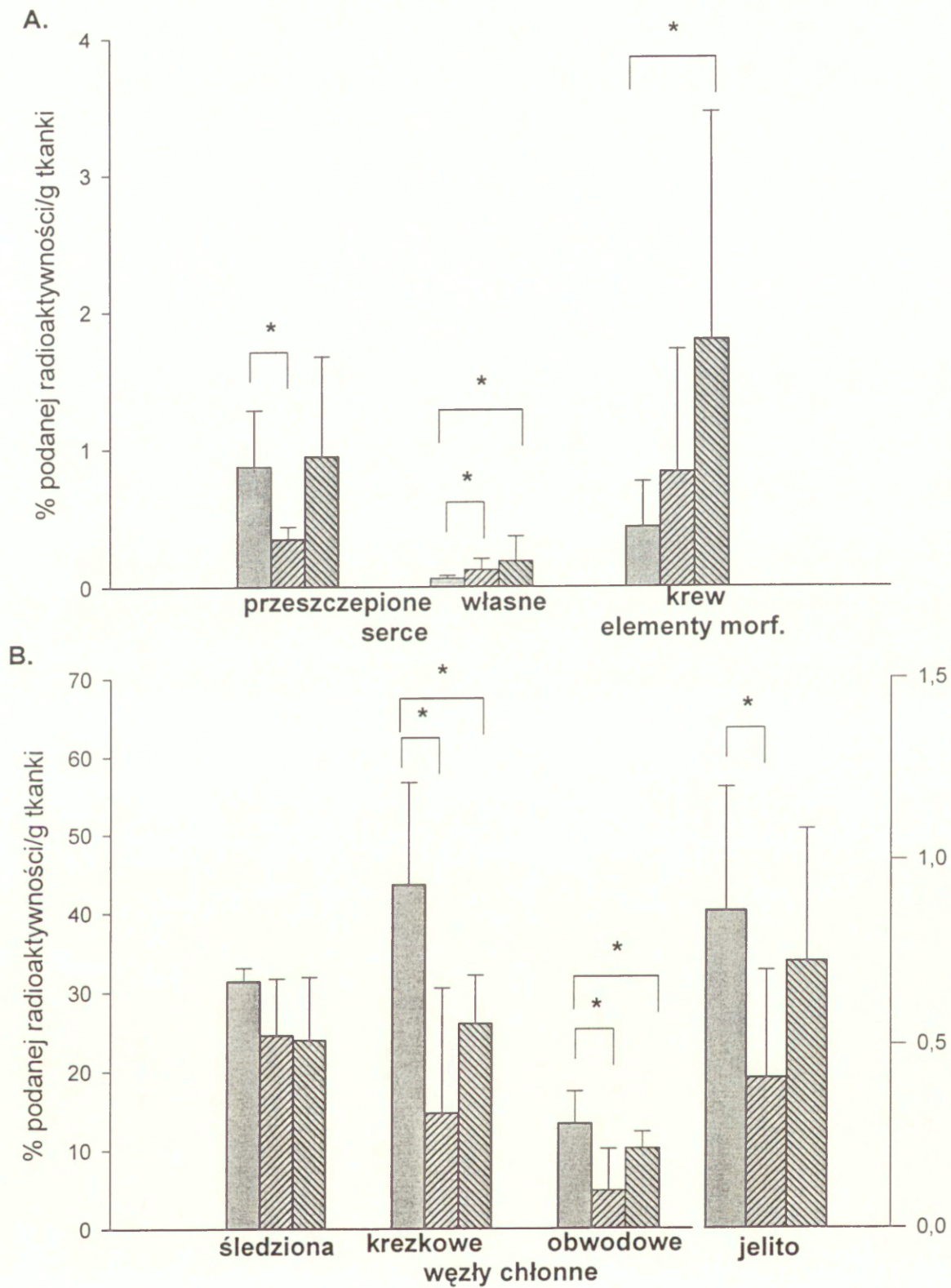
Rys. 14. Migracja *in vitro* limfocytów pochodzących z krwi obwodowej, śledziony, węzłów chłonnych krezkowych i szpiku kostnego pobranych od szczurów otrzymujących CsA (grupa 6)  i 0.9% NaCl (grupa 6a)  .



Rys. 15. Ekspresja cząsteczek adhezyjnych i fenotyp lifocytów od szczurów otrzymujących CsA (grupa 7) i 0.9% NaCl (grupa 7a).



Rys. 16. Dystrybucja normalnych TDL inkubowanych z mitomycyną (grupa 8) , TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 1) i bez leków (grupa 1b) u syngenicznego biocy z allogenicznym przeszczepem serca (* $p < 0.05$).



Rys. 17. Dystrybucja normalnych TDL inkubowanych z azydkiem sodu (grupa 9) , TDL od dawcy otrzymującego CsA (CsA-TDL) (grupa 1) i bez leków (grupa 1b) u syngenicznego biorcy z allogenicznym przeszczepem serca (* $p < 0.05$).