

CENTRUM MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ZESPOŁ CHIRURGII TRANSPLANTACYJNEJ

HANNA GAŁKOWSKA

IMMUNOLOGICZNA CHARAKTERYSTYKA  
KOMÓREK CHŁONKI PRZEDWEZŁOWEJ

PRACA DOKTORSKA



25 65  
H3207

PROMOTOR

Prof.dr hab.med.Waldemar L.Olszewski

WARSZAWA 1980

Serdecznie dziękuję Promotorowi

Profesorowi dr hab.med.Waldemarowi L.Olszewskiemu  
za okazaną mi pomoc i dyskusję merytoryczną  
zagadnień dotyczących niniejszej pracy.

Składam również podziękowania Koledze  
Mirosławowi Ruka za pomoc w wykonywaniu  
zabiegów chirurgicznych.

S P I S T R E S C I

	Strona
1. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	1
2. PRZEGLĄD PISMIENICTWA	7
3. MATERIAŁ I METODY	31
4. WYNIKI	45
5. OMOWIENIE WYNIKÓW	60
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	68
7. PISMIENICTWO	70
8. SKROTY UŻYWANE W PRACY	85
9. TABELLE	86

## 1. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Naczynia chłonne przedwężłowe, droga odpływu cząstek obcych antygenowo i szczątków komórkowych z tkanki do regionalnego węzła chłonnego, odgrywają kluczową rolę w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej typu: zapalenie, reakcja Arthusa, nadwrażliwość typu późnego, reakcja odrzucania przeszczepu./91/

Drenaż chłonny jest nieodzownym czynnikiem w procesie rozwoju reakcji odpornościowej u biorcy nieunaczynionego przeszczepu /8,29/. Wg teorii Medawar'a uczulenie limfocytów na antygeny zgodności tkankowej następuje obwodowo, w tkance przeszczepu. Komórki biorące udział w tej reakcji opuszczają nieunaczyniony przeszczep i drogą przedwężłowych naczyń chłonnych biorcy przedostają się do węzła chłonnego, gdzie powstają komórki efektorowe. W myśl drugiej teorii, reakcja uczulenia rozpoczyna się nie w samym przeszczepie lecz centralnie, w węzle chłonnym. I w tym przypadku nieodzownym czynnikiem jest drenaż chłonny, transportujący do węzła chłonnego antygeny rozpuszczalne lub komórkowe, uwolnione z przeszczepu /91/.

Sytuacje, w których dochodzi do przerwania ciągłości naczyń chłonnych przedwężłowych prowadzą do upośledzenia procesu uczulenia na antygen obecny w tkance. Obszary pozbawione prawidłowego drenażu chłonnego są tzw. miejscami immunologicznie uprzywilejowanymi. W układach doświadczalnych obserwowano przedłużenie czasu przeżycia allogenicznych

przeszczepów skóry kładzionych w miejscach pozbawionych drenażu chłonnego, takich jak: mięśnie szkieletowe, komora przednia oka /9/, doświadczalnie wytworzona szypuła skórna /141/, tkanka mózgowa /109/.

W sytuacjach klinicznych zaobserwowano znaczny procent powikłań typu chronicznego zakażenia w miejscach zastoju chłonnego w tkance, w której wystąpiły zmiany patologiczne w obrębie przedwężłowych naczyń chłonnych. Choroby rozwijające się w następstwie zastoju chłonnego tworzą nowy rozdział w medycynie. Pojawiają się one w wyniku zmian pooperacyjnych lub zmian patologicznych, jak: przecięcie naczyń chłonnych, zablokowanie przepływu chłonki w wyniku procesów zapalnych, rozrost tkanki nowotworowej /40/.

Mechanizm funkcjonowania miejsc immunologicznie uprzywilejowanych związany jest z przerwaniem dośrodkowego łuku odpowiedzi immunologicznej, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia również łuku odśrodkowego odpowiedzi. Przerwanie drogi przechodzenia antygeny do węzła chłonnego w łuku dośrodkowym reakcji odpornościowej może także wywołać zjawisko wzmocnienia immunologicznego /enhancement/. W reakcji na allogeniczny przeszczep skóry w miejscu pozbawionym drenażu chłonnego obserwowano u biorcy odpowiedź proliferacyjną w śledzynie, a jego surowica powodowała przedłużenie przeżycia przeszczepu narządowego u innego zwierzęcia /86/.

Aby poznać mechanizm funkcjonowania miejsc immunologicznie uprzywilejowanych, należy badać aktywność

immunologiczną funkcjonalnej sieci komórek odpornościowych, migrujących do i przez tkanki nielimfatyczne, w warunkach prawidłowych oraz po przerwaniu odpływu chłonnego. Punktem wyjścia do takich badań powinna być znajomość podstawowych populacji komórkowych, które spontanicznie opuszczają krążenie kapilarne i migrują przez tkanki do naczyń chłonnych.

W tym celu przeprowadzono badania nad określeniem w chłonce przedwężłowej populacji komórkowych, metodą charakteryzowania receptorów powierzchniowych oraz metodami testów funkcjonalnych u:

1. psów zdrowych
2. psów z ostrym zastojem chłonnym po przerwaniu naczyń przedwężłowych
3. psów z przewlekłym zastojem chłonnym po przerwaniu naczyń przedwężłowych

Praca miała dać odpowiedź na następujące pytania:

1. Jakie populacje komórek migrują fizjologicznie z krwi przez skórę i tkankę podskórną do chłonki i regionalnego węzła chłonnego.
2. Jak wpływa przerwanie drogi recyrkulacji na skład populacji komórkowej chłonki przedwężłowej.

Badania przeprowadzono na chłonce przedwężłowej drenującej skórę kończyn, co było podyktowane szeroko rozwiniętym układem naczyń chłonnych w tym obszarze, zapewniającym obfity przepływ chłonki, oraz łatwością techniki kaniulacji i zbierania chłonki. Poza tym, skóra będąc miejscem kontaktu ustroju ze środowiskiem zewnętrznym podlega

stałemu procesowi stymulacji antygenowej, stąd oczekiwane szerokie spektrum populacji komórkowych migrujących w jej układach naczyniowych i przestrzeni tkankowej.

## 2. P R Z E G L A D P I S M I E N N I C T W A.

Układ chłonny, połączenie układu naczyniowego z układem siateczkowo - śródbłonkowym, jest jednokierunkowym systemem drenującym przestrzeń śródmiąższową i transportującym płyn tkankowy. Układ ten utrzymuje w homeostazie płyny ustrojowe w różnych tkankach i obszarach ciała.

Układ naczyniowy zbudowany jest z trzech typów naczyń: 1/ naczyń początkowych /kapilary chłonne/ o różnym przekroju, zbudowanych z pojedynczej warstwy komórek śródbłonka otoczonego nieciągłą błoną podstawną, którą tworzą komórki siateczki i włókna kolagenowe, 2/ naczyń zbierających o różnym przekroju, charakteryzujących się obecnością zastawek oraz trójwarstwową ścianą, zbudowaną z warstwy śródbłonka otoczonego błoną podstawną, warstwy mięśni gładkich o nieciągłej grubości i warstwy tkanki łącznej, 3/ naczyń głównych o dużym przekroju /78/.

Układ siateczkowo - śródbłonkowy jest zespołem komórek osiadłych, tworzących tkankę zrębu narządów limfatycznych oraz komórek ruchliwych, krążących między krwią, tkankami i chłonką. Zarówno komórki osiadłe jak i ruchliwsze biorą udział w reakcjach odpornościowych /70,91/.

### U k ł a d o d p o r n o ś c i o w y

Układ odpornościowy pełni ważną funkcję ochrony środowiska wewnętrznego organizmu przed obcymi cząstkami, które



po rozpoznaniu są eliminowane. W procesie tym biorą udział zarówno komórki odpornościowe jak i wydzielane przez nie substancje biologicznie czynne. Komórki odpornościowe to granulocyty, komórki linii monocyt - makrofag oraz limfocyty /10/. Wywodzą się one ze wspólnej komórki pnia szpiku kostnego, która ulega różnicowaniu na odrębne linie komórkowe, mieloidalną, monoidalną i limfoidalną.

Komórki linii mieloidalnej i monoidalnej pełnią w warunkach fizjologicznych ważną funkcję oczyszczania tkanek i płynów ustrojowych z obcych cząstek oraz zmienionych komórek własnych. Czynność ta związana jest z aktywnością fagocytarną tych komórek, którą przejawiają w nieobecności uczulonych limfocytów, przeciwciał i dopełniacza /147/.

W stanach patologicznych zwanych zapaleniem, reakcja komórek fagocytarnych staje się procesem bardziej dramatycznym. Krążące monocyty, a głównie neutrofile, które w warunkach fizjologicznych przylegają do śródbłonna naczyń w niewielkiej liczbie, zaczynają masowo migrować przez ścianę naczyń do tkanki /135/. Ruch ten jest aktywny i odbywa się w gradiencie czynników chemotaktycznych, uwalnianych z komórek tucznych, płytek krwi, bazofilów, eozynofilów, neutrofilów, uczulonych limfocytów oraz tkanek /73,77/. Proces fagocytozy wspomagany jest udziałem przeciwciał opsonizujących i cytofilnych oraz dopełniacza /144/.

#### C h a r a k t e r y s t y k a   g r a n u l o c y t ó w

Granulocyty uwalniane są ze szpiku w postaci komórek

dojrzałych funkcjonalnie. Zawierają one szereg silnie działających enzymów lizosomalnych, jak: elastaza, kolageneza, kwaśna fosfataza, peroksydaza. Najlepiej poznaną grupą granulocytów są neutrofile, które wykazują silne własności fagocytarne. Funkcje eozynofilów i bazofilów są jeszcze mało poznane. Jedną z czynności eozynofilów, występujących głównie w tkankach, może być regulowanie reakcji związanych z degranulacją komórek tucznych /97/. Eozynofile mają zdolność unieczynniania histaminy i działają przeciwzapalnie. Pochłaniają również kompleksy antygen - przeciwciało /23/. Funkcje bazofilów związane są z reakcją anafilaktyczną oraz nadwrażliwością typu późnego /73/.

Aktywność granulocytów w procesach przylegania komórkowego, fagocytozy i lizy komórkowej związana jest z obecnością w błonie komórkowej receptorów dla fragmentu Fc IgG oraz dla dopełniacza. Obecność tych receptorów stwierdzono u około 80-90% neutrofilów i 10-20% eozynofilów człowieka. Receptor FcIgG wykryto również w błonie komórkowej bazofilów /66/. U ludzi z chorobą alergiczną 20% eozynofilów wykazuje obecność receptorów E dla erytrocytów barana /23,128/. Eozynofile psów również tworzą spontaniczne rozetki E z erytrocytami /151/.

C h a r a k t e r y s t y k a   k o m ó r e k  
l i n i i   m o n o c y t   -   m a k r o f a g

Komórki linii monoidalnej powstają w szpiku z komórek prekursorowych i jako monocyty krążą w krwi obwodowej, skąd aktywnie migrują do tkanek. Populacja monocytów migrujących stanowi około 75 % puli wewnątrznaczyniowej /87/.

W tkankach monocyty nabywają właściwości charakterystycznych dla środowiska danej tkanki i stają się makrofagami /16/. Makrofagi tkankowe występują w formie komórek osiadłych lub wolnych. Mogą one ulegać fuzji komórkowej tworząc komórki olbrzymie lub różnicować się w komórki podobne do nabłonkowych /114/. Funkcja tak zmienionych makrofagów nie jest znana.

Komórki linii monocyt - makrofag pełnią ważną rolę w indukowaniu i regulacji odpowiedzi immunologicznej. Makrofagi biorą udział w przygotowaniu antygeny, który w formie natywnej jest słabo immunogeny dla limfocytów. Obecność makrofagów znacznie podnosi odpowiedź komórek immunologicznie zaangażowanych na alloantygeny oraz mitogeny /6, 84/. Makrofagi wykazują również cytotoksyczną aktywność antynowotworową /26/.

Funkcja komórek linii monocyt - makrofag związana jest z obecnością receptorów powierzchniowych dla FcIgG, C3, C3b oraz receptorów dla limfocytów /71/. Makrofagi płucne, otrzewnowe, węzłów chłonnych, chłonki przedwęzłowej tworzą

spontanicznie zlepy z limfocytami. Zjawisko to opisano u ludzi i zwierząt, w układach zależnych, jak i niezależnych od obecności antygeny /80, 130/.

Fizyczny kontakt makrofagów z limfocytami wydaje się być związany z procesem współdziałania komórek w reakcjach immunologicznych /143/.

Dojrzałe makrofagi wydzielają szereg substancji czynnych biologicznie, jak lizozym, składniki dopełniacza, aktywator plazminogenu, stymulatory limfocytów, prostaglandyny /71/.

#### C h a r a k t e r y s t y k a   l i m f o c y t ó w

Ustalono istnienie dwóch dużych populacji limfocytów, komórek B i T, które różnicują się w odrębnych, centralnych narządach limfatycznych, torebce Fabrycjusza i grasicy. Z centralnych narządów limfatycznych limfocyty migrują do narządów obwodowych, tj. węzłów chłonnych, śledziony, tkanki limfatycznej jelita cienkiego /GALT/, tkanki limfatycznej płuc /BALT/ oraz mało zdefiniowanej populacji lamina propria wielu narządów. W obwodowych narządach limfatycznych limfocyty T i B zasiedlają charakterystyczne dla siebie obszary /71/.

Komórki B są populacją niejednorodną, od prekursorów do komórek plazmatycznych. Różnią się one długością życia, markerami powierzchniowymi, klasami wytwarzanych immunoglobulin /85, 89/. Mechanizm stymulacji komórek B do wytwarzania przeciwciał zależy od natury antygeny.

Antygeny T-zależne nie mogą pobudzać komórek B bezpośrednio i prawdopodobnie aktywacja następuje za pośrednictwem makrofagów oraz komórek T /90/. Proces aktywacji komórek B przez antygeny T-niezależne nie wymaga udziału komórek T. Antygeny takie są związkami o wysokim stopniu polimeryzacji i znacznej powtarzalności identycznych determinantów. Należą do nich antygeny pochodzenia bakteryjnego, jak polisacharydy i lipopolisacharydy /75/.

Dojrzałe komórki B charakteryzują się obecnością powierzchniowych immunoglobulin /sIg/, receptorów dla dopełniacza /C3b, C3d/, receptorów FcIgG, FcIgM /39/, FcIgA /79/ oraz dla wirusa Epstein-Barr'a /10, 71, 83/.

Komórki populacji T biorą udział w reakcjach immunologicznych typu komórkowego, jak odrzucanie przeszczepu, reakcja nadwrażliwości typu późnego, reakcja przeszczep przeciwko gospodarzowi /GvH/. Pełnią one również rolę regulatorów odpowiedzi immunologicznej i wpływają na proces różnicowania się limfocytów B w komórki wydzielające immunoglobuliny. Komórki potęgujące odpowiedź humoralną nazwane zostały komórkami pomocniczymi /helper cells/, a komórki hamujące odpowiedź, supresorowymi /supressor cells/. Komórki T regulacyjne mogą występować zarówno w formie komórek prekursorowych, jak i efektorowych.

U myszy komórki T regulacyjne można określać przy pomocy markerów powierzchniowych /18/. W rozwoju tymocytów najwcześniej pojawiają się antygeny typu Thy 1 i TL, później antygeny Ly1,2,3 /71/.

Antygeny Thy zostały opisane również na komórkach T u ludzi i psów /25, 71/. Komórki T z antygenem Ly1 należą do populacji komórek pomocniczych, które kontrolują reakcje nadwrażliwości typu późnego i odpowiadają w mieszanej hodowli limfocytów. Komórki T z antygenem Ly2,3 należą do populacji komórek supresorowych i wykazują efektorową aktywność cytotoksyczną /71, 83/. Komórki T supresorowe można podzielić na specyficzne i niespecyficzne antygenowo. Komórki niespecyficzne antygenowo można indukować przy pomocy mitogenów, PHA i ConA. Komórki supresorowe hamują odpowiedź limfocytów cytotoksycznych, uczulonych przez alloantygeny lub mitogeny /13/ oraz powodują przedłużenie przeżycia przeszczepu nerki /119/.

Komórki T biorą udział w dwóch typach reakcji cytotoksycznych, reakcji komórkowej, CMC /cell mediated cytotoxicity/ wyrażanej przez uczulone limfocyty oraz w reakcji zależnej od przeciwciał, ADCC /antibody dependent cell cytotoxicity/. Efektorowe komórki cytotoksyczne naciekające allogeniczne przeszczepy nie proliferują in vitro i nie odpowiadają na alloantygeny i mitogeny. Jednocześnie, cytotoksyczne komórki T śledziony biorcy przeszczepu mają zdolność proliferowania in vitro /7/.

Wydaje się, że prekursorami komórek efektorowych w reakcji CMC u ludzi są komórki  $T_{\mu}$ , a prekursorami komórek biorących w reakcji ADCC są komórki  $T_{\chi}$ . Obserwacje te nie zostały potwierdzone w doświadczeniach na myszach /127/. Istnienie subpopulacji  $T_{\mu}$  i  $T_{\gamma}$  związane jest z obecnością receptorów FcIgG lub FcIgM. Receptor FcIgG wykrywany jest na świeżo

izolowanych komórkach należących do populacji  $T_{\gamma}$ . Receptor FcIgM można wykrywać tylko na komórkach hodowanych in vitro /108/. Obie populacje komórek,  $T_{\mu}$  i  $T_{\gamma}$  odpowiadają podobnie na Con A i odmiennie na PHA. Komórki  $T_{\mu}$  należą do komórek pomocniczych i wykazują obecność niespecyficznego, kwaśnego esteraazy. Komórki  $T_{\gamma}$  należą do komórek supresorowych /71/ i stanowią około 20% komórek T w krwi człowieka. Komórki  $T_{\mu}$  stanowią 75% populacji T w krwi obwodowej /137/.

Z najnowszych badań wynika, że receptor FcIgG nie może być uznany za specyficzny dla limfocytów B lub T. Jest on strukturą niezależną od antygenów grasicy czy torebki Fabrycjusza i występuje na wszystkich komórkach powstających z komórki pnia szpiku /95/.

Receptory FcIgA i FcIgM również występują na obu typach limfocytów /79/. Obie populacje limfocytów wykazują również obecność receptora C3, którego funkcja na komórkach T nie jest znana /67/. Komórki T z receptorem C3 stanowią około 31% populacji limfocytów T przewodu piersiowego u dzieci. W krwi obwodowej i tkankach limfatycznych jest ich około 2%. W procesie dojrzewania funkcjonalnego komórki T tracą receptor C3 /129/.

Limfocyty T i B, wykazując podobieństwo morfologicznej budowy błony komórkowej /1/ oraz obecność receptorów Fc i C3, mogą być różnicowane przy pomocy markerów najbardziej charakterystycznych, tj. powierzchniowych immunoglobulin na komórkach B oraz receptorów dla obcogatunkowych erytrocytów /E/ na komórkach T /10, 115/.

Dojrzałe komórki T myszy, szczurów i ludzi wykazują ponadto aktywność niespecyficznego kwaśnego esteraazy, którą można wykrywać cytochemicznie /21,43/.

Receptory E dla erytrocytów barana występują na prawie wszystkich dojrzałych komórkach T u ludzi /10/, ale brak ich u myszy, szczurów i psów. Komórki T psów wykazują natomiast powinowactwo do erytrocytów ludzkich grupy A /11,15,152/.

Wydaje się, że istnieją dwie, odmienne funkcjonalnie subpopulacje T, które różnią się stopniem powinowactwa do erytrocytów. Populacja o dużym powinowactwie tworzy rozetki E wczesne /tzw. aktywne/ w temp. 37°C i charakteryzuje się niską odpowiedzią na PHA. Tworzenie rozetek wczesnych jest właściwością komórek mniej dojrzałych immunologicznie /58,113/ oraz limfoblastów /12,121/. Populacja o małym powinowactwie do erytrocytów tworzy rozetki E późne, w temp. 4°C, a proces zależy od czasu inkubacji /58/.

Funkcjonalne zróżnicowanie obwodowych komórek T obserwowano również w badaniach zdolności proliferacyjnych komórek pod wpływem mitogenów, PHA i ConA. Komórki T należące do prekursorów komórek efektorowych odpowiadają silniej na ConA, natomiast komórki amplifikujące /amplifier cells/ odpowiadają w jednakowym stopniu na oba mitogeny /83,136/. Zróżnicowanie odpowiedzi na mitogeny wiązane jest ze stopniem dojrzałości immunologicznej komórek. Świadczy o tym gęstość determinantów Thy1, które ulegają redukcji w procesie dojrzewania komórek T /83/. Komórki charakteryzujące się dużą gęstością antygeny Thy silniej odpowiadają na ConA niż PHA /116, 117, 124/.



W ostatnich latach ustalono istnienie naturalnego mechanizmu efektorowego skierowanego przeciwko allogenicznym i ksenogenicznym nowotworom, który opisano u ludzi, myszy i szczurów. Początkowo, komórki odpowiedzialne za ten mechanizm, które nazwano NK /natural killer cells/, wyodrębniono jako trzecią populację limfocytów nie-T i nie-B. Użycie surowic skierowanych przeciwko limfocytom T pozwoliło określić przynależność komórek NK do populacji T. U myszy komórki te wykazują niską gęstość antygenu Thy1, co pozwala przypuszczać, że należą do populacji mało dojrzałej immunologicznie. Inkubacja limfocytów z hormonem grasicy, tymozyną, powoduje obniżenie aktywności komórek NK. Naturalnie istniejące komórki NK nie wykazują obecności sIg, nie przylegają do powierzchni i nie fagocytują. Mają natomiast receptor FcIgG /61,120/. Prawdopodobnie komórki NK nie są populacją jednorodną i różnią się gęstością prezentowanych markerów powierzchniowych /107,142/.

Aktywność komórek NK może być indukowana przez szereg czynników wirusowych, komórkowych i chemicznych, jak interferon /146/. Naturalna aktywność cytotoksyczna indukowana jest również w czasie hodowli komórek in vitro, w populacji, z której usunięto uprzednio komórki NK /102/.

Altman i Rapp /3/ wykazali różny rozkład komórek NK w tkankach. Obserwowali oni wysoką aktywność cytotoksyczną, skierowaną przeciwko komórkom linii K 562, w krwi obwodowej i śledzionie świnek morskich oraz niską aktywność w węzłach chłonnych. Podobny rozkład komórek NK obserwowano u szczurów /106/.

Obok naturalnie cytotoksycznych komórek NK stwierdzono istnienie spontanicznie cytotoksycznych komórek K /killer cells/, które biorą udział w reakcji ADCC w obecności naturalnych przeciwciał. Komórki K również wykazują obecność receptora FcIgG i być może należą do tej samej subpopulacji komórek co komórki NK. Oba typy komórek biorą jednak udział w odrębnych mechanizmach cytotoksycznych /14,61,74/. Największą aktywność cytotoksyczną komórek K obserwowano w krwi obwodowej i śledzinie, podobnie jak komórek NK /28/.

#### P o c h o d z e n i e i s k ł a d

#### k o m ó r k o w y c h ł o n k i

Chłonka jest częścią płynu śródmiąższowego, który odpływa z przestrzeni śródmiąższowej drogą naczyń chłonnych. Objętość i skład chłonki warunkuje błona kapilarna, czyli tzw. bariera krew - chłonka. Z początkowych naczyń chłonnych chłonka płynie do naczyń zbiorczych i do przewodu piersiowego, skąd dostaje się do krwi /99/.

Chłonka zawiera erytrocyty i leukocyty w różnych proporcjach, zależnie od zmian fizjologicznych lub patologicznych w obszarze ciała, gdzie jest formowana /91/.

Obecność komórek krwi w chłonce i innych płynach ustrojowych, a więc poza łożyskiem naczyń krwionośnych, obserwowano od dawna. Badania nad komórkami chłonki były jednak ograniczone małą ilością uzyskiwanego materiału biologicznego.

Dopiero opracowanie metody długotrwałego zbierania chłonki w warunkach fizjologicznych /55/, oraz mikrometod dla oceny funkcjonalnej leukocytów pozwoliło podjąć takie badania.

Chłonkę dzieli się na chłonkę centralną oraz chłonkę obwodową, która nie przeszła przez tkankę limfatyczną /chłonka przedwęzłowa/.

Chłonka centralna to chłonka przewodu piersiowego, przewodu chłonnego otrzewnej oraz chłonka wypływająca z węzłów chłonnych. Komórki chłonki przewodu piersiowego to w większości małe limfocyty o niewielkiej aktywności mitotycznej oraz komórki blastyczne. U owcy chłonka przewodu piersiowego zawiera również w niewielkiej liczbie erytrocyty oraz wyjątkowo neutrofile. U przeżuwaczy oraz w stanach zwiększonej przepuszczalności naczyń, w reakcjach odrzucania przeszczepu i pod działaniem promieniowania jonizującego, liczba erytrocytów w chłonce wzrasta. Chłonka przewodu chłonnego otrzewnej zawiera poza limfocytami monocyty, granulocyty oraz makrofagi. Skład komórkowy chłonki wypływającej z węzłów chłonnych uzależniony jest od obszaru ciała. W chłonce centralnej pochodzącej z jelit, nerek, wątroby, mogą występować formy blastyczne limfocytów oraz eozynofile, które w stanach patologicznych mogą stanowić nawet 20% populacji komórkowej /91/.

Chłonka obwodowa /przedwęzłowa/ zawiera kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt razy mniej leukocytów w  $\text{mm}^3$  niż chłonka centralna, od której różni się również składem komórkowym. Charakterystyczną cechą chłonki przedwęzłowej jest

występowanie makrofagów. U człowieka i owcy stanowią one do 20% populacji leukocytów, a u królika nawet 50%.

Liczba erytrocytów i granulocytów w chłonce obwodowej jest również zróżnicowana gatunkowo /56,72,130,132/.

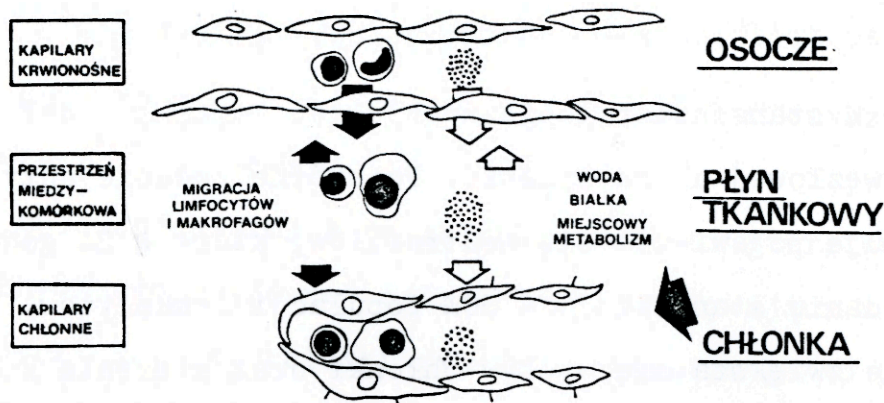
W stanach patologicznych skład komórkowy chłonki przedwężłowej ulega zmianie. Podskórne podanie antygeny powoduje pojawienie się neutrofilów, które w 24 godzinie po podaniu stanowią 70 - 80% populacji leukocytów. W tym czasie zwiększa się wypływ chłonki oraz stężenie komórek w  $\text{mm}^3$  /131/. W chłonce przedwężłowej autoprzeszczepu skóry w 48 godzin po przeszczepie obserwowano wzrost liczby komórek linii monocyt - makrofag, nawet do 75% /55/.

#### P o c h o d z e n i e k o m ó r e k c h ł o n k i

Zdecydowana większość komórek chłonki centralnej nie jest tworzona w tkankach limfatycznych, lecz pochodzi z krążenia krwi i stale recyrkuluje między krwią i chłonką /52; 54/.

Limfocyty recyrkulujące należą do komórek długożyjących i stanowią około 90% populacji przewodu piersiowego oraz 70% populacji krwi /33,104/. Recyrkulują zarówno komórki T jak i B, a kinetyka tego procesu jest różną, w zależności od typu komórki /65/.

Głównymi miejscami recyrkulacji są węzły chłonne /52/, śledziona /41,103/ i tkanka limfatyczna jelita /57/.



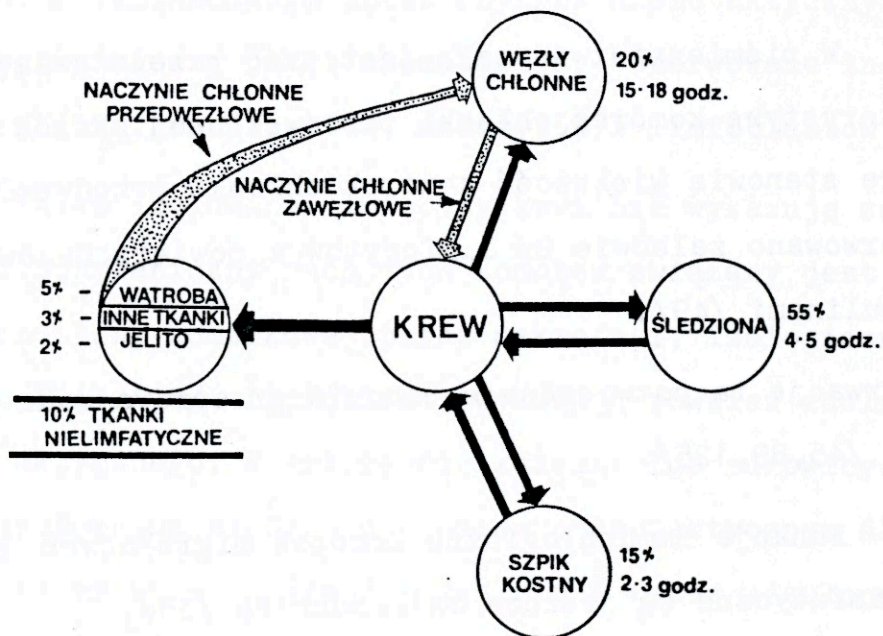
Rycina 1. Schemat migracji komórek z kapilarów krwionośnych do początkowych naczyń chłonnych.

W tkankach tych limfocyty wędrują z krwi przez ścianę kapilarów krwionośnych do przestrzeni śródmiąższowej, skąd wybiórczo migrują do obszarów charakterystycznych dla populacji T lub B. Zjawisko rozpoznawania przez limfocyty określonych miejsc nazwano homing'iem /93/.

W stanach patologicznych obserwowany jest zwiększony napływ limfocytów z krwi do węzła stymulowanego antygenem /60/ oraz do miejsc zapalnych /131/. Komórki opuszczające stymulowany węzeł chłonny to limfoblasty powstałe w węźle oraz limfocyty recyrkulujące, spośród których komórki T pojawiają się w chłonce wypływającej z węzła wcześniej niż komórki B /45/.

Podanie dożylnie farmakologicznych dawek kortykosterydów powoduje przejściową ucieczkę limfocytów z krążenia /126/. Badania wykazały, że limfocyty te należą do komórek T puli recyrkulującej i są odnajdywane w szpiku kostnym /17,37,38/.

Limfocyty opuszczają łożysko naczyniowe i migrują do przestrzeni śródmiąższowej większości, jeśli nie wszystkich tkanek. W tkankach nielimfatycznych najwięcej komórek migruje przez wątrobę i jelito cienkie, najmniej przez mózg /110/. Limfocyty z przewodu piersiowego lub krwi podane śródskórnie opuszczają miejsce podania i są odnajdywane w naczyniach przedwężłowych oraz najbliższym węźle chłonnym /29,56,63/.



Rycina 2. Schemat recyrkulacji limfocytów przez tkanki /wg Rannie /111/



Przez tkanki nielimfatyczne migruje około 10% komórek puli recyrkulującej /111/. Limfocyty obecne poza łożyskiem naczyniowym obserwowano w skórze /138/, płynie maziowym /47/, płynie otrzewnowym i opłucnowym, substancji szklistej oka, siarze /24,82/. Zdecydowana większość limfocytów z płynów ustrojowych należy do populacji T. Komórki te tworzą w 83% rozetki E typu wczesnego i w 93% rozetki E typu późnego /w krwi odpowiednio 13% i 55%/. Większość komórek z płynów ustrojowych ma receptor FcIgG /86%, a w krwi 28%/ i tylko 2% komórek wykazuje obecność powierzchniowych immunoglobulin /w krwi 17%/ /82/. Limfocyty obecne w płynie maziowym charakteryzują się, w odróżnieniu od limfocytów krwi, wysoką autotransformacją blastyczną, tworzeniem rozetek E typu wczesnego oraz tworzeniem zlepow z monocytami /47/.

W piśmiennictwie mało jest prac przedstawiających charakterystykę komórek chłonki przedwężłowej. Wśród limfocytów, które stanowią większość komórek chłonki przedwężłowej u ludzi obserwowano zaledwie 2% limfocytów z powierzchniowymi immunoglobulinami /49/.

Obserwację tą potwierdzają badania przeprowadzone na zwierzętach /45,89,125/.

Funkcje immunologiczne komórek migrujących przez tkanki nielimfatyczne są jeszcze mało poznane /35/.

M e c h a n i z m y   p r z e c h o d z e n i a  
k o m ó r e k   p r z e z   ś c i a n ę   k a p i l a r ó w

Spontaniczny ruch leukocytów, podobny do ruchu ameby, jest procesem aktywnym, energochłonnym, zależnym od udziału kurczliwych białek, aktyny i miozyny. Białka te tworzą włókienka ulegające polimeryzacji do mikrofilamentów. Związki blokujące polimeryzację włókienek, jak cytochalazyna B, hamują spontaniczny ruch komórki. Drugim elementem odpowiedzialnym za ruch komórki są mikrotubule, struktury utworzone ze spolimeryzowanych włókienek białka tubuliny. Związki blokujące polimeryzację tych włókienek, jak kolchicina i vinblastyna, nie hamują spontanicznego ruchu komórki, ale powodują utratę orientacji w ruchu ukierunkowanym przez czynnik chemotaktyczny. Zarówno ruch spontaniczny jak i chemotaksja, obserwowane *in vitro*, są właściwością granulocytów, monocytów i limfoblastów /147/.

Swieży izolowane limfocyty krwi nie wykazują zdolności ruchu. Spontaniczny ruch tych komórek związany jest z aktywacją ich błony komórkowej przez makrofagi, izologiczne limfocyty lub PHA /118/. Limfoblasty wykazują również zdolność ruchu chemotaktycznego, w gradiencie kazeiny lub surowicy indukowanej endotoksyną /100/. Czynnikiem chemotaktycznym dla limfocytów są głównie substancje uwalniane przez uczulone limfocyty i makrofagi. Inne czynniki chemotaktyczne, typowe dla fagocytów, jak frakcja C5 dopełniacza, nie mają wpływu na ruch limfocytów /145/.



Z obserwacji doświadczalnych i klinicznych wynika, że ruch spontaniczny i chemotaksja należą do dwóch odrębnych mechanizmów ruchu leukocytów /59/.

Zjawisko przechodzenia komórek przez ściany kapilarów dotyczy wszystkich typów komórek krwi, gdyż wszystkie można odnaleźć poza łożyskiem naczyniowym, w tkance. Wydaje się, że mechanizm przechodzenia leukocytów i erytrocytów przez ścianę naczynia jest różny. Ruch erytrocytów jest procesem biernym i zależy od zmian hemodynamicznych w naczyniu. Stosunek limfocytów do erytrocytów w chłonce obwodowej ludzi wynosi około 4:1, podczas gdy w krwi jest mniejszy niż 1:3000. Ruch leukocytów przez śródbłonek naczyń jest więc procesem aktywnym /31/.

Mechanizm migracji leukocytów do tkanek nielimfatycznych w warunkach fizjologicznych nie jest znany. Wydaje się, że w przypadku granulocytów i monocytów jest to ruch chemotaktyczny, wywołany obecnością w tkance czynników zwiększających przepuszczalność śródbłonek naczyń.

Limfocyty migrują przez śródbłonek naczyń niezależnie od stanu jego przepuszczalności, a proces związany jest ze zdolnością limfocytów do rozpoznawania specyficznych struktur na komórkach śródbłonek. Współdziałanie limfocytów z komórkami śródbłonek w procesie migracji może być modyfikowane przez czynniki fizjologiczne lub patologiczne w obrębie tkanki /93/. Zjawisko migracji leukocytów do miejsca zapalenia może być związane z miejscowym uwalnianiem enzymu glikozydazy, który działając na cukry obecne na powierzchni błony komórkowej leukocytów, prowadzi do zmiany struktury błony komórkowej /48/.

Mało poznany jest również mechanizm migracji limfocytów do tkanek limfatycznych. W węzłach chłonnych limfocyty opuszcza ją krew w żyłkach pozakapilarnych warstwy przykorowej, co zostało udowodnione przez Gowans'a i wsp. /52/.

Żyłki pozakapilarne charakteryzują się obecnością komórek śródbłonka o specyficznej budowie morfologicznej. Są to tzw. komórki wysokie śródbłonka i limfocyty migrują w ich przestrzeniach międzykomórkowych /4,36,94/. Poza węzłami chłonnymi i kępkami Peyer'a, komórki wysokie śródbłonka występują w tkance limfatycznej jelita cienkiego, zlokalizowanej w kosmkach. Komórki wysokie pojawiają się również w śródbłonku miejsc chronicznie zapalnych.

Komórki wysokie śródbłonka charakteryzują się dużą liczbą rybosomów i mitochondrów, mają silnie rozbudowany aparat Golgi'ego oraz zawierają enzymy, jak kwaśna fosfataza, niespecyficzna esteraza, glukuronidaza. Ich duża aktywność metaboliczna wiązana jest z mechanizmem migracji limfocytów /5/.

Pierwszym etapem koniecznym dla zapoczątkowania diapedezy komórki jest bezpośredni kontakt limfocyta z komórkami śródbłonka /22,32/. Limfocyty przewodu piersiowego, śledziony i węzłów chłonnych wykazują większe powinowactwo do komórek śródbłonka niż limfocyty grasicy i szpiku /134, 149/. Recyrkulujące komórki T i B mają taką samą zdolność przylegania do komórek wysokich /76/. Specyficzny kontakt limfocyta z komórką wysoką śródbłonka zależy również od aktywności metabolicznej samego limfocyta i jest procesem energozależnym /27/, wymagającym udziału cytoplazmatycznych mikrofilamentów /149/.

Mechanizm łączenia się limfocytów z komórkami śródbłonka żyłek pozakapilarnych nie jest znany. Wydaje się, że w procesie tym biorą udział komplementarne struktury obecne na obu typach komórek /42/. Jedne z nich, to wrażliwe na działanie trypsyny powierzchniowe glikoproteiny obecne na limfocytach /4,44,123/. Przebadano szereg czynników, jak enzymy, mitogeny, lipopolisacharydy bakteryjne, które mogą wpływać na kontakt limfocytów z komórkami śródbłonka i powodować zróżnicowanie rozmieszczenia limfocytów w poszczególnych tkankach /42/.

Strukturą odpowiedzialną za rozpoznawanie komplementarnych determinantów na komórkach wysokich mogą być również mikrokosmki limfocytów /4,34/. Mechanizm migracji limfocytów przez węzeł chłonny wiązany jest także z obecnością IgG na powierzchni komórek śródbłonka żyłek pozakapilarnych /139/.

Wg De Sousa i wsp. /133/ limfocyty migrują między krwią a chłonką w gradiencie białek wiążących żelazo. Białka te, laktoferyna, transferyna i ferrytyna produkowane są przez leukocyty. Receptory dla transferyny obserwowano na limfocytach krwi u ludzi, a dla ferrytyny na komórkach T. Migracja komórek w gradiencie białek wiążących żelazo może mieć szczególne znaczenie w mechanizmie recyrkulacji limfocytów przez śledzionę, gdzie limfocyty krwi, po przejściu przez zatokę brzezną, przedostają się do pochewki okołotętniczej /PALS/, skąd przez zatokę żylną wracają do krwi /71/.

Rannie i Ford /111/ postulują istnienie dwóch odrębnych mechanizmów wybiórczej migracji limfocytów, do śledziony i tkanek Nielimfatycznych /mechanizm odporny na działania trypsyny/

oraz do węzłów chłonnych i miejsc reakcji komórkowej /mechanizm wrażliwy na działanie trypsyny/.

Immunologiczna funkcja komórek  
migrujących przez tkanki nielim-  
faticzne.

Populacja komórek migrujących przez tkanki jest jeszcze mało poznana. Należą do niej recyrkulujące limfocyty T oraz limfocyty B, które są przede wszystkim długożyjącymi komórkami pamięci immunologicznej /83/. Wydaje się, że istnieją dwie subpopulacje recyrkulujących limfocytów T, charakteryzujące się różną drogą migracji. Subpopulacja T 1 wykazuje duże powinowactwo do śledziony i wzbogacona jest w komórki pomocnicze, komórki supresorowe oraz komórki efektorowe reakcji G v H. Subpopulacja T2 recyrkuluje głównie przez węzły chłonne i zawiera komórki T pamięci immunologicznej oraz komórki reagujące w mieszanej hodowli limfocytów.

Po stymulacji antygenem obserwowany jest wzmożony napływ recyrkulujących limfocytów do tkanki i tylko niewielka część tych komórek jest specyficzna antygenowo /71/.

Zdecydowaną większość komórek migrujących przez tkanki nielinfatyczne do chłonki przedwęzłowej stanowią komórki T /49,89/. Aktywność efektorowa tych komórek, mierzona w teście skórnym NLT /normal lymphocytetransfer/ jest zdecydowanie niższa niż aktywność komórek chłonki wypływającej z węzła i komórek krwi /125/. W porównaniu z krwią obwodową, niski poziom cyto-

toksyczności komórkowej mierzonej w teście ADCC obserwowano również w chłonce przedwężłowej węzła podkolanowego i chłonce przewodu piersiowego /64/.

Chłonka przedwężłowa u ludzi zawiera około 66% limfocytów z antygenem Ia/w krwi 32%/. U myszy limfocyty T z antygenem Ia, które wiążą na swojej powierzchni antygen i pobudzają inne komórki do odpowiedzi efektorowej nazywane są inicjatorowymi. Być może komórki chłonki przedwężłowej również pełnią funkcję inicjatorową w odpowiedzi komórkowej i współdziałają z innymi komórkami odpornościowymi /49, 82/.

W populacji komórek naciekających allogeniczny przeszczep gąbki Ascher i wsp. /7/ obserwowali neutrofile, makrofagi i limfocyty. Komórki te wykazywały silną aktywność cytoksyczną w porównaniu z komórkami śledziony biorcy przeszczepu oraz były wzbogacone w antygenowo specyficzne<sup>1</sup> niespecyficzne komórki supresorowe. Istnieje przypuszczenie, że komórki supresorowe i cytotoksyczne mają zdolność migrowania z narządów limfatycznych do miejsc zapalnych, gdzie pozostają do momentu wyeliminowania czynnika stymulującego reakcję odpornościową. Komórki pomocnicze należą natomiast do populacji niemigrującej /7/.

Utrzymanie stanu immunologicznej homeostazy wymaga współdziałania mechanizmów efektorowych reakcji odpornościowej z mechanizmami pomocniczymi i supresorowymi, za pośrednictwem kooperacji komórkowej.

W mechanizmie supresorowym można wyróżnić trzy odrębne systemy: związany z komórkami T /indukowany przez ConA/, związany z komórkami mającymi zdolność przylegania do powierzch-

ni /limfocyty B i monocyty/ oraz związany z udziałem prostaglandyn. Aktywacja tych systemów nie wymaga proliferacji komórek /112/.

Prostaglandyny produkowane przez wszystkie tkanki oraz limfocyty, monocyty i płytki krwi, biorą udział w różnych procesach immunologicznych. Zablockowanie syntezy prostaglandyn prowadzi do wzmocnienia reakcji odpornościowych, co obserwowano w różnych układach doświadczalnych /51/.

Ważnym mechanizmem homeostazy immunologicznej jest opisana w ostatnich latach cytotoksyczność naturalnie istniejących komórek NK i K. Komórki te występują głównie w krwi obwodowej i śledzionie, a ich aktywność w węzłach chłonnych, migdałkach i grasicy jest niewielka /3,28,106/. Można przypuszczać, że komórki NK i K należą do puli recyrkulującej przez śledzionę i tkanki nielimfatyczne. Komórki wysięku otrzewnowego wykazują niską aktywność komórek NK w porównaniu z komórkami śledziony /3/. Aktywność ta rośnie po dootrzewnowym podaniu szczepionki BCG /148/. Cytotoksyczność naturalnie istniejących komórek NK i K w krwi również wzrasta po jednorazowym, śródskórnym podaniu szczepionki BCG /140/.

R o l a   p r z e d w e ź ł o w y c h   n a c z y n í  
c h ł o n n y c h   w   p r o c e s i e   r o z w o j u  
r e a k c j i   o d p o r n o ś c i o w y c h .

Przedwężłowe naczynia chłonne, droga odpływu cząstek obcych antygenowo, komórek odpornościowych i szczątków komór-

kowych z tkanki do regionalnego węzła chłonnego, odgrywają kluczową rolę w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej typu: zapalenie, reakcja Arthusa, nadwrażliwość typu późnego, odrzucanie przeszczepu.

Wg teorii Medawar'a o obwodowym powstawaniu uczulenia, komórki migrujące do tkanki nieunaczynionego przeszczepu i rozpoznające antygeny tkankowe, opuszczają przeszczep i drogą przedwężłowych naczyń chłonnych trafiają do najbliższego węzła chłonnego. Powstałe w węźle komórki efektorowe wracają drogą centralnych naczyń chłonnych i krwi do tkanki przeszczepu /8,91/.

Wagę chłonnego łożyska naczyniowego w powstawaniu uczulenia potwierdzają liczne badania tzw. miejsc immunologicznie uprzywilejowanych, pozbawionych unaczynienia chłonnego. Miejsca takie dłużej utrzymują allogeniczne przeszczepy skóry /9,109,141/, co może być spowodowane wytworzeniem u biorcy przeciwciał wzmacniających /enhancing antibody/ /86/.

Przedwężłowe naczynia chłonne mogą również stanowić naturalną drogę dla komórek nowotworowych, uwolnionych z tkanki nowotworowej, które po dotarciu do regionalnego węzła chłonnego zostają rozpoznane /50/. Juillard i wsp. /68,69/ obserwowali redukcję tkanki nowotworowej u psów w wyniku podania napromieniowanych komórek nowotworowych bezpośrednio do naczyń przedwężłowych kończyn. Mechanizm prowadzący do ograniczenia masy nowotworu nie jest znany. Wydaje się, że podanie antygeny bezpośrednio do układu naczyń przedwężłowych może wywołać efekt adjuwantowy, podobny do działania szczepionki BCG.

### 3. M A T E R I A Ł I M E T O D Y

#### A. Grupy doświadczalne

Badania wykonano w 3 grupach:

- I. psy zdrowe,
- II. psy z ostrym zastojem chłonny w kończynie tylnej,
- III. psy z przewlekłym zastojem chłonny w kończynie tylnej.

Populacje komórkowe chłonki przedwężłowej porównywano równocześnie we wszystkich przypadkach z populacjami wyodrębnionymi z obwodowej krwi żyłnej tego samego psa.

#### B. Otrzymywanie chłonki

Chłonkę przedwężłową psów grupy I i II uzyskiwano drogą drenażu naczyń chłonnych, towarzyszących żyłce odstopowej kończyny tylnej, metodą opisaną przez Engeset'a i wsp. /30/. Do naczynia chłonnego wprowadzano kaniulę polietylenową typu PE 60 /Intramedic/ o średnicy 0,3 mm. Na 3 dni przed i w dniu kaniulacji psom podawano podskórną 1200000 j. Debecyliny /Polfa//15 kg. Psy znieczulano wprowadzając dożylnie pentobarbital /Nembutal, Polfa/ w ilości 25 mg/kg i intubowano stosując rurki dotchawicze. W czasie drenażu chłonnego osom podawano podskórną heparynę /Polfa/, wstrzykując jednorazowo w skórę grzbietu 500 j./15 kg. Podawano również Pyralginum /Polfa/, wstrzykując co 6 godz. podskórną 2 ml 10% roztworu. Chłonkę przedwężłową psów grupy III uzyskiwano przez nakłucie igłą skóry w miejscu zastoju chłonnego.



C. Wytwarzanie ostrego i przewlekłego zastoju chłonnego.

Technika wytwarzania zastoju chłonnego, opisana przez Olszewskiego i wsp. /98/ polegała na wycięciu w górnym odcinku uda okrężnego pasa skóry i tkanki podskórnej szerokości 1 cm, przecięciu powięzi mięśniowych, wycięciu kilkucentymetrowego odcinka udowych naczyń chłonnych oraz całej tkanki łącznej, która otacza udowy pęczek naczyniowo - nerwowy. Brzegi skóry przyszywano do mięśni, pozostawiając okrężną ranę szerokości 1 cm. W 3-5 dniu po zabiegu, w okolicy rany powstawał obrzęk zapalny oraz zastój chłonny w obwodowej części kończyny. Badania w grupie II przeprowadzono w 5 dniu po zabiegu, a w grupie III w 5-8 lat po wytworzeniu zastoju chłonnego.

D. Schemat badań komórkowych.

W doświadczeniach oceniano następujące parametry:

1. Żywotność
2. Leukocytoza
3. Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna komórek, oceniana w populacji pełnej, w populacji komórek nieprzylegających, w populacji komórek przylegających do powierzchni plastikowych.
4. Charakterystyka receptorów powierzchniowych E, Fc i C3 na komórkach jednojądrzastych, oceniana w populacji pełnej, w populacji komórek nieprzylegających, w populacji komórek przylegających do powierzchni plastikowych.
5. Immunoglobuliny powierzchniowe klasy IgG, badane na komórkach pełnej populacji.

6. Transformacja blastyczna komórek pełnej populacji pod wpływem PHA i ConA.
7. Aktywność cytotoksyczna naturalnie istniejących komórek K, badana w pełnej populacji komórek.
8. Aktywność cytotoksyczna naturalnie istniejących komórek NK, badana w pełnej populacji komórek.

W grupie III wykonano badania dodatkowe, w których oceniono:

1. Poziom spontanicznego wbudowywania  $^3\text{H}$ -tymidyny, badany w hodowli trwającej 2 godz. i 48 godz., celem sprawdzenia, czy wysoki poziom autotransformacji ma miejsce już in vivo, czy też pojawia się dopiero w hodowli.
2. Wpływ Penicyliny /Polfa/ podanej in vivo, w 5 dawkach po 600000 j. na poziom autotransformacji limfocytów, dla wyłączenia ewentualnego wpływu zakażenia w tkance i naczyniach przedwężłowych.

Wszystkie doświadczenia wykonano w grupach liczących co najmniej trzy psy.

#### E. Stosowane metody badań komórkowych.

a/W y o d r ę b n i a n i e l e u k o c y t ó w z k r w i. Krew pobierano strzykawką z żyły udowej i przenoszono do próbki zawierającej 20 j. hepyryny /ml pobieranej krwi. Używano heparynę /Sigma/ niezawierającą środków konserwujących. W badaniach transformacji blastycznej komórek krew odwłókniano mechanicznie, przy pomocy drewnianych patyczków. Pobraną krew rozcieńczano w stosunku 1:3 w 0,9% roztworze NaCl, nakładano na gradient Lymphoprep /Nyegaard/ o gęstości 1,077 g/cm<sup>3</sup> i wirowano przy 2000 obr. przez 30 min. w temp. pokojowej.

Komórki obecne na granicy faz zbierano i płukano trzykrotnie płynem Hanks'a /62/.

b/ U z y s k i w a n i e l e u k o c y t ó w z c h ł o n k i p r z e d w ę z ł o w e j p s ó w z d r o w y c h. Po zakaniulowaniu naczynia przedwężłowego, chłonkę zbierano do plastikowych strzykawk, które zawierały 20 j. heparyny/ml zbieranej chłonki. Stosowano heparynę o stężeniu 200j./0,2 ml płynu Eagle-MEM uzupełnionego antybiotykami /100 j. Penicyliny i 100 ug Streptomycyny w 1 ml/. Chłonkę zbierano w sposób ciągły przez 24 godz. Co 3 godz. strzykawki zmieniano, a próbki chłonki przechowywano w temp. 4 °C. Następnie chłonkę nawarstwiano na gradient Lymphoprep i wirowano przy 2000 obr. przez 20 min., w temp. pokojowej. Komórki zebrane z granicy faz płukano trzykrotnie płynem Hanks'a.

c/ U z y s k i w a n i e l e u k o c y t ó w z c h ł o n k i p r z e d w ę z ł o w e j p s ó w z o s t r y m z a s t o j e m c h ł o n n y m. Postępowano wg. schematu przedstawionego w punkcie b rozdziału Metody.

d/ U z y s k i w a n i e l e u k o c y t ó w z c h ł o n k i p r z e d w ę z ł o w e j p s ó w z p r z e w l e k ł y m z a s t o j e m c h ł o n n y m. Chłonkę uzyskaną przez nakłucie igłą skóry w miejscu zastoju chłonnego zbierano do probówek zawierających 20 j. heparyny/ml zbieranej chłonki /heparynę przygotowywano jak w punkcie b rozdziału Metody/. Komórki chłonki wyodrębniano wg. schematu podanego w punkcie b rozdziału Metody.

e/ Ż y w o t n o ś ć i r ó ż n i c o w a n i e m o r f o l o g i c z n o - c y t o c h e m i c z n e k o m ó r e k . Ż y w o t n o ś ć k o m ó r e k o c e n i a n o p r z y p o m o c y 0,25% b ł ę k i t u t r y p a n u , o b l i c z a j ą c p r o c e n t o w ą z a w a r t o ś ć ż y w y c h , n i e w y b a r w i o n y c h k o m ó r e k . R ó ż n i c o w a n i e k o m ó r e k p r z e p r o w a d z a n o m e t o d ą o c e n y r o z m a z ó w k o m ó r k o w y c h , w y b a r w i o n y c h w g . M a y - G r u n w a l d - G i e m s a i m e t o d ą n a o b e c n o ś ć n i e s p e c y f i c z n e j e s t e r a z y /150/. R o z m a z y k o m ó r k o w e w y k o n a n o p r z y u ż y c i u c y t o w i r ó w k i /M E D I P A N/. W p r z y p a d k u k o m ó r e k p r z y l e g a j ą c y c h r o z m a z y u t r w a l a n o i b a r w i o n o b e z p o ś r e d n i o n a p ł y t k e /L i n b r o/. W p r a p a r a t a c h b a r w i o n y c h n a o b e c n o ś ć n i e s p e c y f i c z n e j e s t e r a z y o c e n i a n o t y l k o k o m ó r k i j e d n o j ą d r z a s t e .

f/ R o z d z i a ł p e ł n y c h p o p u l a c j i k o m ó r e k n a p o p u l a c j e n i e p r z y l e g a j ą c e d o p o w i e r z c h n i p l a s t i k o w y c h . K o m ó r k i u z y s k a n e m e t o d ą w i o w a n i a n a g r a d i e n c i e L y m p h o p r e p /p a t r z p u n k t a i b r o z d z i a ł u M e t o d y/ z a w i e s z a n o w p ł y n i e R P M I - 1 6 4 0 / G I B C O / z d o d a t k i e m L g l u t a m i n y i H E P E S , u z u p e ł n i o n y m 2 0 % p ł o d o w e j s u r o w i c y c i e l ę c e j , p o z b a w i o n e j d o p e ł n i a c z a . Z a w i e s i n ę o ś t ę ż e n i u  $10^6$  k o m ó r e k / m l r o z l e w a n o p o 0,2 m l d o p ł a s k o d e n n y c h w g ł ę b i e Ń p ł y t k i /L i n b r o/ o ś r e d n i c y 5 m m . P ł y t k ę u m i e s z c z a n o n a 2 g o d z . w t e m p . 3 7 ° C . P o t y m o k r e s i e c z a s u z a w i e s i n y k o m ó r k o w e d e l i k a t n i e w y b i e r a n o i p r z e n o s z o n o d o o d p o w i e d n i e j p r o b ó w k i . D o t e j s a m e j p r o b ó w k i p r z e n o s z o n o t a k ż e k o m ó r k i o d z y s k a n e p r z e z d e l i k a t n e , d w u k r o t n e p ł u k a n i e w g ł ę b i e Ń p ł y t k i p ł y n e m H a n k s ' a . K o m ó r k i o d z y s k a n e w t e n s p o s ó b n a z y w a n o n i e p r z y l e g a j ą c y m i . K o m ó r k i , k t ó r e n i e

uległy odpłukaniu nazywano przylegającymi i pozostawiano je w płytce.

g/ T e s t t w o r z e n i a s p o n t a n i c z -  
n y c h r o z e t e k E. Do doświadczeń używano erytrocytów  
ludzkich grupy A. Krew pobieraną od stałego dawcy mieszano  
w stosunku 1:1 z płynem Alsewer'a. Erytrocyty trzykrotnie  
płukano buforem barbituranowym i przygotowywano z nich zawie-  
sinę 1% w płynie Hanks'a /15/. Komórki populacji pełnej i  
komórki nieprzylegające przygotowywano w stężeniu  $10^6$  komórek/ml  
płynu Hanks'a. Zawiesiny te rozlewano do probówek serologicz-  
nych po 0,1 ml i mieszano z 0,1 ml 1% zawiesiny erytrocytów.  
W celu określenia procentu komórek tworzących spontaniczne  
rozetki E typu aktywnego, probówki z mieszaninami badanych  
komórek z erytrocytami trzymano w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  przez 1 godz.,  
a następnie wirowano przy 600 obr. przez 2 min. Równolegle,  
w celu określenia całkowitego procentu komórek tworzących  
rozetki E, probówki zawierające mieszaninę badanych komórek  
z erytrocytami umieszczano na 10 min. w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ , a nastę-  
pnie wirowano przy 600 obr. przez 2 min. i umieszczano w temp.  
 $4^{\circ}\text{C}$  na 1 godz. /122/. Po tym okresie czasu zawartość probówek  
delikatnie mieszano i robiono rozmazy. W tym celu 2 krople  
ocenianej zawiesiny mieszano delikatnie z 1 kroplą 0,9%  
roztworu NaCl na szkiełku podstawowym, natychmiast suszono,  
utrwalano w etanolu i barwiono metodą May-Grunwald-Giemsa.  
W każdym preparacie liczono 200 komórek jednojądrzastych i  
przyjmowano za rozetkę komórkę otoczoną co najmniej trzema  
erytrocytami /46/. W celu określenia całkowitego procentu

komórek tworzących rozetki E w populacji komórek przylegających do powierzchni test tworzenia rozetek wykonywano we wgłębieniach płytki /Linbro/. Komórki przylegające uzyskane metodą opisaną w punkcie f rozdziału Metody zalewano 0,1 ml płynu Hanks'a, a płytkę umieszczano na 15 min. w lodówce w temp. 4 °C. Po tym okresie czasu do wgłębień płytki z komórkami przylegającymi nalewano po 0,1 ml 1% zawiesiny erytrocytów, oziębionej również do temp. 4 °C. Mieszaniny inkubowano w temp. 4 °C przez 1 godz., a następnie erytrocyty delikatnie odciągano, wgłębienia płytki płukano delikatnie płynem Hanks'a. Komórki utrwalano bezpośrednio na płytce i barwiono. Preparaty oceniano wg. schematu podanego wyżej dla komórek nieprzylegających.

h/ T e s t t w o r z e n i a r o z e t e k EA i EAC. Przygotowanie opłaszczonych erytrocytów barana /101/. Erytrocyty barana przetrzymywane w płynie Alsewer'a płukano trzykrotnie buforem barbituranowym i sporządzano z nich 5% zawiesinę w płynie Hanks'a. Jako źródła przeciwciał opłaszczających używano IgG królika /Cordis, 13 mg białka/ml/ i IgG królika /Cordis, 0,04 mg białka/ml/ skierowanych przeciwko erytrocytom barana. Jako źródła dopełniacza używano surowicy myszy AKR z defektem frakcji C5 dopełniacza. W celu opłaszczania erytrocytów barana przeciwciałem, 1 ml 5% zawiesiny mieszano z 1 ml IgG w rozcieńczeniu subaglutynacyjnym /1:1000/ w 0,9% roztworze NaCl. Analogicznie, 1ml 5% zawiesiny erytrocytów mieszano z 1 ml IgM, w rozcieńczeniu 1:100 w 0,9% roztworze NaCl. Mieszaniny te umieszczano na 30 min. w

w temp. 37 °C, a następnie erytrocyty płukano płynem Hanks'a. Do erytrocytów barana opłaszczonych IgM i zawieszonych w 1 ml płynu Hanks'a dodawano 1 ml surowicy myszy AKR, świeżo przygotowanej w rozcieńczeniu 1:10 w 0,9% roztworze NaCl. Mieszaninę umieszczano na 20 min. w temp. 37 °C, a następnie erytrocyty płukano płynem Hanks'a. Obie zawiesiny opłaszczonych IgG/EA/ i IgM/EAC/ erytrocytów barana doprowadzano do stężenia 0,5% w płynie Hanks'a.

W przypadku komórek pełnej populacji i komórek nieprzylegających test tworzenia rozetek wykonywano w probówkach, w których mieszano 0,1 ml zawiesiny  $10^6$  komórek badanych/ml z 0,1 ml 0,5% zawiesiny opłaszczonych erytrocytów barana EA i analogicznie EAC. Mieszaniny te wirowano przy 600 obr. przez 2 min. i umieszczano na 30 min. w temp. 37 °C. Następnie mieszaniny delikatnie mieszano i wykonywano rozmazy wg. schematu podanego w punkcie g rozdziału Metody. Test tworzenia rozetek EA i EAC przez komórki przylegające wykonywano na płytce /Linbro/, gdzie komórki przylegające we wgłębieniach płytki zalewano 0,1 ml płynu Hanks'a, a płytkę umieszczano na 15 min. w temp. 4 °C. Następnie do wgłębień nalewano 0,1 ml 0,5% zawiesiny opłaszczonych erytrocytów, oziębionych do temp. 4 °C i płytkę umieszczano na 1 godz. w lodówce, w temp. 4 °C. Ocenę rozetek przeprowadzano wg. schematu podanego w punkcie g rozdziału Metody.

i/ O d c z y n i m m u n o f l u o r e s c e n c j i  
b e z p o ś r e d n i e j d l a o c e n y i m m u n o -  
g l o b u l i n p o w i e r z c h n i o w y c h k l a s y  
IgG.

Komórki uzyskane metodą wirowania na gradiencie Lymphoprep zawieszano w płynie RPMI-1640 z L glutaminą i HEPES, uzupełnionym 20% płodowej surowicy cielęcej pozbawionej dopełniacza. W celu usunięcia komórek fagocytydujących, zawiesiny o stężeniu  $5 \times 10^6$  komórek/ml mieszano z 50 mg żelaza/Koch-Light/ i trzymano przez 1 godz. w temp.  $37^\circ\text{C}$ , stale mieszając. Następnie opiłki żelazne odciągano magnesem, a komórki płukano płynem Eagle'a z dodatkiem 0,1% azydku sodu i 25 mM HEPES. Podłoże hodowlane o podanym składzie było używane we wszystkich dalszych etapach odczynu. W celu usunięcia z powierzchni komórek przeciwciał opłaszczających, nie związanych z błoną komórkową /2/, zawiesiny o stężeniu  $3 \times 10^6$  komórek/ml umieszczano na 30 min. w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Następnie komórki płukano i po doprowadzeniu do poprzedniego stężenia rozlewano po 0,2 ml do probówek serologicznych. Probówki te wirowano przez 5 min. przy 2000 obr., a nadsącz usuwano. Osad komórkowy mieszano z 0,2 ml króliczej IgG, skierowanej przeciwko IgG psa, skoniugowanej z izotiocjanianem fluoresceiny /Microbiological Assoc., 10 mg białka/ml/ i rozcieńczonej 1:4 w podłożu hodowlanym. Mieszaninę umieszczano na 30 min. w temp.  $37^\circ\text{C}$ , a następnie komórki płukano dwukrotnie w podłożu hodowlanym /15/. Po odwirowaniu nadsącz usuwano, a osad komórkowy zawieszano w 20 ul podłoża hodowlanego, nakraplano na szkiełko podstawowe /Menzel-Gläser/ i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss, wyposażonego w lampę HBO 200. W każdym preparacie liczone 200 komórek jednojądrzastych. Za wynik dodatni odczynu uznawano komórki, które wykazywały intensywnie zieloną fluorescencję,



zlokalizowaną na obwodzie komórki w formie pełnego pierścienia.

j/ T e s t t r a n s f o r m a c j i b l a s t y -  
c z n e j. Komórki uzyskane metodą wirowania na gradiencie  
Lymphoprep płukano płynem RPMI-1640 z L glutaminą i HEPES,  
uzupełnionym antybiotykami i sporządzano zawiesinę o stęże-  
niu  $3 \times 10^6$  komórek/ml. Do hodwli używano płynu RPMI-1640 z  
L glutaminą, bez HEPES, uzupełnionego antybiotykami i 20%  
płodowej surowicy cielęcej, pozbawionej dopełniacza. Zawiesi-  
nę komórek w płynie hodowlanym rozlewano po 100 ul do płasko-  
dennej płytki hodowlanej /Linbro/. Hodowle kontrolne uzupeł-  
niano 100 ul podłoża hodowlanego, a do hodowli z mitogenami  
dodawano 100 ul podłoża zawierającego 2 ul PHA /Wellcome/  
lub 1 ug ConA/Sigma/. Hodowle prowadzono przez 72 godz. w  
temp.  $37^{\circ}\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w powietrzu. Na 18 godz. przed  
końcem hodowli dodawano 0,4 uCi methyl- $^3\text{H}$  tymidyny /Amersham,  
5Ci/~~mM~~/ w 20 ul 0,9% roztworu NaCl.

Hodowle kończono przez ręczne odciągnięcie płynu hodo-  
wlanego z nad osadu komórkowego i dodanie 2 kropli saponiny,  
rozcieńczonej 1:2000 w wodzie destylowanej. Po dokładnym roz-  
mieszaniu osad przenoszono na krążki bibuły Whatman nr 1,  
o średnicy 20 mm. Krążki suszono następnie w podczerwieni i  
zalewano 10% roztworem kwasu trójchlorooctowego o temp.  $4^{\circ}\text{C}$ .  
Krążki trzymano w kwasie przez 10 min. w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  oraz w  
temp. pokojowej przez 10 min. Następnie krążki ponownie suszo-  
no w podczerwieni i przemywano kolejno 96% etanolem, 100%  
etanolem i eterem. Suche krążki umieszczano w naczankach  
/Packard/ zawierających 5 ml płynu scyntylnego o następującym

składzie: 1 l toluenu cz.d.a., 3 g PPO /2,5- dwufenylooksazol/  
i 100 mg POPOP /1,4-dwu-//2-/5-fenylooksazoly//bezen/.

Radioaktywność krążków mierzono w liczniku scyntylicyjnym  
typu  $\beta$  /Beckmann/.

k/ N a t u r a l n a c y t o t o k s y c z n o ś ć  
k o m ó r e k E K. Przygotowanie komórek docelowych. Używano  
erytrocytów kury, które uzyskiwano z krwi pobieranej na hepa-  
rynę /10 j.heparyny/ml krwi/. Erytrocyty płukano trzykrotnie  
płynem Eagle'a z dodatkiem 25 mM HEPES i 2.5% surowicy ciele-  
cej płodowej, pozbawionej dopełniacza. Do znakowania używano  
płynu hodowlanego bez HEPES i mieszano 1.9 ml podłoża z 0.1  
ml zawiesiny erytrocytów / $2 \times 10^7$ / oraz 100 uCi  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ .  
Mieszaninę umieszczano na 1 godz. w temp.  $37^\circ\text{C}$ , a następnie  
erytrocyty płukano dwukrotnie płynem Eagle'a z dodatkiem 5%  
płodowej surowicy cielecej, pozbawionej dopełniacza. Test wy-  
konywano przy użyciu podłoża hodowlanego składającego się z  
płynu RPMI-1640 z L gluta miną i 5% płodowej surowicy cielecej,  
pozbawionej dopełniacza. Do wgłębień płaskodennej płytki  
/Linbro/ nalewano po 100 ul zawiesiny komórek efektorowych,  
przygotowanych w stężeniach zapewniających stosunek 4:1, 2:1,  
1:1, 1:2 i 1:4 komórek efektorowych do komórek docelowych.  
Następnie dodawano 100 ul zawiesiny  $10^6$  komórek docelowych/ml  
podłoża hodowlanego i na końcu 100 ul surowicy króliczej skie-  
rowanej przeciwko erytrocytom kury, przygotowanej w rozcień-  
czeniu  $10^{-4}$  w podłożu hodowlanym.

Miarą spontanicznego uwolnienia  $^{51}\text{Cr}$  były próby, w któ-  
rych surowicę skierowaną przeciwko erytrocytom zastąpiono su-  
rowicą zdrowego królika, używaną w rozcieńczeniu  $10^{-4}$ .

Drugim układem kontrolnym były próby zawierające  $10^5$  komórek docelowych,  $10^6$  niewyznakowanych erytrocytów kury oraz surowicę króliczą skierowaną przeciwko erytrocytom /105/. Płytkę z próbami trzymano przez 18 godz. w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  i atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w powietrzu. Następnie płytkę wirowano przy 2000 obr. przez 5 min. i z każdego wgłębienia wybierano 100  $\mu\text{l}$  nadsącza, który przenoszono do odpowiedniej probówki. Radioaktywność prób mierzono jak w punkcie 1 rozdziału Metody. Miarą naturalnej cytotoksyczności komórek była ilość impulsów pochodzących z uwolnionego z erytrocytów  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ , obliczana w oparciu o wzór:

$$\% \text{ uwolnionego } ^{51}\text{Cr} = \frac{A - B}{C - D} \times 100\%$$

gdzie:

- A = nadsącz zebrany po odwirowaniu próby doświadczalnej
- B - nadsącz zebrany po odwirowaniu próby zawierającej  $^{51}\text{Cr}$  uwolniony pod wpływem komórek efektorowych i surowicy zdrowego królika
- C - wyznakowanie próby zawierającej  $10^5$  komórek docelowych
- D - nadsącz zebrany po odwirowaniu próby kontrolnej, zawierającej  $^{51}\text{Cr}$  uwolniony z erytrocytów bez udziału komórek docelowych, pod wpływem surowicy skierowanej przeciwko erytrocytom

1/ N a t u r a l n a c y t o t o k s y c z n o ś ć  
k o m ó r e k N K. Przygotowanie komórek docelowych. Używa-  
no komórek ludzkiej linii nowotworowej K 562 /Karolinska Insti-  
tutet/ rosnących w podłożu hodowlanym w postaci zawiesiny,

w ciągłej hodowli in vitro. Do hodowli komórek K 562 używano płynu RPMI-1640 z L glutaminą, uzupełnionego Gentamycyną /Sigma/ w stężeniu 10 ug/ml i 10% płodowej surowicy cielejącej, pozbawionej dopełniacza. Komórki K 562 w stężeniu  $3 \times 10^6$  komórek/ml podłoża hodowlanego znakowano przy użyciu 100 uCi  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  /OPiDJ, Swierk/ przez 90 min., w temp.  $37^\circ\text{C}$ , kilkakrotnie mieszając. Następnie komórki płukano trzykrotnie płynem RPMI-1640 z L glutaminą i HEPES. Do testu używano zawiesiny o stężeniu  $10^5$  komórek K 562/ml podłoża hodowlanego. Test wykonywano w okrągłodennych płytkach /Linbro/. Do wgłębień płytki nalewano po 100 ul zawiesiny badanych komórek efektorowych i 100 ul wyznakowanych komórek K 562. Komórki efektorowe przygotowywano w stężeniach zapewniających stosunek 40:1, 20:1, 10:1 i 5:1 komórek efektorowych do komórek docelowych.

Miarą spontanicznego uwolnienia  $^{51}\text{Cr}$  były próby zawierające komórki docelowe i podłoża hodowlane, bez obecności komórek efektorowych. Miarą maksymalnego uwolnienia  $^{51}\text{Cr}$  były próby zawierające komórki docelowe i 100 ul 2% roztworu Triton x 100.

Płytkę z próbami umieszczano na 18 godz. w temp.  $37^\circ\text{C}$  i atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w powietrzu. Po tym okresie czasu płytkę wirowano przy 2000 obr. przez 5 min. i z każdego wgłębienia płytki wybierano 100 ul nadsącza, który przenoszono do odpowiedniej probówki /53/. Radioaktywność prób mierzono w liczniku typu  $\gamma$  /Beckmann 4000/..

Miarą naturalnej cytotoksyczności komórek była ilość impulsów pochodzących z uwolnionego z komórek K 562  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ , obliczana w oparciu o wzór:

$$\% \text{ uwolnionego } ^{51}\text{Cr} = \frac{A - B}{C - B} \times 100\%$$

gdzie:

A = nadsącz zebrany po odwirowaniu próby doświadczalnej

B = nadsącz zebrany po odwirowaniu próby zawierającej  
 $^{51}\text{Cr}$  uwolniony spontanicznie

C = nadsącz zebrany po odwirowaniu próby zawierającej  
 $^{51}\text{Cr}$  uwolniony pod wpływem Triton x 100.

F. M e t o d y s t a t y s t y c z n e. Uzyskane wyniki interpretowano w postaci wartości bezwzględnych /X/. Z wyników kolejnych pomiarów w grupach wyliczano średnie  $\bar{x}$ , odchylenie standardowe /SD/ i standardowe błędy średnich /SE/.

Przy ocenie istotności różnic między wynikami pomiarów w jednej grupie /różnice między komórkami chłonki i komórkami krwi tego samego psa/ zastosowano test t-Studenta dla par pomiarów, przyjmując drugi poziom istotności  $p = 0,1$ .

Przy ocenie istotności różnic między wynikami pomiarów uzyskanymi w różnych grupach doświadczalnych, porównywano średnie między sobą, posługując się metodą analizy wariancji i testem t-Studenta dla równych lub różnych wariancji, przyjmując poziom istotności  $p = 0,05$  /96/.

#### 4. W Y N I K I

##### Ż y w o t n o ś ć   k o m ó r e k .

Żywotność komórek uzyskiwanych z chłonki przedwężłowej i krwi obwodowej wahała się w granicach 90-98%, we wszystkich grupach doświa dczalnych.

##### Immunoglobuliny powierzchniowe klasy IgG.

W pełnej populacji komórek chłonki przedwężłowej stwierdzono za ledwie 1-2% komórek z immunoglobulinami powierzchniowymi klasy IgG. Zjawisko to obserwowano we wszystkich badanych grupach doświadcza lnych.

##### Grupa I. Chłonka przedwężłowa psów zdrowych.

Przeciętna liczba leukocytów w chłonce przedwężłowej wynosiła  $0,23 \times 10^3$  komórek w  $\text{mm}^3$ , zaś w krwi  $12,88 \times 10^3$  komórek w  $\text{mm}^3$  /Tabela 1/. Różnica ta była statystycznie znamienne / $p < 0,001$ /.

Chłonka przedwężłowa psów zdrowych zawierała przeciętnie 39,75% limfocytów, podczas gdy krew obwodowa 43,18% /Tabela 2/. Przeciętna liczba monocytów w chłonce wynosiła 27,12%, zaś gra nulocytów 33,12%. W krwi obwodowej było odpowiednio 13,68% i 42,5%. Liczba jednojądrzastych komórek esterazo-pozytywnych wynosiła w chłonce 20,36%, zaś w krwi 7,6%.

Różnica w zawartości monocytów i komórek esterazo-pozytywnych między chłonką a krwią była statystycznie znamienne /odpowiednio  $p < 0,001$  i  $p < 0,1$ /.

Procent limfocytów i granulocytów był podobny w chłonce i w krwi.

Populacja komórek nieprzylegających chłonki składała się przeciętnie w 50,4% z limfocytów /w krwi 52,4%/, w 27,8% z monocytów /w krwi 3,2%,/ w 21,8% z granulocytów /w krwi 44,4%, w 17,8% z komórek esterazo-pozytywnych /w krwi 12,8%//Tabela 3/. Statystycznie znamiennej różnicę między populacją komórek nieprzylegających chłonki i krwi stwierdzono w stosunku do monocytów /  $p < 0,02$ /.

W populacji komórek przylegających chłonki stwierdzono przeciętnie 12,8% limfocytów /w krwi 4,0%/, 31,4% monocytów /w krwi 45,2%/, 55,8% granulocytów /w krwi 50,8%/, 42,0% komórek esterazo-pozytywnych /w krwi 45,4%/ /Tabela 4/.

Niewielkie różnice ilościowe między chłonką a krwią stwierdzono w populacji limfocytów, natomiast monocytów, granulocytów i komórek esterazo-pozytywnych było tyle samo w chłonce co i w krwi.

Rozetki E aktywne tworzyło w chłonce przeciętnie 19,6% komórek jednojądrzastych pełnej populacji komórkowej, podczas gdy w krwi 13,6% komórek /Tabela 5/. W populacji komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono przeciętnie 16,6% komórek tworzących rozetki E aktywne, w krwi odpowiednio 9,8%./ $p < 0,05$ /.

Procent rozetek E ocenianych po 1 godz.inkubacji w temp. 4°C wynosił w pełnej populacji komórek chłonki przeciętnie 23,2%, zaś w krwi 12,0% / $p < 0,05$ /. W populacji komórek nieprzylegających chłonki procent rozetek E wynosił 21,0%, zaś krwi 11,8% / $p < 0,05$ /. /Tabela 6/

Rozetki EA w pełnej populacji komórek chłonki tworzyło 12,4% komórek jednojądrzastych, zaś w krwi 12,0%. W populacji

komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono 4,8% rozetek EA, zaś w krwi 11,0% / $p < 0,02$ /.

W populacji komórek przylegających procent komórek tworzących rozetki EA wynosił 15,4% w chłonce i 11,2% w krwi /Tabela 7/.

Rozetki EAC tworzyło 12,2% komórek jednojądrzastych pełnej populacji komórkowej chłonki i 9,25% komórek krwi. W populacji komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono 8,2% komórek tworzących rozetki EAC, zaś w krwi 10,4%. W populacji komórek przylegających wartości te wynosiły odpowiednio 20,4% oraz 21,4% /Tabela 8/.

Przeciętny poziom spontanicznego wbudowywania  $^3\text{H}$ -tymidyny przez komórki chłonki wynosił 1,04 impulsów/min.  $\times 10^3$ , zaś przez komórki krwi 0,5 imp./min.  $\times 10^3$ .

Dodanie PHA powodowało wzrost liczby impulsów/min.  $\times 10^3$  o 1,23 w przypadku komórek chłonki i o 5,92 w przypadku komórek krwi. Po dodaniu ConA liczba impulsów wbudowywanej  $^3\text{H}$ -tymidyny wzrastała w porównaniu z kontrolą o 3,44 imp./min.  $\times 10^3$  w przypadku komórek chłonki i o 5,38 imp./min.  $\times 10^3$  w przypadku komórek krwi /Tabela 9/.

Autotransformacja blastyczna komórek chłonki była statystycznie znacznie wyższa niż komórek krwi / $p < 0,05$ / . PHA pobudzała silniej komórki krwi obwodowej niż chłonki przedwężłowej / $p < 0,02$ / . Nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic w wielkości pobudzenia komórek chłonki i krwi przez ConA.

Komórki chłonki odpowiadały stosunkowo słabo na PHA, natomiast znacznie silniej na ConA / $p < 0,02$ / . Komórki krwi obwodowej odpowiadały w jednakowym stopniu na oba mitogeny.



Aktywność cytotoksyczna naturalnie istniejących komórek K w chłonce, mierzona % specyficznie uwolnionego  $^{51}\text{Cr}$ , wynosiła przy stosunku komórek efektorowych do docelowych 4:1 przeciętnie 17,37, przy stosunku 2:1 14,38, przy stosunku 1:1 13,08, przy stosunku 1:2 7,4 i przy stosunku 1:4 2,8, zaś w krwi odpowiednio 8,52, 14,18, 16,38, 13,5 i 9,63 /Tabela 10/.

Różnice w poziomie cytotoksyczności komórek chłonki i krwi stwierdzono tu jedynie przy stosunku komórek efektorowych do docelowych 4:1 i 1:4, przy pozostałych stosunkach różnic nie obserwowano. Stopień cytotoksyczności komórek chłonki zmniejszał się w miarę zmniejszającego się stosunku komórek efektorowych do docelowych, w porównaniu z krwią.

Aktywność cytotoksyczna naturalnie istniejących komórek NK w chłonce, mierzona % specyficznie uwolnionego  $^{51}\text{Cr}$  wynosiła przy stosunku komórek efektorowych do docelowych 40:1 18,26, przy stosunku 20:1 6,92, przy stosunku 10:1 5,3 i przy stosunku 5:1 4,5, zaś w krwi odpowiednio 15,1, 8,07, 5,95 i 3,21. Nie stwierdzono tu statystycznie znamiennej różnicy między cytotoksycznością komórek chłonki i krwi /Tabela 11/.

#### Grupa II. Chłonka przedwężłowa psów z ostrym zastojem chłonnym.

W chłonce przedwężłowej stwierdzono przeciętnie 0,13 leukocytów w  $\text{mm}^3 \times 10^3$ , zaś w krwi obwodowej 12,23 leukocytów w  $\text{mm}^3 \times 10^3$ . Różnica ta była statystycznie znamienna / $p < 0,01$ / /Tabela 1/.

Pełna populacja komórek chłonki zawierała przeciętnie 34,25% limfocytów /w krwi 41,58%/ , 29,41% monocytów /w krwi 41,08%/ , 41,66% granulocytów /w krwi 47,38%/ oraz 22,44% komórek

esterazo-pozytywnych /w krwi 14,28%/. W chłonce przedwężłowej obecnych było więcej monocytów niż w krwi obwodowej / $p < 0,001$ /, natomiast różnice w pozostałych populacjach komórkowych między chłonką i krwią nie były statystycznie znamienne. /Tabela 2/

W populacji komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono przeciętnie 56,2% limfocytów /w krwi 38,0%/, 9% monocytów /w krwi 5,6/, 34,8% granulocytów /w krwi 56,4%/ oraz 10,4% komórek esterazo-pozytywnych /w krwi 14,0%/. Statystycznie znamienne różnice między chłonką i krwią obserwowano w przypadku limfocytów / $p < 0,05$ / i granulocytów / $p < 0,05$ /. Nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic między chłonką i krwią w zawartości monocytów /Tabela 3/.

W populacji komórek przylegających stwierdzono w chłonce 14,2% limfocytów /w krwi 14,0%/, 23,8% monocytów /w krwi 34,8%/, 62,0% granulocytów /w krwi 51,2%/ oraz 22,33% komórek esterazo-pozytywnych /w krwi 48,0%/. Chłonka zawierała w porównaniu z krwią statystycznie znamienne mniej monocytów / $p < 0,001$ /, natomiast więcej granulocytów / $p < 0,02$ / /Tabela 4/.

Rozetki E aktywne tworzyło w pełnej populacji komórek chłonki 33,66% komórek, zaś w krwi 17,0% / $p < 0,05$ /. W populacji komórek nieprzylegających chłonki rozetki E aktywne tworzyło 16,8% komórek, zaś w krwi 15,8% /Tabela 5/.

Rozetki E oceniane po 1 godz. inkubacji w temp. 4°C tworzyło w chłonce 27,0% komórek, zaś w krwi 16,6% komórek pełnej populacji. W populacji komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono 18,6% komórek tworzących rozetki E, zaś w krwi 16,6% /Tabela 6/.

Pełna populacja komórkowa chłonki zawierała więcej komórek tworzących rozetki E niż populacja krwi obwodowej / $p < 0,01$ /.

Rozetki EA tworzyło 20% komórek pełnej populacji komórkowej chłonki, zaś tylko 11% komórek krwi / $p < 0,05$ /. W populacji komórek nieprzylegających stwierdzono w chłonce 5,8% rozetek EA, zaś w krwi 15,4% / $p < 0,01$ /. Komórki przylegające chłonki i krwi tworzyły rozetki EA w jednakowym procencie /Tabela 7/.

Rozetki EAC tworzyło 19,33% komórek pełnej populacji chłonki i 9,33% komórek krwi obwodowej / $p < 0,3$ /. W populacji komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono obecność 14,6% komórek tworzących rozetki EAC, zaś w krwi 17,2% komórek. W populacji komórek przylegających chłonki obserwowano przeciętnie 25% rozetek EAC, zaś w krwi 26,0%.

W żadnej z badanych populacji komórkowych nie stwierdzono różnic między komórkami chłonki i krwi w tworzeniu rozetek EAC /Tabela 8/.

Przeciętny poziom spontanicznego wbudowywania  $^3\text{H}$ -tymidyny przez komórki chłonki wynosił  $1,12 \text{ imp./min.} \times 10^3$ , zaś przez komórki krwi  $0,69 \text{ imp./min.} \times 10^3$ . Dodanie PHA powodowało wzrost liczby impulsów wbudowanej  $^3\text{H}$ -tymidyny o  $2,6 \text{ imp./min.} \times 10^3$  w przypadku komórek chłonki i o  $4,66 \text{ imp./min.} \times 10^3$  w przypadku komórek krwi. Po dodaniu ConA liczba impulsów wbudowanej  $^3\text{H}$ -tymidyny wzrosła w porównaniu z kontrolą o  $44 \text{ imp./min.} \times 10^3$  w przypadku komórek chłonki i o  $3,1 \text{ imp./min.} \times 10^3$  w przypadku komórek krwi /Tabela 9/.

Autotransformacja blastyczna komórek chłonki była statystycznie znacząco wyższa niż komórek krwi / $p < 0,05$ /. PHA pobudzała

silniej komórki krwi obwodowej niż chłonki przedwężłowej / $p < 0,05$ /. Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w wielkości pobudzenia komórek chłonki i krwi przez ConA. Komórki chłonki odpowiadały stosunkowo słabo na PHA, natomiast silniej na ConA / $p < 0,1$ /. Komórki krwi obwodowej odpowiadały w jednakowym stopniu na oba mitogeny.

Aktywność naturalnie cytotoksycznych komórek K chłonki, mierzona % specyficznie uwolnionego  $^{51}\text{Cr}$ , przy stosunku 4:1 komórek efektorowych do docelowych wynosiła 22,57, przy stosunku 2:1 18,63, przy stosunku 1:1 13,83, przy stosunku 1:2 13,05, przy stosunku 1:4 1,35, zaś krwi odpowiednio 22,92, 18,33, 21,43, 11,25 i 7,75. Nie stwierdzono tutaj wyraźnych różnic w cytotoksyczności komórek chłonki i krwi, z wyjątkiem stosunku 1:4, gdzie poziom cytotoksyczności był niższy w chłonce / $p < 0,05$ / /Tabela 10/.

Aktywność cytotoksyczna komórek NK chłonki, mierzona % specyficznie uwolnionego  $^{51}\text{Cr}$ , przy stosunku komórek efektorowych do docelowych 40:1 wynosiła 12,26, przy stosunku 20:1 4,62, przy stosunku 10:1 3,1 i przy stosunku 5:1 1,7, zaś w krwi odpowiednio 5,96, 5,27, 5,77 i 4,9. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w cytotoksyczności komórek chłonki i krwi.

### Grupa III. Chłonka przedwężłowa psów z przewlekłym zastojem chłonny.

Przeciętna liczba leukocytów w chłonce wynosiła 4,7 komórek w  $\text{mm}^3 \times 10^3$ , zaś w krwi 4,2 komórek w  $\text{mm}^3 \times 10^3$ .

Liczba leukocytów w chłonce dorównywała wartościom w krwi obwodowej /Tabela 1/.

Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna pełnej populacji komórek chłonki wykazała obecność 90,5% limfocytów /w krwi 56,6%/ , 3,66% monocytów /w krwi 4,66%/ , 4,16% granulocytów /w krwi 38,66/ oraz 8,0% komórek esterazo-pozytywnych /w krwi 30,0%/ . Chłonka zawierała znacznie więcej limfocytów / $p < 0,02$ / oraz mniej granulocytów / $p < 0,02$ / i komórek esterazo-pozytywnych / $p < 0,001$ / w porównaniu z krwią obwodową /Tabela 2/.

W populacji komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono obecność 90,0% limfocytów /w krwi 60,6%/ , 5,6% monocytów /w krwi 3,8%/ , 4,4% granulocytów /w krwi 35,6%/ oraz 5,4% komórek esterazo-pozytywnych /w krwi 10,2%/ . Chłonka zawierała w porównaniu z krwią więcej limfocytów / $p < 0,02$ / i mniej granulocytów / $p < 0,02$ / /Tabela 3/.

W populacji komórek przylegających chłonki stwierdzono obecność 12% limfocytów /w krwi 4,2%/ , 49,6% monocytów /w krwi 6,4%/ i 38,4% granulocytów /w krwi 89,4%/ . Stwierdzono, iż więcej monocytów chłonki niż krwi / $p < 0,001$ / oraz mniej granulocytów / $p < 0,001$ / przylegało do powierzchni plastikowych /Tabela 4/.

Rozetki E aktywne w pełnej populacji komórek chłonki tworzyło 9,6% komórek, zaś w krwi 10,8%. W populacji komórek nieprzylegających chłonki stwierdzono 6,6% komórek tworzących rozetki E aktywne, zaś w krwi 6,2%. Nie stwierdzono tu różnic statystycznie znamiennych /Tabela 5/.

Rozetki E oceniane po 1 godz. inkubacji w temp. 4°C tworzyło w pełnej populacji chłonce 13,0% komórek, zaś w krwi 10,2% /p < 0,05/. W populacji komórek nieprzylegających obserwowano 8,6% rozetek E, zaś w krwi 6,0%. /p < 0,05/ /Tabela 6/. Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic między chłongą i krwią w odniesieniu do komórek populacji przylegającej.

Rozetki EA w pełnej populacji komórkowej chłonce tworzyło 5% komórek, zaś w krwi 9,6% /p < 0,05/. W populacji komórek nieprzylegających chłonce stwierdzono 5,8% rozetek EA, zaś w krwi 7,8% /p < 0,1/. W populacji komórek przylegających chłonce stwierdzono 20,4% rozetek EA, zaś w krwi 7,6% /p < 0,1/ /Tabela 7/.

Rozetki EAC w pełnej populacji komórek chłonce tworzyło 3% komórek, zaś w krwi 4,6%. W populacji komórek nieprzylegających chłonce stwierdzono 4% rozetek EAC, zaś w krwi 2% /p < 0,05/. W populacji komórek przylegających chłonce stwierdzono 14,2% rozetek EAC, zaś w krwi 6,2% /Tabela 8/.

Komórki chłonce wbudowywały spontanicznie znacznie więcej <sup>3</sup>H-tymidyny niż komórki krwi /p < 0,02/. W chłonce przeciętny poziom wbudowywania <sup>3</sup>H-tymidyny przez komórki wynosił 1,54 imp./min. x 10<sup>3</sup>, zaś w krwi 0,35 imp./min. x 10<sup>3</sup>. Dodanie PHA powodowało wzrost liczby impulsów o 7,06 imp./min. x 10<sup>3</sup> w przypadku komórek chłonce i o 6,18 imp./min. x 10<sup>3</sup> w przypadku komórek krwi. Po dodaniu ConA liczba impulsów wbudowywanej <sup>3</sup>H-tymidyny wzrastała o 10,91 imp./min. x 10<sup>3</sup> w przypadku komórek chłonce, zaś w przypadku komórek krwi o 4,01 imp./min. x 10<sup>3</sup>. Różnica ta była statystycznie znamienna /p < 0,001/. /Tabela 9/.

Nie stwierdzono różnic w wielkości pobudzenia komórek chłonki i krwi przez PHA. Komórki chłonki odpowiadały transformację blastyczną silniej na ConA niż PHA / $p < 0,02$ /, natomiast komórki krwi odpowiadały silniej na PHA / $p < 0,05$ /.

Aktywność cytotoksyczna komórek K chłonki, mierzona % specyficznie uwolnionego  $^{51}\text{Cr}$ , wynosiła przy stosunku komórek efektorowych do docelowych 4:1 przeciętnie 7,3, przy stosunku 2:1 8,21, przy stosunku 1:1 6,05, przy stosunku 1:2 6,3 i przy stosunku 1:4 2,82, zaś w krwi odpowiednio 13,56, 15,62, 14,85, 9,78 i 7,2 /Tabela 10/.

Wyraźnie niższą cytotoksyczność komórek K chłonki obserwowano we wszystkich stosunkach komórek efektorowych do docelowych, z wyjątkiem stosunku 1:2 /Tabela 10/.

Aktywność cytotoksyczna komórek NK chłonki, mierzona % specyficznie uwolnionego  $^{51}\text{Cr}$ , wynosiła przy stosunku komórek efektorowych do docelowych 40:1 3.9, przy stosunku 20:1 6.27, przy stosunku 10:1 4.11 i przy stosunku 1:5 3,23, zaś w krwi odpowiednio 4,78, 5.28, 5.12 i 3,65.

Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w cytotoksyczności komórek NK między chłonką i krwią /Tabela 11/.

### Porównanie wyników grup I, II i III

#### Leukocytoza w chłonce przedwężłowej i krwi.

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy między leukocytozą chłonki przedwężłowej grupy psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonnym. Leukocytoza w chłonce psów z przewle-

kłym zastojem chłonnym była wyraźnie wyższa, w porównaniu z pozostałymi grupami / $p < 0,02$ /. Różnice w leukocytozie krwi obwodowej między trzema badanymi grupami zwierząt były statystycznie nieistotne. /Tabela 1/.

Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna pełnych populacji komórkowych chłonki przedwężłowej i krwi.

Stwierdzono wyraźnie wyższy % limfocytów w chłonce psów z przewlekłym zastojem chłonnym w porównaniu z pozostałymi grupami / $p < 0,001$ /. Chłonka psów z przewlekłym zastojem zawierała niższy % monocytów / $p < 0,001$ /, chłonka psów z przewlekłym zastojem zawierała niższy % monocytów / $p < 0,001$ /, granulocytów / $p < 0,001$ / i komórek esterazo-pozytywnych / $p < 0,02$ / w porównaniu z pozostałymi grupami. Krew psów z przewlekłym zastojem zawierała również mniej monocytów / $p < 0,01$ / i komórek esterazo-pozytywnych / $p < 0,001$ / niż krew psów zdrowych.

Przy porównaniu składu morfologicznego chłonki psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonnym nie obserwowano statystycznie znamiennych różnic /Tabela 2/.

Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna populacji komórek nieprzylegających.

Eliminacja komórek przylegających spowodowała wzrost liczby limfocytów w chłonce psów zdrowych i z ostrym zastojem.

W chłonce psów z przewlekłym zastojem chłonnym % limfocytów był zdecydowanie wyższy niż w pozostałych grupach / $p < 0,001$ /.



Usunięcie komórek przylegających nie spowodowało zmniejszenia % monocytów w chłonce psów zdrowych, odwrotnie niż w przypadku chłonki psów z ostrym zastojem chłonnym. W chłonce psów z przewlekłym zastojem % monocytów również pozostał niezmienny i było ich statystycznie znacznie mniej niż w chłonce psów zdrowych  $/p < 0,001/$ . Usunięcie komórek przylegających spowodowało również obniżenie % komórek esterowo-pozytywnych we wszystkich grupach, tak że różnice w zawartości tych komórek w chłonce poszczególnych grup doświadczalnych były statystycznie nieznamienne /Tabela 3/. Brak procentowych zmian w zakresie poszczególnych populacji komórkowych po usunięciu komórek przylegających z chłonki psów z przewlekłym zastojem może świadczyć o nieobecności komórek przylegających.

W przypadku chłonki psów zdrowych i psów z ostrym zastojem zjawiska takiego nie obserwowano.

#### Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna populacji komórek przylegających.

Większość komórek przylegających, pochodzących z pełnej populacji komórek chłonki przedwężłowej, stanowiły monocyty, granulocyty i komórki esterazo-pozytywne. W populacji komórek przylegających chłonki stwierdzono ogólnie więcej limfocytów niż w krwi, lecz różnice te nie były statystycznie znamienne. Chłonka psów z przewlekłym zastojem zawierała więcej monocytów niż chłonka psów zdrowych  $/p < 0,02/$  i chłonka psów z ostrym zastojem  $/p < 0,01/$  /Tabela 4/.

Krew psów z przewlekłym zastojem zawierała natomiast zdecydowanie mniej monocytów niż krew psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonnym / $p < 0,001$ /.

#### Populacja komórek jednojądrzastych tworzących rozetki

##### E aktywne.

W grupie psów z przewlekłym zastojem chłonnym, zarówno w pełnej populacji komórek chłonki jak i w populacji komórek nieprzylegających, % komórek tworzących rozetki E aktywne był statystycznie znacznie niższy niż w grupie psów zdrowych / $p < 0,001$ /. Nie obserwowano różnic w % rozetek E aktywnych między pozostałymi grupami doświadczalnymi /Tabela 5/.

#### Populacja komórek tworzących rozetki E oceniana po 1 godz. inkubacji w temp. 4°C.

W chłonce psów z przewlekłym zastojem chłonnym, zarówno w pełnej populacji komórek jak i w populacji komórek nieprzylegających, % komórek tworzących rozetki E był niższy niż w chłonce psów zdrowych / $p < 0,001$ / i psów z ostrym zastojem chłonnym / $p < 0,001$ / /Tabela 6/.

#### Rozetki EA w chłonce przedwężłowej i krwi.

Nie stwierdzono wyraźnych różnic w % komórek tworzących rozetki EA, zarówno w pełnej populacji, w populacji komórek nieprzylegających oraz komórek przylegających, między trzema badanymi grupami /Tabela 7/.

Jedynie chłonka przedwężłowa psów z przewlekłym zastojem wykazywała zdecydowanie niski % rozetek EA w porównaniu z chłonką psów z ostrym zastojem chłonnym / $p < 0,001$ /.

#### Rozetki EAC w chłonce przedwężłowej i krwi.

Stwierdzono wyraźnie niższy % komórek tworzących rozetki EAC w chłonce psów z przewlekłym zastojem w porównaniu z pozostałymi grupami, zarówno w pełnej populacji komórkowej / $p < 0,02$ / jak i w populacji komórek nieprzylegających / $p < 0,01$ / /Tabela 8/.

#### Hodowla komórek chłonki przedwężłowej i krwi z mitogenami.

Poziom autotransformacji blastycznej komórek chłonki przedwężłowej psów zdrowych, psów z ostrym zastojem chłonnym i psów z przewlekłym zastojem chłonnym był podobny. Nie stwierdzono tu różnic statystycznie znamiennej. Stopień autotransformacji komórek chłonki był zawsze statystycznie znamiennej wyższy niż komórek krwi, we wszystkich grupach doświadczalnych / $p < 0,05$ /.

Komórki chłonki psów z przewlekłym zastojem chłonnym odpowiadały zdecydowanie silniej na PHA niż komórki chłonki pozostałych dwóch grup / $p < 0,001$ /.

Podobnie, wysoce statystycznie znamiennej różnicę obserwowano w przypadku odpowiedzi komórek chłonki psów z przewlekłym zastojem na ConA / $p < 0,001$ /.

Komórki krwi obwodowej psów ze wszystkich grup doświadczalnych odpowiadały w jednakowym stopniu na oba mitogeny /Tabela 9/.

Aktywność cytotoksyczna komórek K w chłonce przedwężłowej i krwi.

Stwierdzono niższą aktywność cytotoksyczną komórek chłonki psów z przewlekłym zastojem chłonnym w porównaniu z komórkami chłonki psów z ostrym zastojem / $p < 0,02$ / i niewiele niższą w porównaniu z komórkami chłonki psów zdrowych / $p < 0,1$ /. Różnice w poziomie cytotoksyczności komórek K krwi psów z trzech badanych grup były w większości przypadków statystycznie nieznamienne. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w poziomie komórek K między chłonką psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonnym, natomiast wyraźnie więcej komórek K obserwowano w krwi psów z ostrym zastojem w porównaniu z krwią psów zdrowych, przy stosunku 4:1 komórek efektorowych do docelowych / $p < 0,02$ / /Tabela 10/.

Aktywność cytotoksyczna komórek NK w chłonce przedwężłowej i krwi.

Aktywność cytotoksyczna komórek NK chłonki była podobna we wszystkich grupach doświadczalnych. Jedynie przy stosunku 40:1 komórek efektorowych do docelowych stwierdzono zmniejszoną aktywność komórek NK w chłonce psów z przewlekłym zastojem w porównaniu z chłonką psów zdrowych / $p < 0,001$ / i psów z ostrym zastojem chłonnym / $p < 0,02$ /. Różnice w cytotoksyczności komórek NK pochodzących z krwi obwodowej psów wszystkich badanych grup doświadczalnych nie były statystycznie istotne /Tabela 11/.

## 5. O M O W I E N I E W Y N I K O W

Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie różnic w składzie komórkowym między chłonką przedwężłową psów zdrowych oraz krwią obwodową, a także między chłonką psów zdrowych i chłonką pochodzącą z naczyń chłonnych, przewlekłe niedrożnych. Stanowią one podstawę do dalszych badań, mających na celu próbę wyjaśnienia zdolności migrowania niektórych populacji leukocytów przez tkanki nielimfatyczne w warunkach fizjologicznych i określenia funkcji leukocytów jakie mają do spełnienia w tkankach. Skład komórkowy chłonki psów z ostrym zastojem chłonny w ogromnej większości badanych parametrów nie różnił się od składu chłonki psów zdrowych. Różnice w składzie komórkowym między chłonką psów z ostrym zastojem chłonny i krwią obwodową również były w większości badanych parametrów podobne do różnic obserwowanych w grupie psów zdrowych. Stwierdzono, iż liczba leukocytów w chłonce przedwężłowej psów zdrowych oraz psów z ostrym zastojem chłonny była przeciętnie 60 razy mniejsza niż w krwi obwodowej. Potwierdza to obserwacje poczynione u innych gatunków zwierząt oraz u ludzi /30,56,92/. Świadczyłyby to o ograniczeniu spontanicznej migracji leukocytów z krążenia krwionośnego przez tkanki do naczyń chłonnych doprowadzających i regionalnego węzła chłonnego. Prawdopodobnie tylko niektóre populacje leukocytów lub też ich mniej lub bardziej dojrzałe formy posiadają zdolności migrowania do tkanek. Pytanie, które z nich mają tę zdolność pozostaje kwestią otwartą. Liczba leukocytów

w chłonce psów z przewlekłym zastojem chłonnym była natomiast około 20 razy wyższa niż w chłonce psów zdrowych i w niektórych przypadkach dorównywała liczbie leukocytów w  $\text{mm}^3$  krwi. Tak wysokie stężenie komórek w chłonce psów z zastojem przewlekłym można tłumaczyć utrudnieniem lub brakiem odpływu chłonki z naczyń chłonnych przedwężłowych do dalszych odcinków naczyniowego układu chłonnego, spowodowanym niedrożnością naczyń, przy stałym przechodzeniu leukocytów z krwi do tkanek i początkowych naczyń chłonnych. Należy brać również pod uwagę możliwość proliferacji komórek chłonki z zastoju chłonnego, na co wskazuje wysoki poziom autotransformacji blastycznej komórek chłonki obserwowany w tej grupie psów.

W pełnej populacji komórek chłonki przedwężłowej psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonnym metodami morfologicznymi stwierdzono obecność około 40% limfocytów, około 30% monocytów oraz około 40% granulocytów. Na uwagę zasługuje wysoki procent granulocytów. Nieco mniejsze nagromadzenie granulocytów w chłonce przedwężłowej obserwowano u owiec, natomiast u królików poddawanych działaniu pentobarbitalu granulocyty stanowiły 30% komórek chłonki /72,131/. Użycie innego środka znieczulającego nie powodowało tak znacznego gromadzenia granulocytów w chłonce przedwężłowej królików. U człowieka w chłonce przedwężłowej kończyn granulocyty spotykane są jedynie wyjątkowo /132/. Przyczyną obecności w chłonce przedwężłowej psów dużej liczby granulocytów może być również "fizjologiczne" zakażenie skóry łap psa. Morfologiczna ocena komórek jednojądrzastych chłonki przedwężłowej nie jest łatwa i wielokrotnie odróżnienie postaci monocytarnych od limfocytów

jest utrudnione. Badanie zdolności fagocytarnych monocytów nie jest tutaj pomocne, ponieważ większość komórek chłonki przedwężłowej nie fagocytuje ani latexu ani standardowych, laboratoryjnych szczepów drobnoustrojów /obserwacje własne/. W pełnej populacji komórek chłonki psów z przewlekłym zastojem przeważały limfocyty, które stanowiły około 90% populacji, podczas gdy monocytów i granulocytów było po kilka procent. Nagromadzenie limfocytów w chłonce zastoją przewlekłego i mały procent monocytów w tej populacji jest trudny do wytłumaczenia. Niezrozumiałym byłby bowiem mechanizm ewentualnego ograniczenia możliwości przechodzenia monocytów z układu krwionośnego przez tkanki do początkowych naczyń chłonnych. W przewlekłym zastoją chłonnym dochodzi do zmian strukturalnych wokół oraz w samych naczyniach chłonnych, m.in. powstaje tzw. pseudobłona podstawna. Gdyby struktura ta była odpowiedzialna za utrudnione przechodzenie komórek, dotyczyłoby to zarówno monocytów jak i limfocytów. Być może ocena morfologiczna i klasyfikacja komórek nie była właściwa, lecz jak wspomniano metody oceny monocytów w przypadku chłonki są utrudnione.

Usunięcie z pełnej populacji komórek chłonki psów zdrowych komórek przylegających do powierzchni plastikowych powodowało wzrost procentu limfocytów w populacji komórek nieprzylegających. Nie stwierdzono natomiast zmian w procentowej zawartości monocytów. Może to świadczyć o tym, iż komórki zaliczane morfologicznie do monocytów nie należą do frakcji przylegającej do powierzchni i są postaciami limfoidalnymi. Dla porównania, procent komórek krwi zaliczanych przez nas

na podstawie oceny morfologicznej do monocytów ulegał znacznemu obniżeniu po usunięciu komórek przylegających.

Usunięcie komórek przylegających z chłonki psów z przewlekłym zastojem nie zmieniało jej składu komórkowego. Świadczyłoby to o obecności w tej chłonce znikomego procentu komórek mających zdolność przylegania do powierzchni. Usunięcie komórek przylegających z chłonki psów z ostrym zastojem chłonnym powodowało wzrost procentu limfocytów w populacji komórek nieprzylegających, podobnie jak w grupie psów zdrowych.

Fracja komórek przylegających chłonek ze wszystkich grup doświadczalnych zawierała głównie monocyty oraz granulocyty, a także pewien procent komórek zaliczanych morfologicznie do limfocytów.

W chłonce psów zdrowych stwierdzono większy procent komórek tworzących rozetki E aktywne w porównaniu z krwią. Wyższy procent rozetek E aktywnych w chłonce obserwowano zarówno w przypadku populacji pełnej, jak i populacji komórek nieprzylegających. Wyniki te potwierdzają obserwacje innych autorów /47,82/ dotyczące obecności wyższego procentu limfocytów tworzących rozetki E aktywne w płynach ustrojowych w porównaniu z krwią obwodową. U psów z przewlekłym zastojem chłonnym nie stwierdzono różnicy zawartości komórek tworzących rozetki E aktywne między chłonką a krwią. Jednak procent komórek tworzących rozetki E aktywne w chłonce zastoju przewlekłego był zdecydowanie niższy niż w chłonce psów zdrowych, zarówno w pełnej populacji komórek, jak i w populacji komórek nieprzylegających. Świadczyłoby to o pewnym zubożeniu populacji



komórek chłonki psów z przewlekłym zastojem chłonnym w komórki tworzące spontaniczne rozetki z erytrocytami człowieka. Zubożenie to dotyczy tylko komórek chłonki, bowiem komórki krwi wszystkich grup doświadczalnych tworzyły rozetki E aktywne w podobnym procencie. Procentowa zawartość komórek tworzących rozetki E, które oceniano po 1 godz. inkubacji w temp. 4 °C, była podobna do zawartości komórek tworzących rozetki E aktywne, zarówno w przypadku chłonki psów zdrowych jak i psów z zastojem chłonnym. Pełna populacja komórkowa chłonki psów z przewlekłym zastojem chłonnym zawierała mniej komórek tworzących rozetki EA niż krew obwodowa. Frakcja komórek nieprzylegających chłonki psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonnym zawierała również mniejszy procent komórek tworzących rozetki EA w porównaniu z krwią obwodową. Świadczyłoby to o pewnym zubożeniu chłonki przedwężłowej w komórki posiadające receptor Fc IgG w porównaniu z krwią. Potwierdza to wyniki badań przeprowadzonych u ludzi, gdzie również obserwowano niższy procent rozetek EA tworzonych przez komórki chłonki przedwężłowej kończyn w porównaniu z krwią /81/. W przypadku komórek pełnej populacji komórkowej chłonki psów z ostrym zastojem chłonnym obserwowano wyższy procent rozetek EA w porównaniu z krwią, co mogło być spowodowane stanem zapalnym w badanej kończynie.

Procentowa zawartość komórek tworzących rozetki EAC w chłonce psów zdrowych i chłonce psów z ostrym zastojem była zarówno w pełnej populacji komórek jak i w populacji komórek nieprzylegających taka sama jak u krwi obwodowej. W chłonce zastoju przewlekłego stwierdzono zdecydowanie niski procent

komórek tworzących rozetki EAC, w porównaniu z chłonką psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonnym. Nie stwierdzono różnic między chłonką i krwią w zawartości komórek z receptorem dla C3. Dane te różnią się od wyników badań u ludzi, gdzie obserwowano niższy procent rozetek EAC w chłonce niż w krwi obwodowej /81/. Mały procent komórek z receptorem FcIgG i komórek z immunoglobulinami powierzchniowymi klasy IgG może być spowodowany wolniejszym przechodzeniem limfocytów B z krążenia do tkanek limfatycznych i nielimfatycznych, co zostało zaobserwowane w badaniach Forda /111/.

We wszystkich badanych grupach stwierdzono statystycznie znamienne wyższy poziom autotransformacji blastycznej komórek chłonki przedwężłowej w porównaniu z komórkami krwi obwodowej. Wysoka autotransformacja komórek chłonki miała miejsce w warunkach in vivo, a wbudowywanie  $^3\text{H}$ -tymidyny po 2 godz. hodowli było tak samo wysokie jak po 48 godz. hodowli. Może to być wynikiem stałego pobudzania limfocytów chłonki przedwężłowej przez antygeny środowiska zewnętrznego, które wnikają przez skórę i są transportowane do regionalnego węzła chłonnego. Możliwość zakażenia chłonki w czasie pobierania materiału do badania została wykluczona, ponieważ badania bakteriologiczne wykazywały jałowość pobieranej chłonki.

Aby wykluczyć wpływ ewentualnego zakażenia na wysoki poziom autotransformacji komórek chłonki, podawano grupie psów antybiotyk przez 5 kolejnych dni i nie stwierdzono obniżenia się autotransformacji w porównaniu z dniem 0. Limfocyty chłonki psów zdrowych i psów z ostrym zastojem odpowiadały w transformacji blastycznej pod wpływem PHA słabiej niż komórki krwi,

podczas gdy odpowiedź na ConA była podobna do odpowiedzi komórek krwi na ten mitogen. Limfocyty chłonki przedwężłowej odpowiadały silniej na ConA niż na PHA, podczas gdy komórki krwi odpowiadały na oba mitogeny w jednakowym stopniu. Mogłoby to świadczyć o obecności w chłonce przedwężłowej limfocytów, które różnią się od limfocytów krwi stopniem dojrzałości immunologicznej /116,124,136/. Limfocyty chłonki psów z przewlekłym zastojem również odpowiadały silniej na ConA niż PHA, a odpowiedź ta była statystycznie znamienne wyższa od odpowiedzi limfocytów chłonki psów zdrowych i psów z ostrym zastojem chłonny. Silna odpowiedź komórek chłonki z przewlekłego zastoju na oba mitogeny jest trudna do wytłumaczenia. Być może komórki chłonki zostały już in vivo pobudzone podprogowo przez antygeny fizjologicznie wnikające do naczyń chłonnych przedwężłowych i dodanie mitogenów uwydatniło ten proces.

Poziom natura-nej cytotoksyczności zależnej od komórek K w chłonce psów zdrowych był przy najwyższym stosunku komórek efektorowych do docelowych wyższy niż w krwi obwodowej. Przy najniższym stosunku komórek efektorowych do docelowych stwierdzono znamienne obniżenie aktywności cytotoksycznej komórek K w chłonce przedwężłowej w porównaniu z komórkami krwi, obserwowane we wszystkich grupach doświadczalnych.

W chłonce zastoju przewlekłego aktywność cytotoksyczna komórek K była zdecydowanie niższa w porównaniu z krwią, co może świadczyć o jej zubożeniu w komórki K. Równolegle w chłonce zastoju przewlekłego obserwowano bowiem niski procent komórek z receptorem Fc IgG, którego obecność konieczna jest dla wyrażenia aktywności cytotoksycznej komórek K /61/.

Aktywność cytotoksyczna komórek K chłonki zastoju przewlekłego była zdecydowanie niższa od aktywności komórek chłonki zastoju ostrego.

Poziom naturalnej cytotoksyczności komórek NK chłonki, skierowanej przeciwko nowotworowym komórkom K 562, był we wszystkich grupach doświadczalnych podobny do poziomu cytotoksyczności komórek NK w krwi obwodowej. Brak różnic w aktywności cytotoksycznej był zaskakujący, gdyż w przypadku innych zwierząt obserwowano niską aktywność komórek NK w węzłach chłonnych oraz niską aktywność komórek NK w chłonce przedwzłowej ludzi w porównaniu z krwią obwodową /81, 106, 120/.

U psa aktywność cytotoksyczna komórek NK jest wyrażona niskimi wartościami liczbowymi, co mogło wpłynąć na zmniejszenie czytelności różnic w aktywności komórek chłonki i krwi.

U psów z przewlekłym zastojem chłonnym obserwowano zdecydowanie niższą aktywność komórek NK w chłonce w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi.

Niską aktywność komórek NK obserwowano również w krwi obwodowej tych psów, co mogło być spowodowane ich zaawansowanym wiekiem, wynikającym z długoletniego utrzymywania psów dla uzyskania przewlekłego zastoju chłonnego.

P O D S U M O W A N I E I W N I O S K I

1. Przez skórę i tkankę podskórną migrują fizjologicznie z krwi do chłonki przedwężłowej limfocyty, monocyty i granulocyty, lecz ich liczba w chłonce jest kilkadziesiąt razy mniejsza niż w krwi.
2. Większy odsetek jednojądrzastych komórek chłonki prawidłowej w porównaniu z krwią tworzy spontanicznie rozetki E, natomiast mniej komórek chłonki niż krwi wykazuje obecność powierzchniowych immunoglobulin i receptora Fc IgG. Komórki chłonki przedwężłowej charakteryzują się w porównaniu z komórkami krwi wysokim stopniem autotransformacji blastycznej oraz silniejszą odpowiedzią na Con A niż na PHA. Może to świadczyć o obecności w chłonce przedwężłowej komórek o niższym stopniu dojrzałości. Komórki K chłonki przedwężłowej wykazują niższą cytotoksyczność zależną od przeciwciał w porównaniu z komórkami K krwi. Cytotoksyczna aktywność komórek NK chłonki przedwężłowej, skierowana przeciwko komórkom linii K 562 jest podobna do aktywności komórek NK krwi obwodowej.
3. Trwałe przerwanie drogi recyrkulacji komórek chłonki, w tym i migracji do regionalnego węzła chłonnego powoduje gromadzenie się w chłonce znacznych ilości komórek, głównie limfocytów. Mniejszy odsetek komórek chłonki z zastoju przewlekłego w porównaniu z chłonką prawidłową tworzy spontanicznie rozetki E oraz rozetki EA. Komórki chłonki z zastoju przewlekłego ulegają silniejszemu pobudzeniu

pod wpływem Con A niż PHA, a ich odpowiedź na oba mitogeny jest wyrażona mocniej niż komórek chłonki prawidłowej. Aktywność cytotoksyczna komórek K chłonki z zastoju przewlekłego jest słabsza w porównaniu z komórkami chłonki prawidłowej.

4. Fizjologiczne znaczenie różnic w składzie populacji komórek prawidłowej chłonki przedwężłowej i krwi obwodowej, oraz rola komórek migrujących spontanicznie przez tkanki wymagają osobnych badań.
5. Zubożenie chłonki z przewlekłego zastoju w komórki tworzące rozetki E i EA, oraz obniżona aktywność cytotoksyczna zależna od przeciwciał komórek K mogą częściowo tłumaczyć "immunologiczne uprzywilejowanie" tkanek z przerwanyimi drogami odpływu chłonnego. Wysoki stopień autotransformacji blastycznej i odpowiedzi na mitogeny można tłumaczyć stałym pobudzaniem komórek z miejsca zastoju chłonnego antygenami bakteryjnymi, pochodzącymi ze skóry i częściowo z rozpadłych komórek własnych.

P I S M I E N N I C T W O

1. Alexander EL, Wetzel B. Human lymphocytes: similarity of B and T cell surface morphology. Science 1975, 188:732
2. Alexander EL. Quantitation of Fc receptors and surface immunoglobulin is effected by cell isolation procedures using plasmagel and ficoll-hypaque. J. Immunol Meth 1978, 22:263
3. Altman A, Rapp HJ. Natural cell-mediated cytotoxicity in guinea pigs: properties and specificity of natural killer cells. J Immunol 1978, 121:2244
4. Anderson AO, Anderson ND. Lymphocyte emigration from high endothelium in rat lymph nodes. Immunol 1976, 31:731
5. Anderson ND, Anderson AO, Wyllie RG. Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. Immunol 1976, 31:455
6. Ansfield MJ, Kaltreider HB, Caldwell JL. Hyporesponsiveness of canine bronchoalveolar lymphocytes to mitogens: inhibition of lymphocyte proliferation by alveolar macrophages. J Immunol 1979, 122:542
7. Ascher NL, Ferguson RM, Hopfman R. Partial characterization of cytotoxic cells infiltrating sponge matrix allografts. Transpl 1979, 27:254
8. Barker CF, Billingham RE. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. J Exp Med 1968, 128:197

9. Barker CF, Billingham RE. Sceletal muscle as a privileged site for orthotopic skin allografts. *J Exp Med* 1973,138:289
10. Balch ChM. Recent advances in human cellular immunobiology. *Surg Clin N Am* 1979, 59:235
11. Beall GN, Benfield JR, Kruger SR, Byfield PE. Canine lymphocytes that form rosettes with human red blood cells. *J Surg Res* 1974, 17:330
12. Berger BM. E-rosette formation at 37°C: a property of mitogen stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Cell Immunol* 1976, 26:105
13. Birnbaum G, Swick L. Human suppressor lymphocytes. *Cell Immunol* 1978, 40:16
14. Bolhuis RLH, Schnit HRE. Characterization of natural killer /NK/ cells and killer /K/ cells in human blood: discrimination between NK and K cell activities. *Eur J Immunol* 1978, 8:731
15. Bowles CA, White GS, Lucas D. Rosette formation by canine peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1975, 114:399
16. Bulletin of the World Health Organization 1972, 47:377
17. Brahim F, Bahadna G. Influx of long-lived lymphocytes into quinea pig marrow during hydrocortisone administration. *J Reticul Soc* 1979, 25:397
18. Broder S, Waldmann TA. The suppressor cell network in cancer. *N Engl J Med* 1978, 299:1281
19. Cahill RNP, Frost H, Trnka Z. The effects of antigen on migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *J Exp Med* 1976, 143:870



20. Casley - Smith JR. The medical treatment of lymphoedema. *Experientia* 1976, 32:825
21. Catovsky D, Enno A. Morphological and cytochemical identification of lymphoid cells. *Lymphology* 1977, 10:77
22. Cho Y, de Bruyn PPH. The endothelial structure of the postcapillary venules of the lymph node and passage of lymphocytes across the venule wall. *J Ultrastr Res* 1979, 69:13
23. Colley DG, James SL. Participation of eosinophils in immunological systems. W: Cellular, molecular and clinical aspects of allergic disorders, Gupta S, Good RA, eds. Plenum Publish Corp, 1979: 55
24. Crago SS, Prince S, Pretlow TG. Human colostrual cells. *Clin Exp Immunol* 1979,38: 585
25. Dalchan R, Fabre JW. Identification and unusual tissue distribution of the canine and human homologues of Thy 1. *J. Exp Med* 1979,149:576
26. David JR. Macrophage activation by lymphocytemediators. *Fed Proc* 1975,34:1730
27. Djaldetti M, Fishman P. Relationship between mitochondrial location and migration of lymphocytes across the sinusoidal wall. *J Reticul Soc* 1979,26:135
28. Durantez A, de Landazuri MO, Silva A. Comparison of the cytotoxic activities of different human lymphoid tissue. *J Clin Lab Immunol* 1979,2:59
29. Elves MW. Migration of small lymphocytes from the skin to

- the regional lymph nodes. *Nature* 1970,227:725
30. Engeset A, Hager B, Nesheim A, Kolbenstvent A. Studies on human peripheral lymph. Sampling method. *Lymphology* 1973,6:1
  31. Engeset A, Olszewski W. Variation in output of leucocytes and erythrocytes in human peripheral lymph during rest and activity. *Lymphology* 1977,100:198
  32. Evans CW, Davies MDJ. The influence of cell adhesiveness on the migratory behavior of murine thymocytes. *Cell Immunol* 1977,33:211
  33. Everett NB, Caffrey RW, Rieke WO. Recirculation of lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1964,113:887
  34. van Evijk W. Scanning electron microscopy of homing and recirculating lymphocyte populations. *Cell Immunol* 1975,19:245
  35. Fahy VA, Morris B, Trevella, Zukoski CF. The physical and functional heterogeneity of circulating lymphocyte populations. *Blood Cells* 1980,6:11
  36. Farr AG, de Bruyn PPH. The mode of lymphocyte migration through postcapillary venule endothelium in lymph node. *Am J Anat* 1975,143:59
  37. Fauci AS, Dale D. The effect of in vivo hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J Clin Invest* 1974, 53:240
  38. Fauci AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. *Immunol* 1975,28:669
  39. Ferrarini M, Hoffman T. Receptors for IgM on certain human

B lymphocytes. *J Immunol* 1977, 119:1525

40. Foldi M. Diseases of lymphostasis. *Experientia* 1976, 32:822
41. Ford WL. The immunological and migratory properties of the lymphocytes recirculating through the rat spleen. *Br J Exp Pathol* 1969, 50:257
42. Ford WL, Smith ME, Andrews P. Possible clues to the mechanism underlying the selective migration of lymphocytes from the blood. W; Cell-cell recognition. Curtis ASG, ed. Cambridge Univ Press, 1978:359
43. Fossum S. Non-specific acid esterase activity in rat lymphocytes. *Scand J Immunol* 1978, 8:273
44. Freitas AA, de Sousa M. The role of cell interactions in the control of the lymphocyte traffic. *Cell Immunol* 1976, 22:345
45. Frost H. The effect of antigen on output of recirculating T and B lymphocytes from single lymph nodes. *Cell Immunol* 1978, 37:390
46. Fujii T, Nishiki M, Kodama O. Method for simultaneous identification of T and B lymphocytes by permanent slide fixation. *Hirosh J Med Sci* 1978, 27:67
47. Galili V, Rosenthal L, Galili N, Klein E. Activated T cells in the synovial fluid of arthritic patients. *J Immunol* 1979, 122:878
48. Gesner BM. Cell surface sugars as sites of cellular reactions: possible role in physiological processes. *Ann N Y Acad Sci* 1966, 129:758

49. Godal T, Engeset A. A preliminary note on the composition of lymphocytes in human peripheral lymph. *Lymphology* 1978, 11:209
50. Goldfarb PM, Hardy MA. The immunologic responsiveness of regional lymphocytes in experimental cancer. *Cancer* 1975, 35:778
51. Goodwin JS, Webb DR. Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin Immunol Immunopath* 1980, 15:106
52. Gowans JL, Knight EJ. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc Roy Soc B* 1964, 159:257
53. Gupta S, Fernandes G, Nair M, Goog RA. Spontaneous and antibodydependent cell mediated cytotoxicity by human T cell subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978,75:5137
54. Hall JG, Morris B. The origin of cells in the efferent lymph from a single lymph node. *J Exp Med* 1965,121:901
55. Hall JG. Studies of cells in afferent and efferent lymph of lymph nodes draining the site of skin homografts. *J Exp Med* 1967,125:737
56. Hall J, Scollay R, Smith M. Studies on the lymphocytes of sheep. *Eur J Immunol* 1976,6:117
57. Hall J. Lymphocyte recirculation and the gut: the cellular basis of humoral immunity in the intestine. *Blood Cells* 1979,5:479
58. Harada M, Ishino Ch, Mori T. Active rosette forming cells as a possible functional subpopulation of human peripheral T lymphocytes. *Jap J Exp Med* 1977,47:489

59. Hawes CS, Kemp AS, Jones WR. Random monocytemigration: an in vitro correlation with the delayed hypersensitivity skin reaction. Clin Exp Med 1979, 37:567
60. Hay JH, Cahill RNP, Trnka Z. The kinetics of antigen-reactive cells lymphocyte recruitment. Cell Immunol 1974, 10:145
61. Herberman RB, Djen JY, Kay HD, Ortaldo JR. Natural killer cells: characteristics and regulation of activity, Immunol Rev 1979, 44:43
62. Ho CK, Babiuk LA. Isolation of various canine leucocytes and their characterization by surface marker analysis. Immunol 1978, 35:733
63. Hollingsworth JW, Carr J. Migration of rat thoracic duct lymphocytes from tissues to central lymph circulation. Cell Immunol 1972, 5:228
64. Holm G, Franksson C, Campbell AC, MacLenman ICM. The cytotoxic activity of lymphocytes from human lymph in vitro. Clin Exp Immunol 1974, 17:361
65. Howard JC. The life-span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from the rat thoracic duct. J Exp Med 1972, 135:185
66. Ishizaka T, Sterk AR, Ishizaka K. Demonstration of Fc receptors on human basophil granulocytes. J Immunol 1979, 123:578
67. Jen Wei Chiao. Human lymphocytes bearing both receptors for complement components and SRBC. Clin Immunol Immunopath 1975, 4:545

68. Juillard GJF, Boyer PJJ, Snow HD. Intralymphatic infusion autochthonous tumor cells in canine lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Physiol* 1976, 1:497
69. Juillard GJF, Boyer PJJ. Intralymphatic immunization: current status. *Eur J Canc* 1977, 13:439
70. Kamperdijk EWA, Raaymakers. Lymph node macrophages and reticulum cells in the immune response. *Cell Tiss Res* 1978, 192:1
71. Kay NE, Ackerman SK, Douglas SD. Anatomy of the immune system. *Semin Hematol* 1979, 16:252
72. Kelly RH, Balfour BM, Armstrong JA, Griffiths S. Functional anatomy of lymph nodes. *Anat Rec* 1978, 190:5
73. Kim Z. Inflammatory reactions and chemotactic factors. *Ann Allergy* 1979, 43:297
74. Koren HS, Williams MS. Natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity are mediated by different mechanisms and by different cells. *J Immunol* 1978, 121:1956
75. Kubica J, Wieczorek Z. Mechanizmy odpornościowe w procesie zakażenia. *Immunol Pol* 1978, III/4:227
76. Kuttner BJ, Woodruff JJ. Adherence of recirculating T and B lymphocytes to high endothelium of lymph nodes in vitro. *J Immunol* 1979, 123:1421
77. Lamm ME, Stetson ChA. Inflammation. *Clin Immunobiol* 1972, 1:139
78. Leak LV. The fine structure and function of the lymphatic vascular system. W: *Handbuch Allg Pathologie* Springer-Verlag Berlin, 1972:149

79. Lum LG, Muchmore AV, O'Connor N, Strober W. Fc receptors for IgA on human B and human non-B, non-T lymphocytes. *J Immunol* 1979, 123:714
80. Lussier LM, Chandler DKF, Sybert A. Human alveolar macrophages: antigen-independent binding of lymphocytes. *J Appl Physiol* 1978, 45:933
81. Łukomska B, Olszewski W, Engeset A. Characteristics of human peripheral lymph cell population. *Lymphology* 1980, /w druku/
82. Manconi FE, Fadda MF, Cadoni A. Subpopulations of T lymphocytes in human extravascular fluids. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1978, 56:385
83. Marchalonis JJ, Dekker M, eds. *The lymphocytes: structure and function* INC Basel, 1977
84. McCombs C, Michalski JP, Talal N. Cellular interactions in lymphocyte proliferation: effect of syngenic and xenogenic macrophages. *Cell Immunol* 1976, 23:283
85. McKenzie IFC, Elliott BE, Haskill JS. Differentiation of antigenic markers on B cells and on antibody-forming cells. *Israel J Med Sci* 1975, 11:1278
86. Merriam JC, Tilney NL. Prolonged survival of alymphatic skin allografts in the rat. *Transpl* 1978, 26:87
87. Meuret G, Hoffmann G. Monocyte kinetic studies in normal and disease states. *Br J Haematol* 1973, 24:275
88. Miller HRP, Adams EP. Reassertment of lymphocytes in lymph from normal and allografted sheep. *Am J Pathol* 1977, 87:59

89. Miller RG, Phillips RA. Development of B lymphocytes. Fed Proc 1975, 34:145
90. Mitchell GF. A proposal that one in vivo function of T cells is to regulate the availability of antigen for B cells. Transpl Rev 1975, 23:119
91. Morris B. The cell of lymph and their role in immunological reactions. W: Handbuch Allg Pathologie, Springer-Verlag Berlin, 1972:405
92. Morris B, Courtice FC. Cells and immunoglobulins in lymph. Lymphology 1977, 10:62
93. Morris B. The homing of the lymphocytes. Blood Cells 1980, 6:3
94. Norberg B, Rydgren L. Lymphocyte migration through the wall of the postcapillary venules. Lymphology 1978, 11:211
95. Nowak J. Pochodzenie i charakterystyka receptora dla fragmentu Fc IgG. Pol Arch Med Wew 1979, LXI/5:419
96. Oktaba W. Elementy statystyki matematycznej i metodyki doświadczalnictwa. PWN Warszawa, 1977
97. Olsson I, Venge P. The role of the eosinophil granulocyte in the inflammatory reaction. Allergy 1979, 34:353
98. Olszewski W, Machowski Z, Sokołowski J, Nielubowicz J. Experimental lymphoedema in dogs. J Cardiovasc Surg 1968, 9:178
99. Olszewski W. Mechanizm tworzenia i przepływu chłonki. Acta Physiol Pol 1977, 14:65
100. O'Neill GJ, Parrott DMV. Locomotion of human lymphoid cells. Cell Immunol 1977, 33:257
101. Onions D, B and T cell markers on canine lymphosarcoma cells. J Natl Canc Inst 1977, 59:1001



102. Ortaldo JR, Bonnard GD, Kind PD, Herberman RB. Cytotoxicity by cultured human lymphocytes: characteristics of effector cells and specificity of cytotoxicity. *J Immunol* 1979, 122:1489
103. Pabst R, Munz D, Trepel F. Migration pattern of splenic lymphocytes after local labelling of the pig spleen with  $^3\text{H}$  cytidine. *Scand J Haematol* 1978, 20:181
104. Parrott D, de Sousa M. Thymus-dependent and thymus-independent populations: origin, migratory patterns and lifespan. *Clin Exp Immunol* 1971, 8:663
105. Perlmann H, Perlmann P, Papa GR. Purification, fractionation and assay of antibody dependent lymphocytic effector cells /K cells/ in human blood. *Scand J Immunol* 1976, 5:57
106. Potter MR, Moore M. Organ distribution of natural cytotoxicity in the rat. *Clin Exp Immunol* 1978, 34:78
107. Potter MR, Moore M. Natural cytotoxic reactivity of human lymphocyte subpopulations. *Immunol* 1979, 37:187
108. Pichler WJ, Lum L, Broder S. Fc receptors on human T lymphocytes. *J Immunol* 1978, 121:1540
109. Raju S, Grogan JB. Immunologic study of the brain as a privileged site. *Transpl Proc* 1977, 9:1187
110. Rannie GH, Donald JK. Estimation of the migration of thoracic duct lymphocytes to non-lymphoid tissue. *Cell Tissue Kinet* 1977, 10:523
111. Rannie GH, Ford WL. Recirculation of lymphocytes: it's role in implementing immune responses in the skin. *Lymphology* 1978, 11:193

112. Rice L, Laughter AH, Twomey JJ. Three suppressor systems in human blood that modulate lymphoproliferation. *J Immunol* 1979, 122:991
113. Richie E, Patchen M. Correlation between temperature-stable E-rosette formation and lymphocyte commitment to activation. *Clin Immunol Immunopathol* 1978, 11:88
114. van der Rhee HJ, van der Burgh-de Winter CPM, Daems WTh. The differentiation of monocytes into macrophages, epithelioid cells and multinucleated giant cells in subcutaneous granulomas, *Cell Tissue Res* 1979, 197:355
115. Ross GD, Surface markers of B and T cells. *Arch Pathol Lab Med* 1977, 101:337
116. Rotter V, Trainin N. Effect of thymic hormone on the response of different lymphoid cell populations to T mitogens. *Israel J Med* 1977, 13:363
117. Roy R, Mc Nicoll J, Dagnillard F, Immunological activities of rat lymphocytes. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1976, 52:32
118. Rydgren L, Norberg B, Hakansson CH. Lymphocyte locomotion. *Lymphology* 1976, 9:89
119. Sampson D, Rankel RJ, La Porta AJ. Suppressor cells in man, dogs and transplantation. *J Surg Res* 1977, 22:385
120. Santoli D, Trinchieri G, Moretta L. Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in humans. Distribution and characterization of the effector cell. *Clin Exp Immunol* 1978, 33:309
121. Semenzato G. Active E rosette formation by human lymphoblasts. *Immunol* 1978, 34:721

122. Scheldon PJ, Halborow EJ. Human erythrocyte rosette formation with mitogen-stimulated human lymphocytes, a marker for the demonstration of activated T cells. *J Immunol Meth* 1975, 7:379
123. Schlesinger M. Cell surface receptors and lymphocyte migration. *Immunol Commun* 1976, 5:775
124. Schlesinger M. Immunological functions of the thymus. *Israel J Med* 1977, 13:343
125. Scollay R, Hall J, Orlans E. Studies on the lymphocytes of sheep. *Eur J Immunol* 1976, 6:121
126. Shannon AD, Jones MAS. Influence of corticotropic and corticosteroids on the output of cells from the popliteal lymph node of the sheep. *AJEBAK* 1974, 52:515
127. Shaw S, Pichler WJ, Nelson DL. Fc receptors on human T lymphocytes *J Immunol* 1979, 122:599
128. Sher R, Glover A. Isolation of human eosinophils and their lymphocyte-like rosetting properties. *Immunol* 1976, 31:337
129. Shore A, Dosch HM, Gelfand EW. Expression and modulation of C3 receptors during early T cell ontogeny. *Cell Immunol* 1979, 45:157
130. Smith JB, McIntosh GH, Morris B. The traffic of cells through tissues: a study of peripheral lymph in sheep. *J Anat* 1970, 107:87
131. Smith JB, McIntosh, Morris B. The migration of cells through chronically inflamed tissues. *J Pathol* 1970, 100:21
132. Sokołowski J, Jakobsen E, Johannessen JV. Cells in peripheral leg lymph of normal men. *Lymphology* 1978, 11:202

133. de Sousa M, Lymphoid cell positioning: a new proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration.  
W: Cell-cell recognition. Curtis ASG, ed. Cambridge Univ Press, 1978:393
134. Stamper HB, Woodruff JJ. An in vitro model of lymphocyte homing. J Immunol 1977, 119:772
135. Stewart GJ, Lynch PR. The adhesion of leucocytes, erythrocytes and noncellular material to the luminal surface of normal and artificial blood vessels in vivo. Ann N Y Acad Sci 1977, 283:179
136. Stobo JD, Paul WE. Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. J Immunol 1973, 110:362
137. Stobo JD. Surface markers for lymphocyte subpopulations. J Lab Clin Med 1978, 91:9
138. Streilein JW. Lymphocyte traffic, T cell malignancies and the skin. J Invest Dermatol 1978, 71:167
139. Syrjanen UJ. Paracortical post-capillary venules of human lymph nodes with special reference to the distribution of their endothelial IgG. Lymphology 1978, 11:117
140. Thatcher N, Crowther D. Changes in nonspecific lymphoid /NK,K,T cell/ cytotoxicity following BCG immunization of healthy subjects. Canc Immunol Immunother 1978, 5:105
141. Tilney NL, Ford WL. Host cell proliferation in response to skin allografts on alymphatic pedicles. Cell Immunol 1974, 14:147
142. Timonen T, Saksela E, Ranki A, Hayry P. Fractionation, morphological and functional characterization of effector

- cells responsible for human natural killer activity against cell - line targets. *Cell Immunol* 1979, 48:133
143. van der Tweel JG, Walker WS. Macrophage induced thymic lymphocyte maturation. *Immunol* 1977, 33:817
144. Waksman BH. Immunoglobulins and lymphokines as mediators of inflammatory cell mobilization and target cell killing. *Cell Immunol* 1976, 27:309
145. Ward PA, Unanue ER, Goralnick JS, Schreiner GF. Chemotaxis of rat lymphocytes. *J Immunol* 1977, 119:416
146. Welsh RM. Mouse natural killer cells: induction specificity and function. *J Immunol* 1978, 121:1631
147. Wilkinson PC. Recognition and response in mononuclear and granular phagocytes. *Clin Exp Immunol* 1976, 25:355
148. Wolfe SA, Tracey DE, Henney CS. Induction of natural killer cells by ECG. *Nature* 1976, 262:584
149. Woodruff JJ, Katz IM, Lucas LE, Stamper HB. An in vitro model of lymphocyte homing. *J Immunol* 1977, 119:1603
150. Yam LT, Li CY, Crosby WH. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 1971, 55:283
151. Yang TJ, Kennedy JR. Spontaneous eosinophil - erythrocyte rosette formation. *Lab Invest* 1976, 35:302
152. Zander AR, Boopalam N, Epstein RB. Surface markers on canine lymphocytes. *Transpl Proc* 1975, 7:369.

OBJASNIENIA SKROTOW UŻYWANYCH W PRACY

- BALT - /bronchus - associated lymphoid tissue/  
tkanka limfatyczna płuc
- BCG - /Bacille, Calmette, Guerin/ atenuowane  
prątki gruźlicy
- ConA - konkanawalina A
- E - erytrocyty
- EA - erytrocyty opłaszczone przeciwciałem IgG
- WAC - erytrocyty opłaszczone przeciwciałem IgM  
i dopełniaczem
- E/T - stosunek komórek efektorowych do komórek  
docelowych
- GALT - /gut - associated lymphoid tissue/ tkanka  
limfatyczna przewodu pokarmowego
- K - /killer cells/ komórki cytotoksyczne
- NK - /natural killer cells/ naturalne komórki  
cytotoksyczne
- PALS - /periarteriolar lymphoid sheath/ część centralna  
białej miazgi śledziony
- PHA - fitohemaglutynina
- SIg - /surface immunoglobulin/ immunoglobulina  
powierzchniowa
- △ - różnica

144. ... - erythrocyte ...
145. ... - erythrocyte ...
146. ... - erythrocyte ...
147. ... - erythrocyte ...
148. ... - erythrocyte ...
149. ... - erythrocyte ...
150. ... - erythrocyte ...
151. ... - erythrocyte ...
152. ... - erythrocyte ...

T A B E L E

$\bar{x}$	-	średnia arytmetyczna
SD	-	odchylenie standardowe
SE	-	błąd standardowy średniej
n	-	liczba doświadczeń
p	-	poziom istotności
NS	-	statystycznie nieznamienne



T A B L I C A

1	- badania arytmetyczne
3D	- obchylene standardowe
3E	- bład standardowy średniej
4	- liczba obserwacji
5	- poziom istotności
KS	- statystyka niezależności

Tabela 1. Leukocytoza w chłonka przedwęzłowej i krwi obwodowej / w  $\text{mm}^3 \times 10^3$  /

Grupy doświadczalne		Chłonka		Krew	
I Psy zdrowe n = 9	$\bar{x}$	0,23	p < 0,001	12,88	
	SD	0,21		8,02	
	SE	0,07		2,67	
II Psy z ostrym zastojem n = 3	$\bar{x}$	0,13	p < 0,01	12,23	
	SD	0,08		4,31	
	SE	0,04		2,49	
III Psy z przewle- kłym zastojem n = 5	$\bar{x}$	4,70	n s	4,20	
	SD	3,04		6,37	
	SE	1,72		2,85	
Istotność statystyczne	I/II	n s		n s	
	I/III	p < 0,02		p < 0,05	
	II/III	p < 0,02		p < 0,05	

Statistical analysis of the results of the study is presented in the following table.

Group	Statistical test	p-value	Statistical test	
			Mean	SD
I Ray n = 9	F	p < 0.001	12.88	0.23
			8.02	0.21
			2.67	0.07
II Ray + control n = 5	F	p < 0.01	12.52	0.17
			4.21	0.08
			2.48	0.04
III Ray + practice n = 5	F	p < 0.05	4.20	0.70
			6.37	0.67
			2.88	1.12
Statistical test	F	p < 0.05		

Tabela 2. Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna komórek pełnej populacji chłonki przedwężłowej i krwi / % /

Grupy doświadczalne			Limfocyty	Monocyty	Granulocyty	Komórki esterazo-pozytywne
I Psy zdrowe n = 16	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	39,75 15,02 3,75	27,12 9,31 2,32	33,12 17,48 4,37	20,36 11,38 3,43
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	43,18 24,15 6,03	13,68 10,54 2,63	42,50 25,12 6,28	7,60 5,63 2,52
			N S	p < 0,001	N S	p < 0,1
II Psy z ostrym zastojem n = 12	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	34,25 10,51 3,03	29,41 18,80 5,45	41,66 17,36 5,01	22,44 9,92 3,30
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	41,58 28,23 8,14	11,08 9,81 2,83	47,33 34,31 9,90	14,28 17,16 6,48
			N S	p < 0,001	N S	N S
III Psy z przewlekłym zastojem n = 6	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	90,50 3,08 1,25	3,66 2,50 1,02	4,16 3,54 1,44	8,00 7,51 3,36
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	56,66 25,16 10,27	4,66 3,26 1,33	38,66 24,16 9,86	30,00 9,59 4,28
			p < 0,02	N S	p < 0,02	p < 0,001
Istotność statystyczna	I/II	Ch	N S	N S	N S	N S
		K	N S	N S	N S	N S
	I/III	Ch	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,02
		K	N S	p < 0,001	N S	p < 0,001
	II/III	Ch	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01
		K	N S	N S	N S	N S

Wyniki pomiarów temperatury w czasie trwania doświadczenia  
 Wyniki pomiarów temperatury w czasie trwania doświadczenia

Kategoria pomiarowa	Wzrostki	Temperatura	Wzrostki			Wzrostki			Wzrostki				
			Wzrostki	Wzrostki	Wzrostki	Wzrostki	Wzrostki	Wzrostki	Wzrostki	Wzrostki	Wzrostki		
I	K	20,55	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
	K	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
II	K	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
	K	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
III	K	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
	K	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
IV	K	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
	K	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45
		21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45	21,45

Tabela 3. Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna populacji komórek nieprzylegających do powierzchni plastikowych /%/

Grupy doświadczalne			Limfocyty	Monocyty	Granulocyty	Komórki esterazo-pozytywne
I Psy zdrowe n = 5	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	50,40 18,92 8,46	27,80 14,32 6,40	21,80 12,33 5,51	17,80 14,20 6,35
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	52,40 25,44 11,37	3,20 1,64 0,73	44,40 25,51 11,40	12,80 11,88 5,31
			N S	p < 0,02	N S	N S
II Psy z ostrym zastojem n = 5	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	56,20 14,65 6,55	9,00 6,89 3,08	34,80 16,94 7,57	10,40 6,42 2,87
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	38,00 4,41 1,97	5,60 3,78 1,69	56,40 3,50 1,56	14,00 10,39 6,00
			p < 0,05	N S	p < 0,05	N S
III Psy z prze- wlekłym zastojem n = 5	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	90,00 1,22 0,54	5,60 2,70 1,20	4,40 2,51 1,12	5,40 3,57 1,60
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	60,60 20,14 9,00	3,80 3,63 1,62	35,60 21,05 9,41	10,20 7,25 3,24
			p < 0,02	N S	p < 0,02	N S
Istotność statystyczna	I/II	Ch	N S	p < 0,02	N S	N S
		K	N S	N S	N S	N S
	I/III	Ch	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,1
		K	N S	N S	N S	N S
	II/III	Ch	p < 0,001	N S	p < 0,001	N S
		K	N S	N S	N S	N S

Tablica 2. Wyniki pomiarów i obliczeń z ciekawością populacji  
 (wyniki pomiarów i obliczeń z ciekawością populacji)

Grupy doświadczalne	I		II		III		IV		Kontrola
	Wzrost z 1-ym zestawieniem	Wzrost z 2-ym zestawieniem	Wzrost z 1-ym zestawieniem	Wzrost z 2-ym zestawieniem	Wzrost z 1-ym zestawieniem	Wzrost z 2-ym zestawieniem	Wzrost z 1-ym zestawieniem	Wzrost z 2-ym zestawieniem	
Chłopa	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5
Krowy	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5
Chłopa	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5
Krowy	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5
Chłopa	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5
Krowy	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5
Chłopa	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5
Krowy	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5	50,40 18,32 8,48 n = 5

Tabela 4. Charakterystyka morfologiczna i cytochemiczna populacji komórek przylegających do powierzchni plastikowych /%/

Grupy doświadczalne			Limfocyty	Monocyty	Granulocyty	Komórki esterazo-pozytywne
I Psy zdrowe n = 5	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	12,80 14,35 6,42	31,40 14,01 6,26	55,80 23,96 10,71	42,00 25,71 11,50
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	4,00 2,23 1,00	45,20 18,11 8,10	50,80 17,88 7,99	45,40 31,93 14,28
			p < 0,1	N S	N S	N S
II Psy z ostrym zastojem n = 5	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	14,20 5,67 2,53	23,80 14,83 6,63	62,00 10,55 4,72	22,33 16,92 9,76
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	14,00 6,36 2,84	34,80 15,67 7,01	51,20 12,83 5,73	48,00 59,39 42,00
			N S	p < 0,001	p < 0,02	N S
III Psy z prze- wlekłym zastojem n = 5	Chłonka	$\bar{x}$ SD SE	12,00 16,53 7,39	49,60 10,21 4,56	38,40 21,37 9,55	33,80 20,10 8,99
	Krew	$\bar{x}$ SD SE	4,20 3,27 1,46	6,40 6,22 2,78	89,40 8,26 3,69	-
			N S	p < 0,001	p < 0,001	-
Istotność statystyczna	I/II	Ch	N S	N S	N S	N S
		K	p < 0,01	N S	N S	N S
	I/III	Ch	N S	p < 0,02	N S	N S
		K	N S	p < 0,001	p < 0,001	-
	II/III	Ch	N S	p < 0,01	N S	N S
		K	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,01	-



Таблица 4. Характеристики для формирования системы управления предприятием  
 Коды характеристик приведены в соответствии с классификацией [1]

Группы характеристик	I - оценка качества			II - оценка надежности			III - оценка безопасности			Итого
	Критерий	Единица измерения	Метод измерения	Критерий	Единица измерения	Метод измерения	Критерий	Единица измерения	Метод измерения	
Группы характеристик	Характеристика	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг
		м	длина	м	длина	м	длина	м	длина	м
		мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм
	Характеристика	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м
		кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²
		кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³
	Характеристика	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг
		м	длина	м	длина	м	длина	м	длина	м
		мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм
	Характеристика	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м
		кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²
		кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³
Характеристика	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг	
	м	длина	м	длина	м	длина	м	длина	м	
	мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм	
Характеристика	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	
	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	
	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	
Характеристика	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг	вес	кг	
	м	длина	м	длина	м	длина	м	длина	м	
	мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм	толщина	мм	
Характеристика	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	линейная плотность	кг/м	
	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	площадная плотность	кг/м²	
	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	объемная плотность	кг/м³	

Grupy doświadczalne		% specyficznie uwolnionego <sup>51</sup> Cr					
		E/T 4:1	E/T 2:1	E/T 1:1	E/T 1:2	E/T 1:4	
I Psy zdrowe n = 5	Chłonka	$\bar{x}$	17,37	14,38	13,08	7,40	2,80
		SD	9,43	8,26	8,76	4,53	3,85
	SE	4,71	3,69	3,91	2,02	2,22	
I Psy zdrowe n = 5	Krew	$\bar{x}$	8,52	14,18	16,38	13,50	9,63
		SD	6,07	8,51	9,43	6,01	3,70
	SE	3,03	3,80	4,21	2,68	2,13	
			p < 0,02	N S	N S	p < 0,1	p < 0,05
II Psy z ostrym zastojem n = 4	Chłonka	$\bar{x}$	22,57	18,63	13,83	13,05	1,35
		SD	8,27	2,25	8,82	0,35	1,48
	SE	4,13	1,30	5,09	0,25	1,05	
II Psy z ostrym zastojem n = 4	Krew	$\bar{x}$	22,92	18,33	21,43	11,25	7,75
		SD	6,89	4,21	2,17	2,89	2,47
	SE	3,44	2,43	1,25	2,05	1,75	
			N S	N S	N S	p < 0,05	p < 0,05
III Psy z prze- wlekłym zastojem n = 6	Chłonka	$\bar{x}$	7,30	8,21	6,05	6,30	2,82
		SD	7,77	5,74	4,82	3,55	2,99
	SE	3,47	2,17	1,82	1,45	1,49	
III Psy z prze- wlekłym zastojem n = 6	Krew	$\bar{x}$	13,56	15,62	14,85	9,78	7,20
		SD	6,15	8,72	8,69	10,47	3,31
	SE	2,75	3,29	3,28	4,27	1,65	
			p < 0,01	p < 0,02	p < 0,001	N S	p < 0,1
Istotność statystyczna	I/II	Ch	N S	N S	N S	p < 0,02	N S
		K	p < 0,02	N S	N S	N S	N S
	I/III	Ch	p < 0,1	N S	p < 0,1	N S	N S
K		N S	N S	N S	N S	N S	
II/III	Ch	p < 0,02	p < 0,01	p < 0,02	p < 0,001	N S	
	K	p < 0,05	N S	N S	N S	N S	

		K	$b < 0.02$	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ
II/III	K	CP	$b < 0.03$	ИЗ	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.001$
I/III	K	CP	$b < 0.07$	ИЗ	$b < 0.1$	ИЗ	ИЗ
I/II	K	CP	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.1$	ИЗ	ИЗ
III	K	CP	$b < 0.07$	ИЗ	$b < 0.001$	ИЗ	$b < 0.01$
II	K	CP	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.01$
I	K	CP	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.01$
Служба формирования		ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ
		ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ
III	K	CP	$b < 0.07$	ИЗ	$b < 0.001$	ИЗ	$b < 0.01$
II	K	CP	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.01$
I	K	CP	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.05$	ИЗ	$b < 0.01$
Служба формирования		ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ
		ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ	ИЗ

ИЗ обеспечения мероприятий

Tabela 10. Aktywność cytotokyczna komórek K

Tabela 10. Aktywność cytotokyczna komórek K