

Dwulek 25771

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

Magdalena Jaskłowska-Englisz



ZS 171
H3100

Wpływ dawco-specyficznych transfuzji krwi na przeżycie
dożylnego przeszczepu limfocytów.

Praca doktorska

Promotor

Prof. dr hab. med. Waldemar L. Olszewski

Warszawa 1995

Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi dr hab.med. Waldemarowi L. Olszewskiemu za opiekę naukową, wnikliwe rady i pomoc okazaną w czasie przygotowywania pracy.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Chirurgii Transplantacyjnej gorąco dziękuję za okazaną życzliwość i koleżeńską atmosferę.

Magdalena Jaskłowska-Englisz

SPIS SKRÓTÓW

- ABT - autologous blood transfusion - autologiczna transfuzja
- ADCC - antibody dependant cell cytotoxicity - cytotoksyczność komórkowa mediowana przez przeciwciała
- ALC - allogeneic lymphocyte cytotoxicity - allogeniczną limfocytarną cytotoksyczność
- BN - szczur szczepu Brown Norway
- CD - cluster of differentiation antigens - grupa antygenów związanych z różnicowaniem/dojrzwaniem komórki
- CML - cell mediated lympholysis - limfoliza zależna od komórek
- CMV - cytomegalovirus - wirus cytomegalii
- CsA - cyklosporyna A
- CTL - cytotoxic T lymphocyte - cytotoksyczny limfocyt T
- DA - szczur szczepu Dark Aguti
- DST - donor-specific transfusion - dawco-specyficzna transfuzja krwi
- DTH - delayed-type hypersensitivity - nadwrażliwość typu późnego
- FcR - receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny
- FCS - fetal calf serum - płodowa surowica cielęca
- FITC - izotiocyjanian fluoresceiny
- HIV - human immunodeficiency virus - wirus nabytego niedoboru immunologicznego
- IFN_γ - interferon gamma
- IgG - immunoglobulina klasy G
- IgM - immunoglobulina klasy M
- IL-1 - interleukina 1
- IL-2 - interleukina 2
- IL-2R - receptor dla interleukiny 2
- IL-4 - interleukina 4
- IL-5 - interleukina 5

- IL-6 - interleukina 6
- IL-10 - interleukina 10
- LEW - szczur szczepu Lewis
- LNR - lymph nodes radioactivity - współczynnik radioaktywności węzłów chłonnych
- MHC - major histocompatibility complex - główny kompleks zgodności tkankowej
- mRNA - messenger ribonucleic acid - informacyjny kwas rybonukleinowy
- NK - natural killer cells - komórki naturalnie cytotoksyczne
- PCR - polymerase chain reaction - łańcuchowa reakcja polimerazy
- PGE2 - prostaglandyna E2
- poly I:C - polyinosinic polycytidilic acid
- RT1 - główny kompleks zgodności tkankowej szczura
- Th - T helper - limfocyty T pomocnicze
- Th1 - limfocyty T pomocnicze typu 1
- Th2 - limfocyty T pomocnicze typu 2
- PAGE - żel poliakrylamidowy
- FcR - receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin
- TLX - antygen występujący na limfocytach i trofoblaście u człowieka

SPIS TREŚCI

	strona
1.	Wstęp..... 1
1.1.	Założenia i cel pracy..... 1
1.2.	Przegląd piśmiennictwa..... 4
	- Dawco-specyficzne transfuzje krwi - opis zjawiska..... 4
	- Wpływ DST na odpowiedź komórkową..... 5
	- Wpływ DST na odpowiedź humoralną..... 9
	- Niespecyficzna immunosupresja po DST..... 10
	- Mechanizmy odpowiedzialne za odrzucanie allogenicznych limfocytów..... 11
2.	Materiał i metody..... 15
2.1.	Schemat doświadczenia i podział na grupy..... 15
2.2.	Zwierzęta doświadczalne..... 15
2.3.	Stosowane metody..... 16
2.3.1.	Transfuzje krwi (DST)..... 16
2.3.2.	Przeszczep limfocytów..... 16
2.3.3.	Przeszczep serca. 17
2.3.4.	Izolacja komórek z krezkowych węzłów chłonnych..... 17
2.3.5.	Znakowanie izotopem ⁵¹ Cr limfocytów do przeszczepu..... 17
2.3.6.	Znakowanie izotiocyjanianem fluoresceiny limfocytów do przeszczepu..... 18
2.3.7.	Blokowanie antygenów MHC klasy I i II na przeszczepianych limfocytach, przeciwciałami OX18 i OX6..... 18
2.3.8.	Przygotowanie zawiesiny martwych limfocytów..... 18
2.3.9.	Technika wstrzyknięć dożylnych..... 19
2.3.10.	Ocena rozmieszczenia przeszczepionych dożylnie znakowanych izotopem ⁵¹ Cr limfocytów..... 19
2.3.11.	Tkankowa lokalizacja przeszczepionych dożylnie limfo-

	cytów znakowanych izotocyjanianem fluoresceiny.....	19
2.3.12.	Otrzymywanie surowicy od szczurów LEW, którym podawano DST.....	20
2.3.13.	Eliminacja przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom MHC klasy I BN z surowic szczurów LEW, którym podawano DST.....	20
2.3.14.	Charakterystyka surowic LEW po DST przy użyciu testów in vitro.....	21
2.3.14a.	Ocena miana przeciwciał cytotoksycznych zależnych od dopełniacza.....	21
2.3.14b.	Ocena miana przeciwciał opsonizujących.....	21
2.3.14c.	Badanie obecności allospecyficznych immunoglobulin klasy G i M opsonizujących limfocyty BN.....	22
2.3.14d.	Badanie blokowania antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej na przeszczepianych limfocytach BN, przez surowice szczurów LEW po DST.....	23
2.3.14e.	Immunoblotting antygenów limfocytarnych wiążących się z surowicą LEW po DST.....	24
2.3.15.	Badanie wiązania się surowicy LEW po DST z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych serca BN.....	25
2.3.15a.	Badanie histochemiczne.....	25
2.3.15b.	Badanie wiązania surowicy LEW po DST z izolowanymi komórkami śródbłonna.....	25
2.3.16.	Metody statystyczne.....	26
3.	Wyniki.....	28
3.1.	Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach i narządach szczurów LEW, którym w 7 lub 30 dni po przetoczeniu krwi BN przeszczepiano dożylnie limfocyty BN znakowane ⁵¹ Cr.....	28
3.2.	Lokalizacja przeszczepionych dożylnie limfocytów BN znakowanych FITC, w tkankach LEW po DST.....	29

3.3.	Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach i narządach szczurów LEW, które otrzymywały surowicę LEW po DST, a następnie limfocyty BN znakowane ^{51}Cr	30
3.4.	Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach i narządach szczurów LEW, którym przed przeszczepieniem znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN podano absorbowaną surowicę LEW po DST.....	31
3.5.	Rozmieszczenie radioaktywności po podaniu szczurom LEW po DST, opłaszczonych przeciwciałami OX18 lub OX6 limfocytów BN znakowanych ^{51}Cr	31
3.6.	Rozmieszczenie radioaktywności po przeszczepie limfocytów BN szczurom LEW, które otrzymywały transfuzje od DA.....	32
3.7.	Rozmieszczenie radioaktywności u szczurów LEW biorców krwi BN, po podaniu syngenicznych (LEW) limfocytów znakowanych ^{51}Cr	33
3.8.	Poziom przeciwciał cytotoksycznych i opsonizujących w surowicy szczurów LEW po transfuzji krwi BN	33
3.9.	Występowanie allospecyficznych immunoglobulin klasy IgG i IgM w surowicy LEW po DST.....	34
3.10.	Blokowanie antygenów MHC BN przy pomocy surowicy LEW po DST.....	35
3.11.	Immunoblotting antygenów limfocytarnych BN wiążących się z surowicą LEW po DST.....	35
3.12.	Czasy przeżycia przeszczepów serca.....	35
3.13.	Wiązanie się surowicy LEW po DST z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych serca BN.....	36
4.	Dyskusja.....	37

5.	Wnioski.....	43
6.	Streszczenie.....	44
7.	Piśmiennictwo.....	48
8.	Ryciny.....	60

1. WSTĘP

1.1. Założenia i cel pracy.

Przeszczepianie komórek jest obecnie bardzo szybko rozwijającym się działem transplantologii. Wynika to z zapotrzebowania klinicznego na przeszczepianie komórek narządów, których czynność uległa ograniczeniu lub całkowitemu zahamowaniu wskutek procesu chorobowego (np. cukrzyca, niewydolność wątroby, miopatie), a także prób adoptywnej immunoterapii (np. przeszczep limfocytów z transdukowanymi genami dla cytokin w próbach leczenia nowotworów). Specyficzność badań nad przeszczepianiem komórek wynika z różnego zachowania się przeszczepów komórek i narządów po implantacji. W procesie przyjmowania się przeszczepów komórkowych widoczne są, w porównaniu z przeszczepem całego, funkcjonalnie zintegrowanego narządu, znaczące odrębności. Wynikają one z zapotrzebowania na odpowiednie komórkowe i humoralne środowisko dla przeszczepionych komórek, zapewniające warunki dla ich prawidłowej czynności i proliferacji, co nie odgrywa roli w przypadku przeszczepu komórkowo-zintegrowanego narządu. Inna też jest kinetyka ataku komórek odpornościowych biorcy na przeszczepione komórki allogeniczne, w porównaniu z takim procesem w przeszczepionym narządzie. Następstwem tego jest konieczność stosowania w przypadku przeszczepu komórkowego innych metod immunosupresji niż po przeszczepie narządu.

W ciągu ostatnich lat próbuje się klinicznego przeszczepiania wysepek Langerhansa (1,2,3), hepatocytów (4,5,6), mioblastów (7), komórek neurohormonalnych (8). Przeszczepiane są również komórki układu białokrwinkowego. Przykładami tego typu przeszczepu komórkowego są:

- dożylny przeszczep szpiku (9);
- przeszczep limfocytów naciekających nowotwór - metoda adoptywnej immunoterapii (10,11,12);
- przeszczep cytotoksycznych limfocytów CD8⁺ specyficznie skierowanych przeciwko wirusom CMV (13,14) lub HIV (14,15);

- przeszczep antygenowo-specyficznych limfocytów T CD4⁺ mający na celu przeniesienie nadwrażliwości typu późnego (16,17);
- przeszczep nienaświetlanych limfocytów T dawcy jako efektywna metoda zwalczania chłoniaka wywołanego przez wirus Epsteina-Barra, u chorych po przeszczepie szpiku (18);
- przeszczep limfocytów służących jako nośnik transdukowanych genów w terapii genowej (19,20,21,22).

Teoretycznie proces odrzucania przeszczepionych narządów i komórek powinien zachodzić w podobny sposób, gdyż jedne i drugie mają na swojej powierzchni te same antygeny zgodności tkankowej. Jednak w poprzednich pracach prowadzonych w naszym Zakładzie (23,24,25,26,27,28) zaobserwowano istnienie znacznych różnic między długością przeżycia przeszczepów allogenicznego narządu i limfocytów. I tak, w modelu szczurzym przy pełnej niezgodności w obrębie głównego kompleksu zgodności tkankowej między dawcą a biorcą, przeszczepy serca przeżywały 6 do 8 dni, podczas gdy komórki limfoidalne przeszczepione dożylnie nieuczulonemu biorcy były niszczone w znacznym procencie już w ciągu 6 godzin. Powstało więc nowe zagadnienie, a mianowicie ocena różnic w mechanizmie odrzucania przeszczepów komórkowych i narządowych, w szczególności różnic układów molekularnych warunkujących te procesy. Jeśli istnieją różnice w mechanizmie odrzucania, to również różny musi być sposób kontroli kinetyki tego procesu.

Przeżycie przeszczepu allogenicznego narządu można skutecznie przedłużyć podając cyklosporynę A, sterydy nadnerczowe, surowicę antylimfocytarną i inne chemiczne leki o działaniu immunosupresyjnym. Okazało się jednak, że chociaż stosowanie tych preparatów skutecznie zapobiega odrzuceniu allogenicznego narządu, obciążone jest jednak powikłaniami. Nieswoiste środki immunosupresyjne, zaburzając odpowiedź immunologiczną, uniemożliwiają ustrojowi biorcy przeszczepu uruchomienie prawidłowych mechanizmów obrony przed zakażeniem. Obserwacje te dotyczą przeszczepów narządowych. Zupełnie nie wiadomo jak przebiega proces hamowania ataku komórek odpornościowych gospodarza na przeszczep allogenicznych komórek, przy zastosowaniu wyżej wyliczonych środków immunosupresyjnych.

Wydaje się, iż przyszłość immunosupresji ograniczającej odrzucanie alloprzeszczepów, zarówno narządowych jak i komórkowych, leży w biologicznych metodach immunosupresji, częściowo lub całkowicie swoistych tzn. skierowanych na efekt działania antygenów transplantacyjnych i narządowych. Jedną z metod tego typu jest podawanie prospektywnemu biorcy krwi dawcy tzw. dawco-specyficzne przetaczanie krwi (donor-specific blood transfusion, DST). Metoda ta wpływa na przedłużenie przeżycia przeszczepu nerek u człowieka (29,30). Optymalizacja protokołów immunosupresyjnych CsA i FK 506 wyraźnie przesłoniła pozytywne działanie DST w przypadkach klinicznych, niemniej jednak działanie to należy uznać za udowodnione. Potwierdzają to także wyniki badań na zwierzętach (26,31,32). W tym miejscu należy postawić pytanie czy DST działa podobnie przedłużająco na przeżycie przeszczepu komórkowego jak narządowego. Szczególnie ważne jest zbadanie możliwości kontrolowania odrzucania przeszczepianych dożylnie limfocytów, ponieważ przeszczepia się je w klinice w immunoterapii i jako nośniki transdukowanych genów. Komórki te powinny przeżywać, a nawet proliferować. Stosując chemiczną immunosupresję upośledzamy **czynność** zarówno własnych limfocytów gospodarza, jak i przeszczepionych limfocytów. Tego efektu nie obserwuje się po DST. Z tego względu metoda biologicznej immunosupresji reakcji gospodarza na antygeny transplantacyjne dawcy za pomocą DST wydaje się teoretycznie w pełni uzasadniona.

Celem mojej pracy było uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

- 1/ jak wpływa dawco-specyficzna transfuzja krwi (DST) na przeżycie przeszczepionych dożylnie allogenicznych limfocytów, wiedząc, że przedłuża ona przeżycie alloprzeszczepu serca;
- 2/ jaki jest mechanizm oddziaływania DST na dożylnie przeszczepione allogeniczne limfocyty;
- 3/ w jakim stopniu antygeny zgodności tkankowej klasy I i II biorą udział w procesie reakcji na przeszczepione limfocyty.

1.2. Przegląd piśmiennictwa.

Dawco-specyficzne transfuzje krwi - opis zjawiska

Badania wpływu transfuzji krwi na odpowiedź immunologiczną rozpoczęły się w 1945 roku kiedy Medawar (33) zademonstrował, że we krwi występują te same antygeny co w innych tkankach. Zauważył on, że niektóre zwierzęta po transfuzji odrzucają przeszczepy skóry pochodzącej od dawcy krwi równie szybko co zwierzęta uczulone na antygeny dawcy przez uprzedni przeszczep skóry. (Należy zaznaczyć, że w modelu opisanym przez Medawara transfuzje nie we wszystkich przypadkach przyspieszały odrzucanie przeszczepu skóry). Obserwacje te wywarły bardzo silny wpływ na pierwsze lata transplantologii klinicznej. Klinicyści unikali przetaczania krwi bojąc się uczulić na antygeny dawcy przyszłych biorców przeszczepów. W 1964 roku Halasz (31) zaobserwował wydłużenie przeżycia przeszczepu nerki u psów, które otrzymywały krew dawcy przeszczepu. W 1973 w dużym retrospektywnym badaniu Opelz (29) wykazał istnienie pozytywnego wpływu transfuzji poprzedzających przeszczep na przedłużenie jego przeżycia. W 1980 roku Salvatierra (34) zastosował po raz pierwszy w klinice podawanie przyszłemu biorcy, transfuzji krwi dawcy przeszczepu (DST) uzyskując jeszcze lepsze wyniki przeżycia przeszczepu nerki. Kliniczne obserwacje spowodowały podjęcie szerokich badań tego zjawiska z zastosowaniem modelu zwierzęcego. Stwierdzono, że wpływ DST na przedłużenie przeżycia przeszczepu u gryzoni jest w dużym stopniu zależny od układu szczepowego zastosowanego w eksperymencie, rodzaju przeszczepu oraz czasu podania krwi. W niektórych kombinacjach szczepowych szczurów DST powoduje trwałe przeżycie przeszczepu, podczas gdy w innych efekt przedłużenia jest nieznaczny lub żaden (32,35,36,37). Zaobserwowano, że DST wydłuża znamienne przeżycie przeszczepu nerki (36,38,39), serca (26,32,37,41) lub wątroby (40), ma tylko nieznaczny wpływ na przeżycie przeszczepu skóry (42,43) lub trzustki (41) natomiast przyspiesza odrzucanie przeszczepu jelita cienkiego (44). Typowy protokół DST, efektywny w modelu szczurzym, polega na podaniu jednorazowej dożyłnej iniekcji krwi dawcy (0.5 - 2 ml) na siedem dni przed przeszczepem. Jeżeli czas między transfuzją a

przeszczepem jest zbyt długi pozytywny wpływ DST na przeszczep zanika, natomiast jeżeli jest zbyt krótki może nastąpić nadostre odrzucanie (45).

Mechanizm leżący u podłoża pozytywnego klinicznie efektu dawco-specyficznych transfuzji pozostaje nadal niejasny. Wiadomo, że nie jest on zależny od obecności grasicy. Blom wykazał, że usunięcie grasicy bezpośrednio przed podaniem DST nie skracało czasu przeżycia przeszczepu nerki u szczura (46).

Powstało wiele hipotez tłumaczących to zjawisko. Postulowano, że za przedłużenie przeżycia przeszczepu odpowiedzialna jest:

1. eliminacja klonów cytotoksycznych;
2. indukcja klonów supresyjnych;
3. indukcja przeciwciał antyidiotypowych;
4. czynniki nieswoiste takie jak produkcja prostaglandyny E2.

Wpływ DST na odpowiedź komórkowa.

Jedyną w pełni skuteczną metodą uzyskania tolerancji na alloantygeny jest opisana przez Billingham (47) indukcja tolerancji noworodkowej, polegająca na wstrzyknięciu płodom lub noworodkom komórek pochodzących od przyszłego dawcy. Uważa się, że dochodzi w takim przypadku do eliminacji klonu lub klonów limfocytów zdolnych do rozpoznania i odpowiedzi na dany alloantygen. Sugeruje się udział mechanizmów analogicznych do tych, które warunkują autotolerancję, a więc proces zachodzący w centralnych narządach limfatycznych, polegający na selekcji negatywnej. Na tej podstawie stworzono hipotezę, że DST wywołuje przedłużenie przeżycia przeszczepu powodując eliminację klonów cytotoksycznych skierowanych przeciwko alloantygenom dawcy.

Vandekerckhove et al. (48,49) zaobserwowali jednak, że u pacjentów po DST i transplantacji nerki znacząco wzrasta ilość prekursorów allospecyficznych klonów cytotoksycznych /CTL/, jak i prekursorów klonów pomocniczych /Th/. Opisano również wzrost alloreaktywnych CTL we krwi pacjentów otrzymujących liczne transfuzje krwi (50). U pacjentów tych wzrastała też aktywność cytotoksyczna skierowaną przeciwko własnym komórkom (51). Autorzy tłumaczą to zjawisko, pojawieniem się po transfuzji specyficznych klonów CTL, a następnie "wygaszanie" tej

odpowiedzi na drodze indukcji autoreaktywnych klonów niszczących te komórki.

U szczurów po DST wzrasta ilość specyficznych CTL, zaś badana w teście mieszanej hodowli limfocytów, aktywność proliferacyjna komórek z węzłów chłonnych oraz limfocytów z przewodu piersiowego tych szczurów jest znamienne niższa niż u szczurów po syngenicznej transfuzji (48).

Wąsowska (52) badając różne rodzaje aktywności cytotoksycznej u szczurów po DST i transplantacji nerki stwierdziła, że: cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał /ADCC/, limfoliza zależna od komórek /CML/ i aktywność komórek NK we krwi biorców DST są takie same jak u biorców autologicznej transfuzji /ABT/. Podobną aktywność CML, ADCC i NK wykazywały splenocyty obu grup biorców. Wyższą aktywność NK miały jedynie komórki naciekające przeszczep. Analiza fenotypowa komórek naciekających przeszczep, komórek śledziony oraz krwi obwodowej nie wykazywała znaczących różnic w ekspresji antygenów CD4 i CD8 między szczurami po DST a szczurami po ABT. Wydaje się więc, że wzmocnienie immunologiczne wywołane DST nie jest związane z redukcją CML, ADCC lub aktywności NK komórek efektorowych we krwi obwodowej, śledzionie i alloprzeszczepie.

Dane eksperymentalne i obserwacje kliniczne nie potwierdziły zatem hipotezy, że DST wywołuje eliminację specyficznych klonów cytotoksycznych. Można jednak przypuszczać, że DST wpływa na komórki cytotoksyczne zaburzając w jakiś sposób funkcje cytotoksyczne tych komórek np. zmniejszając produkcję czynników wspomagających dojrzewanie CTL. Limfokiny takie jak interleukina 2 /IL-2/, IFN γ , interleukina 4 /IL-4/, interleukina 5 /IL-5/, interleukina 6 /IL-6/ doprowadzają do aktywacji i namnażania się CTL, komórek zdolnych do wywierania bezpośredniego efektu cytotoksycznego względem komórek posiadających obce antygeny MHC klasy I na powierzchni. W pierwszych badaniach poziomu cytokin u biorców transfuzji wykazano obniżenie produkcji IL-2 (53,54), przy jednoczesnym nie zmienionym poziomie interleukiny 1 /IL-1/ (53). Komórki naciekające przeszczepy nerki u szczurów otrzymujących DST miały obniżoną ekspresję receptorów dla IL-2 (IL-2R) na skutek zredukowanej transkrypcji mRNA dla obu łańcuchów (α i β) tego receptora.

W wyniku tego komórki traciły zdolność do proliferacji w odpowiedzi na IL-2. Nie wytwarzały one również biologicznie czynnej IL-2. Indukcji tolerancji zapobiegało podanie zwierzętom rekombinacyjnej IL-2 w czasie transplantacji (55). Bugeon (56) stwierdził, że DST wywołuje defekt produkcji nie tylko IL-2 i jej receptora, ale również innej prozapalnej cytokiny jaką jest $IFN\gamma$. Wykazał on znaczne obniżenie poziomu mRNA dla $IFN\gamma$ oraz przełamanie efektu tolerancji na przeszczep po podaniu egzogennej $IFN\gamma$. $IFN\gamma$ jest jedną z cytokin wzmagających cytotoxycytność limfocytów T, komórek NK i cytotoxycytność komórkową zależną od przeciwciał. Jest on również jednym z mediatorów nadwrażliwości typu późnego /DTH/ w przebiegu której dochodzi do nieswoistego wciągania do odpowiedzi na przeszczep makrofagów i granulocytów. Poziom DTH jest obniżony u biorców DST (57,58). Obniżenie produkcji IL-2 i $IFN\gamma$ (limfokin prozapalnych) może wskazywać na zaburzenie funkcji jednej z subpopulacji limfocytów pomocniczych - subpopulacji Th1. Mosmann (59) opisał występowanie u myszy dwóch różniących się pod względem czynnościowym typów komórek pomocniczych Th1 i Th2. Z pewnym uproszczeniem można powiedzieć, że limfocyty Th1 działają pomocniczo w odpowiedzi typu komórkowego, a Th2 w odpowiedzi humoralnej. Różnice między nimi uwidaczniają się najwyraźniej jeżeli chodzi o produkowane przez nie cytokiny. Obydwa typy limfocytów mają na swojej powierzchni cząsteczki CD4. Limfocyty Th1 produkują IL-2 (stymulująca między innymi cytotoxycytność limfocytów) i $IFN\gamma$ (aktywujący makrofagi). Natomiast limfocyty Th2 produkują IL-4 i IL-5 (będące m.in. czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B) oraz interleukinę 10 /IL-10/, która oprócz innych właściwości supresyjnych, hamuje wydzielanie cytokin przez limfocyty Th1. Istnieje poza tym wiele limfocytów T pomocniczych, których profil wydzielniczy nie pasuje ani do Th1 ani do Th2. Wydaje się, że w trakcie swego funkcjonalnego różnicowania dojrzałe limfocyty Th przechodzą, po opuszczeniu grasicy, przez trzy etapy rozwoju, różniące się zakresem cytokin wydzielanych w wyniku aktywacji. Najpierw wydzielają głównie IL-2 potem wiele różnych cytokin (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, $IFN\gamma$ - wydzielanych przez tzw. subpopulację Th0), a w przypadku długotrwałej stymulacji antygenem różnicują się w limfocyty Th1 lub Th2. Sugeruje się, że limfocyty Th1 i Th2

aktywowane są przez różne komórki prezentujące antygen (60).

Zaburzenie produkcji limfokin prozapalnych jak i wyraźne objawy działania czynników supresyjnych, **przejawiające** się w postaci przedłużenia przeżycia przeszczepów, wydawały się wskazywać, że u zwierząt po DST nastąpiło zahamowanie rozwoju klonów Th1 z jednoczesną aktywacją klonów Th2. Potwierdził tę hipotezę Takeguchi (61) wykazując wyraźne zwiększenie transkrypcji mRNA dla IL-4 i IL-10 w komórkach naciekających przeszczep i w śledzionie zwierząt, u których wywołano tolerancję na alloantigen. Przebadano różne metody wywoływania tolerancji : DST, podawanie cyklosporyny A, terapię przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko cząsteczkom CD4, i wszystkie one powodowały wzrost transkrypcji IL-4 i IL-10. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (62). Badania ekspresji genów IL-2, IL-4 i IL-10, w biopsjach pochodzących od pacjentów z odrzucanym i tolerowanym przeszczepem serca, wykazały wysoki poziom mRNA IL-2 w przeszczepach odrzucanych. W przeszczepach tolerowanych wysoki był poziom mRNA dla IL-4 i IL-10 (63). Należy podkreślić, że przenoszenia wyników badań przeprowadzanych na gryzoniach do badań klinicznych należy dokonywać bardzo ostrożnie. W przypadku wyników dotyczących klonów pomocniczych Th1 i Th2 występują poważne różnice między obydwoma modelami, szczególnie w regulacji cytokinowej. I tak np. mysia IL-10 jest selektywnym inhibitorem produkcji cytokin przez klony Th1 (64), podczas gdy ludzka IL-10 wpływa na oba klony i przez oba jeat produkowana (65). Wydaje się jednak, że obniżenie produkcji IL-2 i wzrost produkcji IL-4 i IL-10 przez komórki naciekające przeszczepy u biorców, u których wystąpił stan tolerancji na przeszczep, występują w obu modelach.

O istotnym wpływie klonów Th2 na zjawisko tolerancji świadczyć może fakt, że udało się wywołać tolerancję na przeszczep skóry u myszy podając jej dożylnie komórki linii Th2 produkującej IL-4 i IL-10 (66). Natomiast podawanie myszom komórek z transfekowanym genem dla IL-4 (komórki te konstytutywnie produkowały IL-4) wydłużało przeżycie przeszczepu serca, ale nie wywoływało pełnej tolerancji (87).

Interleukina 4 odgrywa istotną rolę w aktywacji supresyjnych funkcji limfocytów

T. Gdy komórki T o fenotypie CD8+ są aktywowane w obecności IL-4 tracą swoją funkcję cytotoksyczną, przestają produkować IFN γ i nabywają zdolności do produkcji cytokin typu Th2 tzn IL-4, IL-5, IL-10 i indukują produkcję przeciwciał przez limfocyty B (68). Cytokiny te mogą wywierać efekt supresyjny hamując odpowiedź cytotoksyczną komórek CD8+ i CD4+ jak również hamując produkcję cytokin prozapalnych (69). Może to tłumaczyć obserwowane przez różnych badaczy pojawianie się, pod wpływem transfuzji krwi i DST, klonów o aktywności supresyjnej (26,70,71,72). Marquet (73) wykazał, że u szczurów po DST i transplantacji serca następuje generacja specyficznych klonów supresyjnych. Maki (74) stosując transfer komórek supresyjnych od wzmocnionych DST zwierząt uzyskał przedłużenie przeżycia przeszczepu skóry.

Na podstawie przedstawionych wyników można przyjąć hipotezę, że DST wywołuje zahamowanie odpowiedzi komórkowej na przeszczep na drodze zablokowania subpopulacji Th1, a pobudzenia subpopulacji Th2. Nie ma natomiast żadnych danych wskazujących na mechanizm i przyczyny tego zjawiska.

Wpływ DST na odpowiedź humoralna

O ile odpowiedź komórkowa biorców DST była szeroko badana przez wiele zespołów, o tyle odpowiedzi humoralnej nie poświęcono jak do tej pory dużo uwagi. Mając na względzie to, że stymulacja klonów Th2 wspomaga odpowiedź humoralną należałoby się spodziewać wzrostu produkcji przeciwciał przez biorców DST.

Downey i Sanfilippo (45) wykazali, że DST wywołuje silną cytotoksyczną reakcję humoralną. Jest ona mediowana przez IgM, ale jej miano szybko spada do poziomu tła. Przeciwciała te skierowane są głównie przeciwko antygenom MHC klasy I. Po silnej dawco-specyficznej odpowiedzi humoralnej wywołanej DST następuje indukcja przeciwciał antyidiotypowych skierowanych przeciwko idiotypom przeciwciał anty-MHC klasy I dawcy. Są to przeciwciała klasy IgM, IgG1 i IgG2. Termin transfuzji jest istotny dla wywołania efektu wzmocnienia przeżycia przeszczepu. I tak w układzie szczurzym transfuzja na 4 dni przed transplantacją nie zapobiega odzucaniu przeszczepu ponieważ produkcja przeciwciał antyidiotypowych

rozpoczyna się w czwartym dniu po DST. Miano przeciwciał antyidiotypowych osiąga maksimum między 7 a 11 dniem po transfuzji. Oluwole (75) wykazał, że surowica od szczurów immunizowanych przeszczepem skóry podana w dniu przeszczepu serca powoduje nadostre odrzucanie, natomiast podawanie tej samej surowicy przez kilka kolejnych dni przed przeszczepem serca przedłuża przeżycie przeszczepu. Może świadczyć to istotnym udziale przeciwciał antyidiotypowych we wzmacnieniu immunologicznym.

Według teorii sieci Jerne'go (76) przeciwciała antyidiotypowe, które skierowane są przeciwko miejscom wiążącym antygen innych przeciwciał, regulują w obrębie każdego organizmu poziom tych przeciwciał, przeciwko którym są skierowane. Przeciwciała antyidiotypowe mogą upodabniać się do antygeny i wiązać się z przeciwciałem skierowanym przeciwko temu antygenowi (ich paratop przypomina epitop antygeny) (77). Można założyć, że przeciwciała antyidiotypowe mając zdolność łączenia się z receptorem dla antygeny obecnym na limfocytach, mogą blokować odpowiedź immunologiczną na dany antygen. Pojawienie się przeciwciała antyidiotypowych w czasie odpowiedzi biorcy na DST zmniejszać może zarówno poziom krążących alloprzeciwciał jak i odpowiedź komórkową na alloantygen.

Cuturi (78) obserwował u szczurów po DST i przeszczepie serca niski poziom przeciwciał IgG i IgM skierowanych przeciwko antygenom MHC klasy dawcy. DST nie wpływało na poziom przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom MHC klasy II. Podobne wyniki uzyskali Baldwin i współpracownicy (79,80,81) prowadząc badania na modelu przeszczepu nerki szczura. Obniżenie poziomu przeciwciał przeciwko MHC klasy I dotyczyło przede wszystkim IgM, IgG1 oraz IgG2a. Należy zaznaczyć, że przeciwciała IgM silnie wiążą dopełniacz, zaś przeciwciała IgG2a pośredniczą w ADCC. Obniżenie ich produkcji pod wpływem DST może być jedną z przyczyn wydłużenia przeżycia przeszczepu w tym modelu.

Niespecyficzna immunosupresja po DST.

Przy rozpatrywaniu mechanizmów odpowiedzialnych za przedłużenie przeżycia przeszczepów narządowych na skutek transfuzji krwi należy brać również pod uwagę

wpływ niespecyficznych czynników supresyjnych. Keown i Descamps (82) sugerowali, że endocytoza dużej masy zniszczonych erytrocytów pochodzących z przetoczonyj krwi zaburza normalne funkcje fagocytarne makrofagów i powoduje uwalnianie prostaglandyny E2 (PGE2). Inni autorzy (83) wykazali jednak, że dożylnie podanie zniszczonych erytrocytów nie przedłuża przeżycia przeszczepu serca u szczura. Niemniej jednak wysoki poziom PGE2 we krwi biorców transfuzji krwi: jak i zwierząt po DST został opisany przez wielu badaczy (84,85,86). PGE2 jest jednym z metabolitów kwasu arachidonowego i cyklooksigenazy. Posiada ona szereg właściwości immunosupresyjnych takich jak: aktywacja limfocytów supresyjnych, zmniejszanie produkcji IL 2, obniżanie aktywności NK, inhibicja ekspresji antygenów MHC klasy I na makrofagach i komórkach śródbłonna. Jej przypuszczalna rola jako mediatora immunosupresji wywołanej transfuzją krwi została potwierdzona obserwacjami **zniesienia** immunosupresji na drodze inhibicji cyklooksigenazy lub przy pomocy przeciwciał anti-PGE (86), jak również przedłużeniem przeżycia przeszczepu po podaniu prekursora PGE2 jakim jest kwas linolowy (87,88). Wydłużenie to nie było istotne statystycznie. Autorzy tłumaczą to niestabilnością PGE2 oraz krótkim okresem jej półtrwania. Natomiast podawanie prekursorów PGE2 wraz z DST wykazywało synergizm i przedłużał znamienne przeżycie przeszczepu serca u szczura (88).

Przedstawione dane literaturowe wydają się świadczyć o tym, że za pozytywny efekt kliniczny dawco-specyficznych transfuzji krwi odpowiedzialnych jest kilka mechanizmów. Należą do nich: zablokowanie produkcji IL-2 i IFN γ przez komórki pomocnicze Th1, pobudzenie klonów Th2 do produkcji IL-4 oraz IL-10, pojawienie się przeciwciał antyidiotypowych, zmniejszenie poziomu przeciwciał cytotoksycznych oraz wzrost poziomu PGE2. Nadal jednak zjawisko to pozostaje nie w pełni wyjaśnione.

Mechanizmy odpowiedzialne za odrzucanie allogenicznych limfocytów.

Część przeszczepionych dożylnie allogenicznych limfocytów może być

"niespecyficznie" niszczone w pierwszych godzinach po dożylnym wstrzyknięciu, mimo że biorca nie był uprzednio uczulany na antygeny dawcy. Jak dotąd nie ma wielu danych dotyczących czasu i ilości przeżywających allogenicznych ludzkich leukocytów podanych dożylnie immunokompetentnym biorcom. Adams (89) określił przy pomocy badania chromosomu Y w białych krwinkach kobiet, które otrzymały transfuzję krwi od mężczyzn, że leukocyty podane allogenicznym biorcom wraz z transfuzją krwi przeżywają średnio dwa dni (od 1 do 6 dni). U 25% biorców nie udało się wykazać obecności leukocytów dawcy. Badania te przeprowadził metodą PCR (polimerase chain reaction - łańcuchowa reakcja polimerazy) umożliwiającą wykrycie bardzo małych ilości określonego fragmentu materiału genetycznego. Z badań porównawczych chorych leczonych allogenicznym przeszczepem szpiku i przeszczepem autologicznych komórek pnia z krwi obwodowej wynika, że pełna rekonstytucja następuje znacznie szybciej w przypadku autologicznego przeszczepu (90). Może to świadczyć o słabszym przeżyciu allogenicznych komórek.

Badania przeprowadzone na różnych gatunkach zwierząt: myszach, szczurach, owcach i świniami wykazały, że dożylnie podanie allogenicznych limfocytów nieuczulonym uprzednio biorcom wywołuje szybką eliminację tych komórek (91,92,93,94,95,96). Dożylnie podanie znakowanych radioaktywnym izotopem limfocytów powoduje różną dystrybucję radioaktywności w zależności od tego czy biorca jest syngeniczny czy allogeniczny w stosunku do dawcy komórek. W przypadku podania komórek allogenicznych radioaktywność węzłów chłonnych jest niższa, a nerek, wątroby, surowicy i moczu wyższa. Obserwowane różnice świadczą o niszczeniu znakowanych komórek przez allogenicznych biorców i wydalaniu przez nerki uwolnionego izotopu. Zjawisko to Rolstad i Ford (94) nazwali allogeniczną limfocytarną cytotoksycznością (ALC). Allogeniczne limfocyty podane dożylnie niszczone są bardzo szybko, pierwsze objawy tego zjawiska można obserwować już po 15 min. (94), a zakończone jest ono po 12-24 godzinach (97). Za miarę ALC przyjęto stosunek radioaktywności gromadzącej się w węzłach po podaniu limfocytów allogenicznych do radioaktywności w węzłach po podaniu limfocytów syngenicznych (tzw. LNR - lymph node radioactivity). LNR jest zależny od układu szczepowego. W

żadnym z przebadanych 100 układów szczepowych szczurów nie zaobserwowano jednak całkowitego niszczenia podanych komórek (98).

ALC nie jest mediowana przez limfocyty T o czym świadczy występowanie jej u zwierząt bezgrasiczych (93,99,100), ani przez limfocyty B - występuje u zwierząt pozbawionych tych komórek (99). Obserwuje się ją u zwierząt, u których zahamowano produkcję przeciwciał. Nie można przenieść jej wraz z surowicą (99). ALC jest natomiast hamowana przez surowicę anti-asialo GM1, pojawia się między 4 a 6 tygodniem życia i jest radiooporna. ALC wzrasta po podaniu polu I:C (polyinosinic polycytidilic acid) substancji indukującej produkcję interferonu (99,101). Sheng-Tanner i Miller (101) wykazali, że przeżycie podanych dożylnie allogenicznych limfocytów koreluje negatywnie z poziomem aktywności komórek naturalnie cytotoksycznych biorcy. Wszystko to świadczy za tym, że efektorami ALC są komórki naturalnie cytotoksyczne (99,101,102,103).

Komórki naturalnie cytotoksyczne (NK - natural killer cells) są komórkami limfatycznymi posiadającymi właściwości spontanicznego (bez uprzedniej immunizacji) zabijania komórek docelowych obejmujących niektóre komórki nowotworowe, komórki transformowane wirusem, jak również komórki allogeniczne. NK są komórkami różnymi od limfocytów B i T, nie ekspresjonują na swojej powierzchni ani receptora dla antygenów ani immunoglobulin powierzchniowych. Wykazano, że zdolność do niszczenia komórek docelowych przez NK jest odwrotnie proporcjonalna do ekspresji MHC klasy I na powierzchni tych pierwszych (104,105). Najlepiej udokumentowaną hipotezą tłumaczącą mechanizm rozpoznania alloantygenów przez komórki NK jest hipoteza "efektorowego zablokowania". Postuluje ona, że rozpoznanie przez komórki NK antygenów MHC klasy I na powierzchni komórki docelowej, powoduje przesłanie negatywnego sygnału do komórki NK. Zapobiega to aktywacji mechanizmu cytotoksycznego (104,105). Stwierdzono, że wiążące peptyd domeny cząsteczki MHC klasy I ($\alpha 1$ i $\alpha 2$) są niezbędne do rozpoznania komórki docelowej (40). Zamaskowanie na powierzchni szczurzych limfocytów MHC klasy I przez przeciwciała monoklonalne (OX18) powodowało niszczenie tych komórek przez syngeniczne aktywowane NK (106). Wyjątkowo podatne na cytotoksyczność NK są komórki mające na swojej

powierzchni defektywne antygeny MHC klasy I (pozbawione $\beta 2$ mikroglobuliny) (107).

Receptor NK biorący udział w rozpoznaniu alloantygeny nie został w pełni scharakteryzowany. U myszy wykryto antygen Ly-49 obecny na 15-20% komórek NK (108). Następnie stwierdzono, że istnieje cała rodzina genów Ly-49 (109). Moretta opisał rodzinę antygenów p58 (o m.c. 58 kDa), są one ekspresjonowane na powierzchni ludzkich NK. Zablockowanie tych struktur przez przeciwciała monoklonalne powodowało zablockowanie alloreaktywnej cytotoksyczności (105). U szczura za rozpoznanie alloantygenów odpowiedzialny jest zespół genów występujący w regionie RT1C MHC klasy I (110). Stwierdzono, że geny odpowiedzialne za zjawisko ALC u szczura są również w regionie RT1C (104).

Miejsce w którym zachodzi ALC nie jest znane. Autoradiograficzne badania Fossuma i Rolstada (111) wykazały obecność limfocytów ulegających ALC w miazdze białej śledziony głównie w płaszczu wokół tętniczek śledzionowych i w strefie okołokorowej węzłów chłonnych. Komórki te znajdowały się w bezpośrednim sąsiedztwie komórek palczastych (111,112).

Dotychczasowe dane wydają się wskazywać, że odrzucanie allogenicznych limfocytów przez nieuczulonych biorców odbywa się głównie na drodze mechanizmów komórkowych, w które zaangażowane są komórki NK.

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. Schemat doświadczeń i podział na grupy.

Schemat doświadczeń i podział na grupy doświadczalne przedstawiono w tabeli I.

2.2. Zwierzęta doświadczalne.

Badania prowadzono używając 3 wsobnych szczepów szczurów różniących się silnymi antygenami zgodności tkankowej (RT1): Lewis (LEW), Brown Norway (BN) i Dark Aguti (DA). Dawcami krwi, serca oraz limfocytów były szczury szczepu BN (RT1^h). Grupę dawców tzw. trzeciego szczepu stanowiły szczury DA (RT1^a). Biorcami były szczury szczepu LEW (RT1^l). Do badań używano szczurów o wadze 200 - 300 g, w wieku 3 - 6 miesięcy.

Na badania przeprowadzane na zwierzętach wyraziła zgodę Komisja Nadzoru nad Dokonywaniem Badań na Ludziach i Zwierzętach Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Kinicznej PAN. Szczury otrzymywały wodę i pokarm ad libitum. Wszystkie doświadczenia były przeprowadzane na zwierzętach znieczulonych wziewną narkozą eterową. Zwierzęta zabijano przecinając w znieczuleniu rdzeń kręgowy.

TABELA I. Schemat doświadczeń i podział na grupy.

Numer grupy	Liczba zwierząt w grupie	Przetoczenie	Czas po przetoczeniu w dobach	Dożylny przeszczep limfocytów znakowanych						Przeszczep serca
				⁵¹ Cr **					FITC ***	
				BN->LEW	BN>LEW opłaszczone		BN->LEW martwe	LEW->LEW	BN->LEW	
					anty-MHC I	anty-MHC II				
1a	6	krw BN->LEW (DST *)	7	+						
1b	6	krw BN->LEW (DST)	30	+						
1c	4	krw BN->LEW (DST)	7						+	
1d	4	krw BN->LEW (DST)	7		+					
1e	4	krw BN->LEW (DST)	7			+				
1f	6	krw BN->LEW	7					+		
1g	6	krw BN->LEW (DST)	7							+
1h	6	krw DA->LEW	7	+						
1i	6	krw DA->LEW	7							+
2a	6	surowica LEW (po DST) **** ->LEW	0	+						
2b	6	surowica LEW (po DST)(absorbowana na erytrocytach BN) ->LEW	0	+						
2c	6	surowica LEW ->LEW	0	+						
3a	6	LEW bez przetoczenia		+						
3b	6	LEW bez przetoczenia				+				
3c	6	LEW bez przetoczenia					+			
3d	4	LEW bez przetoczenia						+		
3e	6	LEW bez przetoczenia								+

* - DST (donor specific transfusion) przetoczenie krwi szczura tego samego szczepu co przyszły dawca przeszczepu.

** - po 6 godzinach badano radioaktywność: śledziony, węzłów chłonnych, szpiku, surowicy, krwinek, płuc, wątroby, jelita cienkiego.

*** - po 6 godzinach zamrażano: śledzionę, węzły chłonne i wątrobę. Następnie FITC (izotiocyjanian fluoresceiny) ujawniano metodą immunocytochemiczną i oceniano w mikroskopie świetlnym.

**** - surowicę LEW 7 dni po transfuzji krwi BN charakteryzowano in vitro oceniając:

a/ poziom przeciwciał cytotoksycznych LEW anty-BN;

b/ poziom przeciwciał opsonizacyjnych;

c/ obecność alloprzeciwciał klasy IgG i IgM wiążących się z limfocytami BN;

d/ zdolność blokowania MHC klasy I i II na limfocytach BN;

e/ wiązanie się frakcji surowicy z antygenami homogenatu limfocytów BN;

f/ wiązanie się surowicy z sercem BN.

2.3. Stosowane metody.

2.3.1. Transfuzje krwi (DST).

Dawcy krwi, znieczulonemu narkozą eterową, podawano dożylnie 200 jednostek heparyny. Następnie pobierano od niego krew z żyły głównej dolnej i 1 ml świeżo pobranej krwi podawano do żyły prąciowej znieczulonego biorcy. Transfuzja krwi BN szczurom szczepu LEW, którym następnie przeszczepiano limfocyty lub serce szczura szczepu BN była tzw. dawco-specyficzną transfuzją (DST - donor specific transfusion).

2.3.2. Przeszczep limfocytów.

Modelem dożylnego przeszczepu komórkowego był przeszczep limfocytów z krezkowych węzłów chłonnych. Limfocyty znakowano izotopem ^{51}Cr lub izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) i wstrzykiwano do żyły grzbietowej prącia (2×10^7 kom. w 1 ml PBS). W 6 godzin po infuzji znakowanych komórek określano stopień przeżycia przeszczepionych komórek badając odpowiednio: radioaktywność narządów limfatycznych i nielimfatycznych oraz lokalizację limfocytów znakowanych FITC w tkankach (krezkowe węzły chłonne, śledziona oraz wątroba).

Na podstawie wzoru rozmieszczenia radioaktywności w tkankach i narządach badanych szczurów można określić czy przeszczepione limfocyty przeżywają (wysoka radioaktywność w śledzionie, węzłach chłonnych, szpiku, jelicie cienkim świadczy o ich **zasiedlaniu**) czy ulegają zniszczeniu (wysoka radioaktywność uwolnionego izotopu w nerkach, wątrobie i surowicy). O niszczeniu podanych komórek, oprócz wzoru rozmieszczenia radioaktywności w tkankach, może świadczyć również niższy od jedności stosunek radioaktywności w węzłach chłonnych po podaniu komórek allogenicznych do radioaktywności w węzłach po podaniu komórek syngenicznych tzw. współczynnik LNR (lymph nodes radioactivity)

2.3.3. Przeszczep serca.

Heterotopowy przeszczep serca wykonywano standardową metodą mikrochirurgiczną (113). Świeżo pobrane i wypłukane roztworem soli fizjologicznej serce wszczepiano do jamy brzusznej biorcy zespalając "koniec do boku" tętnicę płucną dawcy z żyłą główną dolną biorcy, a następnie aortę wstępującą dawcy z aortą brzuszną biorcy. Zespolenie wykonywano szwem naczyniowym 8.0. Czynność serca oraz jego wielkość badano codziennie metodą palpacyjną. Ustanie skurczów serca przyjmowano za moment jego całkowitego odrzucenia.

2.3.4. Izolacja komórek z krezkowych węzłów chłonnych.

Po skrwawieniu i przecięciu rdzenia kręgowego pobierano od szczura, węzły krezkowe rozmieszczone wzdłuż żyły krezkowej górnej, oddzielano od otaczającej tkanki tłuszczowej i umieszczano w płynie RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Wlk. Brytania) uzupełnionym 10% płodowej surowicy cielecej (FCS) (Gibco). Następnie węzły rozdrabniano przy użyciu igieł preparacyjnych uwalniając z nich komórki. Zawiesinę komórek przepuszczano przez gazę młyńską. Uzyskane komórki płukano trzykrotnie w płynie RPMI 1640 z 10% FCS wirując każdorazowo przez 10 min. (400 g). Żywotność komórek oceniano przy pomocy testu z 0.25% błękitem trypanu.

2.3.5. Znakowanie izotopem ^{51}Cr limfocytów do przeszczepu.

Limfocyty zawieszano w PBS (10^8 komórek w 1 ml) i dodawano $50\mu\text{Ci}$ $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham, Wlk. Brytania) i inkubowano 45 min. w temperaturze 37°C . Po inkubacji zawiesinę komórek trzykrotnie płukano w PBS uzupełnionym 10% FCS wirując po 10 min. przy 460g. Następnie sporządzano zawiesinę o gęstości 2×10^7 komórek w 1 ml PBS i przy pomocy licznika promieniowania τ Gamma 5500B (Beckman) i mierzono jej radioaktywność. Żywotność komórek oceniano przy użyciu testu z 0.25% błękitem trypanu.

2.3.6. Znakowanie izotiocyanianem fluoresceiny limfocytów do przeszczepu.

Limfocyty wyizolowane z krezkowych węzłów chłonnych (5×10^7 /ml) zawieszano w płynie RPMI 1640 uzupełnionym 2% FCS i inkubowano z FITC (Sigma, Chem.Co., St.Louis, USA) w stężeniu $50 \mu\text{g}$ /ml przez 15 min. w temperaturze 37°C . Po inkubacji do zawiesiny komórek dodawano płynu RPMI o temperaturze 4°C , nawarstwiano ją na 5 ml FCS i wirowano przez 10 min. (400g), w celu zablokowania niezwiązanego FITC. Następnie komórki płukano trzykrotnie płynem RPMI i zawieszano w PBS. Wyznakowanie komórek sprawdzano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

2.3.7. Blokowanie antygenów MHC klasy I i II na przeszczepianych limfocytach przeciwciałami OX18 i OX6.

Komórki uzyskane z krezkowych węzłów chłonnych szczura szczepu BN i wyznakowane izotopem ^{51}Cr wg metody podanej w punkcie 2.3.4., zawieszano w PBS (gęstość komórek 2×10^7 w ml) i inkubowano z $50 \mu\text{l}$ przeciwciała monoklonalnego OX18 (Serotec Ltd., Oxford, U.K.) lub z $50 \mu\text{l}$ przeciwciała monoklonalnego OX6 (Serotec Ltd.). Inkubacja odbywała się w temperaturze 4°C przez 30 min. Przeciwciało OX18 jest skierowane przeciwko szczurzym antygenom MHC klasy I, zaś przeciwciało OX6 reaguje ze szczurzymi antygenami MHC klasy II. Po inkubacji komórki dwukrotnie płukano w płynie RPMI z 10% FCS. Tak przygotowane komórki podawano w ilości 2×10^7 szczurowi LEW w 7 dni po DST.

2.3.8. Przygotowanie zawiesiny martwych limfocytów.

Zawiesinę limfocytów wyznakowanych ^{51}Cr metodą podaną w punkcie 2.3.4. doprowadzano do gęstości 2×10^7 w 1 ml PBS i inkubowano 20 min. w temperaturze 50°C . Następnie komórki zamrażano w temperaturze -20°C i rozmrażano w

temperaturze 37°C, powtarzając tę procedurę trzykrotnie. Rozpad komórek sprawdzano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Podawano dożylnie nierozpuszczalne resztki i supernatant, odpowiadające dawce 2×10^7 komórek w 1 ml PBS, obliczonej przed procesem zamrażania.

2.3.9. Technika wstrzyknięć dożylnych.

Szczury poddawano standartowej narkozie eterowej. Zawiesinę komórek, krew, surowicę podawano do żyły grzbietowej prąca.

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

W 6 godzin po dożylnym podaniu komórek znakowanych izotopem ^{51}Cr szczury ponownie znieczulano i pobierano krew z żyły głównej dolnej, a następnie przecinano rdzeń kręgowy. Pobierano do oddzielnych probówek: elementy morfotyczne krwi, surowicę, krezkowe węzły chłonne, śledzionę, wątrobę, płuca, nerki, jelito cienkie, kości długie łap. Narządy i tkanki ważono przy użyciu wagi analitycznej. Radioaktywność próbek mierzono przy użyciu licznika promieniowania gamma (Becmann). Uzyskane wyniki przedstawiano jako stosunek radioaktywności odzyskanej do podanej wyrażony w procentach podzielony przez masę tkanki w gramach [%/g] (tzw. narządowa radioaktywność właściwa). Narządową radioaktywność właściwą szpiku obliczano dzieląc radioaktywność właściwą kości długich łap szczura przez współczynnik, który dla szpiku wynosi 28.3 (101).

2.3.11. Tkankowa lokalizacja przeszczepionych dożylnie limfocytów znakowanych izotocyjanianem fluoresceiny.

W 6 godzin po dożylnym podaniu znakowanych FITC allogenicznych lub syngenicznych limfocytów szczury ponownie znieczulano, przecinano im rdzeń

kregowy i pobierano śledzionę, kreskowe węzły chłonne oraz wątrobę. Fragmenty tych narządów (o wymiarach 3x3x3mm) zamrażano przez 60 sekund w ciekłym azocie. Następnie krojono skrawki grubości 5 μm używając Cryocut 1800 (Reichert-Jung). Uzyskane skrawki utrwalano 10 min. w acetonie o temperaturze 4°C. Po utrwaleniu skrawki inkubowano z surowicą króliczą (rozcieńczoną 1:5) przez 20 min., a następnie z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko FITC (DAKO, A/S, Glostrup, Denmark) (rozc. 1:50) przez 40 min. Po inkubacji preparaty płukano buforem TRIS/HCl o pH 7.4, po czym inkubowano z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko mysim immunoglobulinom związanym z alkaliczną fosfatazą (DAKO) (rozc. 1:25) przez 30 min. i ponownie płukano. W celu wywołania barwnej reakcji preparaty inkubowano z substratem dla alkalicznej fosfatazy złożonym z: buforu 0.1M Tris o pH 8.2; fosforanu AS-MX naftolu w N,N-dwumetylfornamidzie (Sigma, Chem.Co., St.Louis, USA) i fast red TR salt (Sigma) przez 30 min. Skrawki dobarwiano wodnym roztworem hematoksyliny.

2.3.12. Otrzymywanie surowicy od szczurów LEW, którym podawano DST.

W 7 dni po DST szczury szczepu LEW poddane narkozie eterowej skrwawiano z żyły głównej dolnej. Krew pozostawiano w temperaturze pokojowej do czasu utworzenia się skrzepu, a następnie wirowano przez 10 min. (1500 g). Surowicę zbierano, inkubowano w temperaturze 56°C przez 30 min. w celu pozbawienia dopełniacza, porcjowano i przechowywano w temperaturze -20°C.

2.3.13. Eliminacja przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom MHC klasy I BN z surowic szczurów LEW, którym podawano DST.

W celu usunięcia przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom MHC klasy I dawcy, surowicę DST absorbowano używając erytrocytów dawcy. Erytrocyty uzyskiwano z heparynizowanej krwi szczura szczepu BN. Krew odwirowywano przy

400 g przez 20 min. i z powierzchni usuwano tzw. "buffy coat" czyli warstwę utworzoną przez leukocyty krwi. Uzyskane erytrocyty czterokrotnie płukano w płynie Hanks'a wirując każdorazowo przez 5 min. (400 g). Z tak przygotowanej zawiesiny wykonywano rozmaz w celu sprawdzenia czy zawiesina nie zawiera białych krwinek. Surowicę LEW po DST, w objętości 500 μ l, absorbowano używając odwirowanej zawiesiny erytrocytów w tej samej objętości. Każdorazowa absorbcja trwała jedną godzinę i odbywała się w 4°C. Procedurę powtarzano trzykrotnie.

2.3.14. Charakterystyka surowic LEW po DST przy użyciu testów *in vitro*.

2.3.14a. Ocena miana przeciwciał cytotoksycznych zależnych od dopełniacza.

Przygotowywano szereg rozcieńczeń badanych surowic w PBS (1:1, 1:2, 1:4,...), w objętości 0.1 ml. Do każdej probówki dodawano po 2×10^6 limfocytów z krezkowych węzłów chłonnych szczura szczepu BN w objętości 0.1 ml. Zawiesiny inkubowano w temperaturze 37°C przez 45 min. Po inkubacji do każdej próbki dodawano po 0.4 ml liofilizowanego króliczego dopełniacza (Behringwerke AG, Marburg, Gremany) rozcieńczonego 1:15 w PBS i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godz. Następnie dodawano 0.25% błękit trypanu i określano procentowa zawartość komórek martwych w stosunku do 200 limfocytów liczonych przy użyciu mikroskopu świetlnego. Za miano przeciwciał cytotoksycznych w surowicy przyjmowano takie rozcieńczenie surowicy, w którym liczba martwych limfocytów była najwyższa. W każdym doświadczeniu przeprowadzano kontrolę żywotności limfocytów w środowisku PBS oraz w środowisku PBS z dopełniaczem.

2.3.14b. Ocena miana przeciwciał opsonizujących.

Do testu użyto makrofagów izolowanych z jamy otrzewnowej zdrowej myszy. Jamę otrzewnową płukano kilkakrotnie płynem Hanksa uzupełnionym 10% FCS. Uzyskaną zawiesinę płukano trzykrotnie, wirując 10 min. przy 460 g. Makrofagi

liczono, przygotowywano zawiesinę o gęstości $1,5 \times 10^6$ komórek / ml i rozlewano po 0,1 ml do studzienek płaskodennej płytki hodowlanej o średnicy 2 cm i głębokości 2 cm. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 1,5 godziny. Do testu przygotowywano zawiesinę limfocytów o stężeniu $1,5 \times 10^7$ komórek w 1 ml podłoża hodowlanego. Tak przygotowane limfocyty dodawano do probówek serologicznych, zawierających szereg rozcieńczeń badanych surowic ($10^{-1} \dots 10^{-6}$), pozbawionych termicznie dopełniacza, z dodatkiem 0,1 ml liofilizowanego dopełniacza królika rozcieńczonego 1 : 15 w PBS. Zawiesinę komórek inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C . Po zakończeniu wstępnej inkubacji, limfocyty wirowano 10 min. przy 460g. Osad zawieszano w 0,2 ml podłoża hodowlanego i przenoszono do studzienek płytki hodowlanej z preinkubowanymi makrofagami. Zawiesinę komórek inkubowano 30 min. w temperaturze 37°C . Następnie przemywano dwukrotnie podłożem hodowlanym. Aktywność przeciwciał opsonizujących oceniano pod mikroskopem świetlnym na podstawie obecności makrofagów z przyklejonymi do ich powierzchni dwoma limfocytami. Liczono jednocześnie makrofagi i przyklejone do nich limfocyty. Procentową zawartość makrofagów tworzących rozetki z limfocytami określano w stosunku do 200 liczonych makrofagów. Za miano przeciwciał opsonizujących w surowicy przyjmowano to rozcieńczenie, w którym ilość makrofagów była dwukrotnie niższa od ilości przyklejonych do nich limfocytów. W każdym doświadczeniu przeprowadzano badania kontrolne: był to układ, w którym znajdowały się limfocyty i makrofagi tylko w środowisku podłoża hodowlanego i dopełniacza.

2.3.14c. Badanie obecności allospecyficznych immunoglobulin klasy G i M opsonizujących na limfocyty BN.

Do testu użyto komórek wyizolowanych z krezkowych węzłów chłonnych szczurów szczepu BN, LEW i DA. W celu uniknięcia tworzenia się agregatów komórkowych zawiesinę limfocytów o gęstości $2 \times 10^7/\text{ml}$ przygotowywano w PBS nie zawierającym jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} . Komórki uzyskane z każdego szczepu szczurów

inkubowano z surowicą kontrolną (pochodzącą od szczura LEW, który nie otrzymywał DST), z surowicą szczura LEW po DST lub w PBS bez Ca^{+2} i Mg^{+2} ($50\mu\text{l}$ komórek + $50\mu\text{l}$ rozcieńczonej surowicy) w 4°C przez 30 min. Surowice były rozcieńczone 1:2. Następnie komórki płukano dwukrotnie w PBS nie zawierającym jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} wirując każdorazowo przez 5 min (460g). Po odpłukaniu 1×10^6 komórek inkubowano z $50 \mu\text{l}$ poliklonalnego króliczego przeciwciała skierowanego przeciwko szczurzym IgG związanego z FITC (Serotec Ltd.) lub z $50 \mu\text{l}$ poliklonalnego króliczego przeciwciała skierowanego przeciwko szczurzym IgM związanego z FITC (Serotec Ltd.) w temperaturze 4°C przez 30 min. Po dwukrotnym płukaniu w PBS nie zawierającym jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} komórki zawieszano w 0.6 ml 1% paraformaldehydu i analizowano w cytometrze przepływowym FACStar Plus (Becton Dickinson). W każdej badanej próbie analizowano 10000 komórek.

2.3.14d. Badanie blokowania antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej na przeszczepianych limfocytach BN, przez surowice szczurów LEW po DST.

Do testu użyto komórek uzyskanych z krezkowych węzłów chłonnych szczura szczepu BN zawieszonych w PBS nie zawierającym jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} (gęstość komórek 2×10^7 w ml). $50 \mu\text{l}$ zawiesiny komórek inkubowano z $50 \mu\text{l}$ rozcieńczonej 1:2, 1:4, 1:8 normalnej surowicy szczura LEW lub surowicy szczura LEW po DST, w temperaturze 4°C przez 30 min. Po inkubacji komórki płukano dwukrotnie w PBS nie zawierającym jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} wirując każdorazowo przez 5 min (460g). Następnie 1×10^6 komórek inkubowano z $50 \mu\text{l}$ związanego z FITC monoklonalnego przeciwciała (OX18) skierowanego przeciwko monomorficznym determinantom szczurzych antygenów MHC klasy I (Serotec Ltd.) lub z $50 \mu\text{l}$ związanego z FITC monoklonalnego przeciwciała (OX6) skierowanego przeciwko monomorficznym determinantom szczurzych antygenów MHC klasy II (Serotec Ltd.) w temperaturze w 4°C przez 30 min. Po dwukrotnym płukaniu w PBS nie zawierającym jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} komórki zawieszano w 0.6 ml 1% paraformaldehydu (Sigma) i analizowano

w cytometrze przepływowym FACStar Plus. W każdej badanej próbie analizowano 10000 komórek.

2.3.14e. Immunoblotting antygenów limfocytarnych wiążących się z surowicą LEW po DST.

Do testu użyto pełnego ekstraktu limfocytów z krezkowych węzłów chłonnych. Ekstrakt limfocytów uzyskiwano homogenizując mechanicznie krezkowe węzły chłonne szczura BN w 2 ml buforu TBS (0.025M Tris, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, pH 7.3) zawierającego 0.5% Tritonu X-100 oraz inhibitory proteaz (0.005M EDTA, 0.002M PMSF) (Sigma). Po 30 min. inkubacji homogenat wirowano 20 min. przy 80000g, zbierano nadsącz i wirowano 75 min. przy 80000 g. Całą preparatykę wykonywano w 4°C.

Zastosowany system rozdziału elektroforetycznego, przeniesienia antygenów z żelu na błonę i wywołania reakcji barwnej opisanych powyżej antygenów został dobrany eksperymentalnie. Otrzymane nadsącze poddawane były elektroforezie w 15% żelu poliakrylamidowym (PAGE) w warunkach denaturujących (0.1M bufor fosforanowy pH 7.0, 1% siarczan dodecylu, 1% merkaptoetanol, 7M mocznik, błękit bromofenolowy) (Sigma). Elektroforetycznie rozdzielone białka przenoszono na błonę nitrocelulozową firmy Sartorius metodą elektroelucji. Transfer antygenów z żelu SDS-PAGE wykonywano w aparacie firmy Hoeffler typu semi-dry, stosując 8 mA/cm² żelu przez 1 h. W celu uniknięcia niespecyficznego wiązania przeciwciał używanych w następnych etapach błony blokowano 10% FSC. Aby sprawdzić z o jakiej masie cząsteczkowej wiąże się surowicą LEW po DST, paski błony nitrocelulozowej z rozdzielonymi elektroforetycznie białkami ekstraktu limfocytów szczura BN, inkubowano najpierw z badaną surowicą lub normalną surowicą LEW (rozc. 1:5, 1:10, 1:50), a następnie z przeciwciałem przeciwko szczurzym IgG związanym z biotyną (DAKO). Tak uzyskany kompleks ujawniano przy pomocy ekstraktu awidyny związanej z peroksydazą (Sigma), a barwną reakcję uzyskiwano podając substrat dla peroksydazy jakim jest AEC-DMF (3-amino-9-dwuetylocarbazol w N,N

dwumetyloformamidzie) (Sigma) w buforze octanowym (50mM, pH 5.0) z H₂O₂. Rozdzielony elektroforetycznie ekstrakt inkubowano również z przeciwciałem OX18, a następnie z przeciwciałem przeciwko mysim immunoglobulinom związany z biotyną (DAKO), uzyskany kompleks ujawniano tą samą metodą co w przypadku badanej surowicy. Wszystkie etapy reakcji prowadzone były w temp. pokojowej przy ciągłym wahadłowym mieszaniu.

2.3.15. Badanie wiązania się surowicy LEW po DST z komórkami śródbłónka naczyń krwionośnych serca BN.

2.3.15a. Badanie histochemiczne.

Fragmenty serca szczura BN zamrażano przez 60 sekund w ciekłym azocie. Następnie krojono skrawki grubości 5 μm używając Cryocut 1800 (Reichert-Jung). Uzyskane skrawki utrwalano 10 min. w acetonie o temperaturze 4°C. Po utrwaleniu skrawki inkubowano z surowicą LEW po DST lub z normalną surowicą LEW przez 30 min. w temp. pokojowej, a następnie ze związany z alkaliczną fosfatazą przeciwciałem poliklonalnym skierowanym przeciwko szczurzym immunoglobulinom (DAKO, A/S, Glostrup, Denmark) (rozc. 1:20) przez 40 min. Po inkubacji preparaty płukano buforem TRIS/HCl o pH 7.4. W celu wywołania barwnej reakcji preparaty inkubowano z substratem dla alkalicznej fosfatazy złożonym z: buforu 0.1M Tris o pH 8.2; fosforanu AS-MX naftolu w N,N-dwumetylformamidzie (Sigma) i fast red TR salt (Sigma) przez 30 min. Skrawki dobarwiają wodnym roztworem hematoksyliny. Skrawki oceniano w mikroskopie świetlnym.

2.3.15b. Badanie wiązania surowicy LEW po DST z izolowanymi komórkami śródbłónka.

Izolacja komórek śródbłónka naczyń krwionośnych serca.

Pięciodniowe szczury szczepu BN i LEW znieczulano wziewną narkozą eterową i pobierano im serca. Serca rozdrabniano skalpelem i inkubowano w roztworze 0.03%

kolagenazy IV (Sigma) i 0.025% DNA-zy (Sigma) w RPMI. Inkubacja trwała 30 min i odbywała się w 37°C. Następnie skrawki przecierano przez metalowe sitko. Uzyskana zawiesinę płukano trzykrotnie w RPMI z dodatkiem 5% FCS wirując 10 min 460g. Komórki zawieszono w RPMI z 20% FCS inkubowano w plastikowych butelkach hodowlanych przez 3 godz. w 37°C, a następnie do hodowli używano tylko komórek, które przyczepiły się do plastiku. Hodowlę prowadzono w RPMI z 20% FCS z dodatkiem antybiotyków (100 U/ml Penicyliny/Streptomycyny firmy Gibco) w 37°C w atmosferze 5% CO₂. Namnożone komórki odklejano od plastiku inkubując 12 min w roztworze 0.5% trypsyny (Gibco) i 0.2% EDTA (Sigma). Następnie komórki płukano trzykrotnie w RPMI z 20% FCS.

Analiza cytometryczna

Do testu użyto hodowanych in vitro komórek śródbłonna serc szczurów szczepu BN i LEW. W celu uniknięcia tworzenia się agregatów komórkowych zawiesinę komórek o gęstości 2×10^7 /ml przygotowywano w PBS nie zawierającym jonów Ca⁺² i Mg⁺². Komórki uzyskane z każdego szczepu szczurów inkubowano z surowicą kontrolną (pochodzącą od szczura LEW, który nie otrzymywał DST), z surowicą szczura LEW po DST (50 μl komórek + 50 μl rozcieńczonej surowicy) w 4°C przez 30 min. Surowice były rozcieńczone 1:2. Następnie komórki płukano dwukrotnie w PBS nie zawierającym jonów Ca⁺² i Mg⁺² wirując każdorazowo przez 5 min (460g). Po odpłukaniu 1×10^6 komórek inkubowano je z 50 μl poliklonalnego króliczego przeciwciała skierowanego przeciwko szczurzym immunoglobulinom związanego z FITC (DAKO) w temperaturze 4°C przez 30 min. Po dwukrotnym płukaniu w PBS nie zawierającym jonów Ca⁺² i Mg⁺² komórki zawieszano w 0.6ml 1% paraformaldehydu i analizowano w cytometrze przepływowym FACStar Plus (Becton Dickinson). W każdej badanej próbie analizowano 10000 komórek.

2.3.16. Metody statystyczne.

Z kolejnych pomiarów w grupach doświadczalnych wyliczano średnią. Wyniki uzyskane w poszczególnych grupach doświadczalnych porównywano między sobą

posługując się testem parametrycznym t-Studenta przy $p = 0,05$. Wyniki przedstawiono w postaci histogramów podając średnią oraz odchylenia standardowe.

3. WYNIKI.

3.1.. Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach i narządach szczurów LEW, którym w 7 lub 30 dni po przetoczeniu krwi BN przeszczepiano dożylnie limfocyty BN znakowane ^{51}Cr .

Rozmieszczenie radioaktywności badane w 6 godzin po dożynym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN, w tkankach i narządach szczurów szczepu LEW, którym 7 dni (grupa 1a) lub 30 dni (grupa 1b) wcześniej podano 1 ml krwi BN (DST) oraz szczurów LEW kontrolnych, którym nie przetaczano krwi (grupa 3a) przedstawiono na ryc.1a i b. Narządowa radioaktywność właściwa (% radioaktywności podanej/ gram tkanki) narządów limfatycznych i elementów morfotycznych krwi była znamienne statystycznie niższa w grupie szczurów 7 dni po DST w stosunku do szczurów kontrolnych i wynosiła odpowiednio: w śledzionie - 7.61 ± 2.6 vs 29.72 ± 6.67 ; krezkowych węzłach chłonnych - 0.23 ± 0.19 vs 8.69 ± 3.81 ; szpiku - 2.17 ± 0.65 vs 3.33 ± 0.53 , jelicie cienkim - 0.08 ± 0.01 vs 0.59 ± 0.13 ; krwinkach - 0.19 ± 0.06 vs 0.43 ± 0.19 ; płucach - 0.69 ± 0.29 vs 1.60 ± 0.91 , ($p < 0.05$). Radioaktywność znamienne wzrastała: w surowicy - 0.26 ± 0.05 vs 0.09 ± 0.03 , wątrobie - 5.39 ± 1.18 vs 1.99 ± 0.5 , w nerkach - 1.58 ± 0.15 vs 0.47 ± 0.09 , ($p < 0.05$).

Podanie DST szczurom LEW na 30 dni przed przeszczepem limfocytów BN (grupa 1b) wywoływało znamienne statystycznie, w porównaniu ze szczurami kontrolnymi (grupa 3a), obniżenie radioaktywność: w śledzionie - 8.55 ± 3.5 vs 29.72 ± 6.67 ; krezkowych węzłach chłonnych - 0.56 ± 0.51 vs 8.69 ± 3.81 ; szpiku - 1.25 ± 0.5 vs 3.33 ± 0.53 ; jelicie cienkim - 0.12 ± 0.09 vs 0.59 ± 0.13 ; płucach - 0.61 ± 0.91 , ($p < 0.05$). Radioaktywność znamienne wzrastała: w surowicy - 0.18 ± 0.69 vs 0.09 ± 0.03 , wątrobie - 5.20 ± 0.51 vs 1.99 ± 0.5 , w nerkach - 0.73 ± 0.24 vs 0.47 ± 0.09 ($p < 0.05$). Nie było natomiast znamiennej różnicy w radioaktywności krwinek (0.3 ± 0.17 vs 0.43 ± 0.19).

Porównanie rozmieszczenia radioaktywności w grupach szczurów LEW,

którym przeszczepiano limfocyty BN w 7 (grupa 1a) lub 30 (grupa 1b) dni po DST wykazało duże podobieństwo między tymi grupami. Różnice statystyczne pojawiły się jedynie w radioaktywności nerek i szpiku. W grupie 1a wyższa była radioaktywność nerek (1.58 ± 0.15 vs 0.73 ± 0.24 , $p < 0.05$) i szpiku (2.17 ± 0.65 vs 1.25 ± 0.5 , $p < 0.05$).

Współczynnik LNR (stosunek radioaktywności w węzłach chłonnych po podaniu komórek allogenicznych do radioaktywności w węzłach po podaniu komórek syngenicznych) wynosił u szczurów LEW 7 dni po DST (grupa 1a) - 0.012, 30 dni po DST (grupa 1b) - 0.031 oraz w grupie LEW, którym nie przetaczano krwi (grupa 3a) - 0.483.

Na ryc.2a i b. przedstawiono porównanie rozmieszczenia radioaktywności w tkankach i narządach szczurów szczepu LEW w 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr martwych limfocytów BN (grupa 3b) oraz żywych limfocytów BN (grupa 3a). Radioaktywność w narządach limfatycznych i elementach morfotycznych krwi była znamienne statystycznie niższa w grupie szczurów, którym podawano martwe limfocyty w stosunku do szczurów, którym przeszczepiano żywe limfocyty. Wynosiła ona odpowiednio: w śledzionie - 3.42 ± 1.62 vs 29.72 ± 6.67 ; krezkowych węzłach chłonnych - 0.11 ± 0.05 vs 8.69 ± 3.81 ; szpiku - 1.46 ± 0.68 vs 3.33 ± 0.53 , jelicie cienkim - 0.12 ± 0.02 vs 0.59 ± 0.13 , krwinkach - 0.08 ± 0.03 vs 0.43 ± 0.19 ; ($p < 0.05$). Radioaktywność znamienne wzrastała: w surowicy - 0.41 ± 0.14 vs 0.09 ± 0.03 , w nerkach - 2.43 ± 0.39 vs 0.47 ± 0.09 ; ($p < 0.05$). Nie było różnic w radioaktywności wątroby - 2.26 ± 0.97 vs 1.99 ± 0.5 i płuc 1.01 ± 0.31 vs 1.64 ± 1.00 .

LNR w grupie szczurów LEW, którym podawano martwe limfocyty BN (grupa 3b) wynosił - 0.006.

3.2. Lokalizacja przeszczepionych dożylnie limfocytów BN znakowanych FITC, w tkankach LEW po DST.

W 6 godzin po dożylnym przeszczepie limfocytów BN znakowanych FITC

zaobserwowałam obecność wyznakowanych komórek w śledzionie szczurów LEW kontrolnych, którym nie przetaczano krwi BN (grupa 3d). Gromadziły się one w miazdze białej, głównie w strefach T-zależnych (ryc.3a). Natomiast w śledzionie szczurów LEW po DST (grupa 1c) były widoczne jedynie pojedyncze wyznakowane FITC limfocyty (ryc.3b). Nie było również śladów komórek niszczonych. Podobne obrazy obserwowałam w węzłach chłonnych (ryc.4a i b). W wątrobie szczurów kontrolnych występowały pojedyncze wyznakowane limfocyty i nieznaczne ilości "debris" komórkowego związanego z FITC (ryc.5a). Natomiast w wątrobie szczurów po DST obecne były duże ilości "debris" związanego z FITC i nie było wyznakowanych komórek (ryc.5b).

3.3. Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach i narządach szczurów LEW, które otrzymywały surowicę LEW po DST, a następnie limfocyty BN znakowane ^{51}Cr .

Podanie szczurom LEW 1ml surowicy pochodzącej od szczura LEW po DST bezpośrednio przed infuzją znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN (grupa 2a) wywoływało znamienne statystycznie w stosunku do kontroli, jaką stanowiły szczury LEW, którym podano 1 ml normalnej surowicy LEW (grupa 2c), obniżenie radioaktywności w śledzionie (14.2 ± 4.09 vs 31.03 ± 9.7 , $p < 0.05$), krezkowych węzłach chłonnych (1.11 ± 0.92 vs 5.38 ± 2.61 , $p < 0.05$), szpiku kostnym (1.65 ± 0.73 vs 3.50 ± 0.47 , $p < 0.05$), jelicie cienkim (0.21 ± 0.1 vs 0.59 ± 0.3 , $p < 0.05$). Radioaktywność w płucach malała, ale nieznamienne (0.91 ± 0.36 vs 1.96 ± 2.15). Radioaktywność krwinek w obu grupach nie różniła się znamienne (0.28 ± 0.04 vs 0.28 ± 0.05). Natomiast znamienne wzrastała w grupie 2a radioaktywność wątroby (4.69 ± 1.56 vs 2.83 ± 0.27 , $p < 0.05$). Obserwowałam również wzrost radioaktywności w surowicy (0.2 ± 0.14 vs 0.14 ± 0.04) i nerkach (0.9 ± 0.59 vs 0.63 ± 0.32), ale był on nieznamienne statystycznie (ryc.6a i b).

LNR w grupie szczurów LEW, którym podawano surowicę LEW po DST wynosił 0.061, a w grupie otrzymującej normalną surowicę LEW - 0.299.

Gromadzenie się radioaktywności w tkankach i narządach szczurów, które otrzymały surowicę LEW po DST (grupa 2a) w porównaniu ze szczurami LEW, którym podano DST (grupy 1a) było znamienne statystycznie wyższe w śledzionie (14.2 ± 4.09 vs 7.62 ± 2.61 , $p < 0.05$), jelicie (0.22 ± 0.1 vs 0.08 ± 0.01 , $p < 0.05$) i elementach morfotycznych krwi (0.28 ± 0.04 vs 0.19 ± 0.07 , $p < 0.05$).

3.4. Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach i narządach szczurów LEW, którym przed przeszczepieniem znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN podano absorbowaną surowicę LEW po DST.

Rozmieszczenie radioaktywności badane w 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN, w tkankach i narządach szczurów szczepu LEW, którym podano 1 ml absorbowanej na erytrocytach BN surowicy LEW po DST (grupa 2b) w porównaniu z grupą szczurów LEW, które otrzymały nieabsorbowaną surowicę LEW po DST (grupa 2a) przedstawiono na ryc.7a i b. Rozmieszczenie radioaktywności było podobne w obu grupach. Jedynie radioaktywność właściwa śledziony była znamienne statystycznie niższa u szczurów, którym podano absorbowaną surowicę, wynosiła ona 8.43 ± 2.4 vs 14.2 ± 4.09 , $p < 0.05$, zaś radioaktywność płuc była znamienne wyższa i wynosiła 3.81 ± 2.19 vs 0.91 ± 0.36 . Radioaktywność właściwa pozostałych narządów i tkanek wynosiła odpowiednio: krezkowych węzłów chłonnych - 0.4 ± 0.17 vs 1.11 ± 0.92 , szpiku kostnego - 1.44 ± 0.68 vs 1.65 ± 0.73 , jelita - 0.16 ± 0.03 vs 0.21 ± 0.1 , krwinek - 0.32 ± 0.1 vs 0.28 ± 0.04 , surowicy - 0.21 ± 0.09 vs 0.2 ± 0.14 , wątroby - 4.05 ± 0.72 vs 4.68 ± 1.56 , nerek - 0.91 ± 0.59 vs 0.93 ± 0.16 . LNR w tej grupie szczurów wynosił 0.022.

3.5. Rozmieszczenie radioaktywności po podaniu szczurom LEW po DST, opłaszonych przeciwciałami OX18 lub OX6 limfocytów BN znakowanych ^{51}Cr .

Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach i narządach szczurów szczepu

LEW po DST w 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN opłaszczonych przeciwciałem OX18 (grupa 1d), OX6 (grupa 1e) lub nieopłaszczonych (grupa 1a) przedstawiono na ryc.8a i b. Wzór rozmieszczenia radioaktywności we wszystkich trzech grupach był podobny. Znamienne statystycznie różnica dotyczyła jedynie śledziony w grupie zwierząt, którym przeszczepiano limfocyty opłaszczone przeciwciałem OX6 (grupa 1e), gdzie radioaktywność była niższa niż w obu pozostałych grupach (4.46 ± 1.01 gr.1d, 6.17 ± 0.6 gr.1e, 7.62 ± 2.61 gr.1a, $p < 0.05$). Niską radioaktywność właściwą miały: krezkowe węzły chłonne (0.16 ± 0.17 - gr.1d, 0.12 ± 0.07 - gr.1e), szpik (3.46 ± 1.41 - gr.1d, 3.28 ± 1.67 - gr.1e), jelito (0.07 ± 0.01 - gr.1d, 0.07 ± 0.03 - gr.1e), krwinki (0.2 ± 0.03 - gr.1d, 0.18 ± 0.08 - gr.1e), płuca (0.57 ± 0.21 vs 11.1 ± 1.05), a wysoką surowica (0.21 ± 0.08 - gr.1d, 0.18 ± 0.08 - gr.1e), wątroba (4.55 ± 0.96 - gr.1d, 5.25 ± 0.34 - gr.1e) i nerki (1.16 ± 0.37 - gr.1d, 0.99 ± 0.5 - gr.1e). LNR wynosił 0.008 w grupie, której przeszczepiano limfocyty opłaszczone OX18. W grupie, której przeszczepiano limfocyty opłaszczone OX6 wynosił on 0.006.

3.6. Rozmieszczenie radioaktywności po przeszczepie limfocytów BN szczyrom LEW, które otrzymywały transfuzje od DA.

Rozmieszczenie radioaktywności badane w 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN, w tkankach i narządach szczurów LEW, którym przetaczano krew DA (grupa 1h), krew BN (grupa 1a) oraz szczurów LEW kontrolnych, którym nie przetaczano krwi (grupa 3a) przedstawia ryc.9ab. W grupie LEW po transfuzji od DA (grupa 1h) znamienne niższa w porównaniu z grupą kontrolną (gr.3a) była radioaktywność właściwa: śledziony (20.55 ± 3.59 vs 29.72 ± 6.67 , $p < 0.05$), krezkowych węzłów chłonnych (1.50 ± 0.83 vs 8.69 ± 3.81 , $p < 0.05$) i jelita (0.24 ± 0.08 vs 0.12 ± 0.09 , $p < 0.05$), a wyższa wątroby (4.29 ± 2.1 vs 1.99 ± 0.5 , $p < 0.05$). Natomiast porównanie rozmieszczenia radioaktywności po podaniu krwi DA (gr.1h) z grupą po transfuzji od BN (DST) (gr.1a) wykazało większe gromadzenie się w śledzionie (20.55 ± 3.59 vs 7.61 ± 2.6 , $p < 0.05$),

węzłach chłonnych (1.50 ± 0.83 vs 0.23 ± 0.19 , $p < 0.05$), szpiku (3.11 ± 1.47 vs 2.17 ± 0.65), jelicie (0.24 ± 0.08 vs 0.08 ± 0.01 , $p < 0.05$), płucach (1.18 ± 0.39 vs 0.69 ± 0.29) i krwinkach (0.43 ± 0.16 vs 0.19 ± 0.06 , $p < 0.05$), a niższe gromadzenie się radioaktywności w surowicy (0.09 ± 0 vs 0.26 ± 0.05 , $p < 0.05$), nerkach (0.61 ± 0.18 vs 1.58 ± 0.15 , $p < 0.05$). LNR w grupie po transfuzji krwi DA wynosił 0.083 i był wyższy niż w obu grupach po DST (gr.1a - 0.012, gr.1b - 0.031), ale niższy niż w grupie bez transfuzji (gr.3a - 0.483).

3.7. Rozmieszczenie radioaktywności u szczurów LEW biorców krwi BN, po podaniu syngenicznych (LEW) limfocytów znakowanych ^{51}Cr .

Rozmieszczenie radioaktywności badane w 6 godzin po podaniu limfocytów LEW znakowanych ^{51}Cr , w tkankach i narządach szczurów LEW biorców krwi BN (grupa 1f) i szczurów LEW, którym nie przetaczano krwi (grupa 3c) przedstawiono na ryc.10a i b. Radioaktywność właściwa w poszczególnych tkankach i narządach była podobna w obu grupach i wynosiła odpowiednio: śledziona - 43.21 ± 7.4 vs 39.69 ± 6.38 ; krezkowe węzły chłonne - 18.91 ± 4.23 vs 17.99 ± 4.05 ; szpik kostny - 4.64 ± 0.83 vs 3.74 ± 1.93 ; jelito - 1.29 ± 0.42 vs 0.87 ± 0.66 ; krwinki - 0.47 ± 0.21 vs 0.59 ± 0.24 ; płuca - 1.45 ± 0.47 vs 1.67 ± 0.51 ; surowica - 0.1 ± 0.04 vs 0.06 ± 0.05 ; nerki - 0.51 ± 0.09 vs 0.41 ± 0.2 . Jedynie w wątrobie radioaktywność właściwa była znamienne wyższa w grupie szczurów, które otrzymały transfuzję krwi BN (2.78 ± 0.41 vs 1.88 ± 0.47). LNR w tej grupie (gr.1f) wynosił 1.05.

3.8. Poziom przeciwciał cytotoksycznych i opsonizujących w surowicy szczurów LEW po transfuzji krwi BN (DST).

W czterech surowicach szczurów LEW, którym 7 dni przed skrwawieniem podano krew szczura BN (sDST1; sDST2; sDST5; sDST6) nie stwierdziłam obecności przeciwciał cytotoksycznych w stosunku do limfocytów BN. W dwóch surowicach

(sDST3; sDST4) miano przeciwciał cytotoksycznych było bardzo niskie i wynosiło 1 : 16. Miana przeciwciał opsonizacyjnych wynosiły: sDST1; sDST2; sDST3; sDST5 - 10^{-3} , sDST4; sDST6 - 10^{-2} (Tab.II).

TABELA II.

Charakterystyka in vitro surowic pochodzących od szczurów LEW po DST

Numer surowicy	Miano przeciwciał cytotoksycznych	Aktywność opsoninowa
sDST1	brak	10^{-3}
sDST2	brak	10^{-3}
sDST3	1 : 16	10^{-3}
sDST4	1 : 16	10^{-2}
sDST5	brak	10^{-3}
sDST6	brak	10^{-2}

3.9. Występowanie allospecyficznych immunoglobulin klasy IgG i IgM w surowicy LEW po DST.

Analiza cytofluometryczna limfocytów BN inkubowanych z trzema surowicami LEW po DST (sDST1, sDST2, sDST3) wykazała, na powierzchni wszystkich limfocytów, obecność przeciwciał klasy IgG (ryc.11) oraz IgM (ryc.12). Kontrolę stanowiły komórki inkubowane z normalną surowicą LEW. Badane surowice zawierały przeciwciała klasy IgG (ryc.13) i IgM (ryc.14) wiążące się z powierzchnią limfocytów "trzeciego szczepu" (DA), ale intensywność tego wiązania była znacznie mniejsza niż w przypadku komórek BN. Natomiast żadna z przebadanych surowic nie

wiązała się z powierzchnią limfocytów LEW czyli biorcy transfuzji.

3.10. Blokowanie antygenów MHC BN przy pomocy surowicy LEW po DST.

Przebadalam trzy surowice pochodzące od szczurów LEW, biorców krwi BN (sDST1, sDST2, sDST3), pod kątem ich zdolności do blokowania wiązania przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom MHC z tymi antygenami na powierzchni limfocytów BN. Analiza cytofluorymetryczna limfocytów szczura szczepu BN inkubowanych z różnymi rozcieńczeniami (1:2, 1:4, 1:8) badanych surowic, a następnie z przeciwciałami monoklonalnymi OX18 (anty MHC klasy I) lub OX6 (anty MHC klasy II) związanymi z FITC, wykazała, że surowica LEW po DST nie blokowała wiązania limfocytarnych antygenów powierzchniowych z przeciwciałami OX18 (ryc.15) ani z OX6 (ryc.14). Kontrolę stanowiły limfocyty BN inkubowane z normalną surowicą szczura LEW.

3.11. Immunoblotting antygenów limfocytarnych BN wiążących się z surowicą LEW po DST.

Surowica szczurów LEW, którym podawano krew BN (DST) wiazała się z kilkoma białkami obecnymi w ekstrakcie limfocytów BN. Ekstrakt ten był rozdzielony elektroforetycznie, w warunkach redukujących, na 15% żelu SDS PAGE. Wynik jednego z eksperymentów przedstawiony jest na ryc.17. Najwyraźniej widoczny jest produkt wiązania z białkiem o masie ok. 60 kD. Surowica kontrolna nie wiazała się z tym białkiem. Przeciwciało OX18 (skierowane przeciwko antygenom MHC klasy I szczura) wiazało się z białkami o masie 45 i 12 kD.

3.12. Czasy przeżycia przeszczepów serca.

Średni czas przeżycia przeszczepu serca BN u szczurów LEW (grupa 3e) wynosił 7.5 ± 1 dnia. Jednokrotne przetoczenie szczurom LEW pełnej krwi szczepu BN (DST) na 7 dni przed przeszczepem serca (grupa 1g) wywoływało przedłużenie

przeżycia serca do 14 ± 2 dnia. Przetoczenie krwi szczura DA (grupa Ii) powodowało, że serce BN przeżywało u szczura LEW 11.5 ± 0.5 dnia. Różnice między wszystkimi grupami były istotne statystycznie.

3.13. Wiązanie się surowicy LEW po DST z komórkami śródbłonka naczyń krwionośnych serca BN.

Ocena w mikroskopie świetlnym barwnej reakcji immunocytochemicznej powstałej po inkubacji skrawków serca BN z surowicą LEW po DST lub z normalną surowicą LEW, a następnie z przeciwciałem związanym z AP, skierowanym przeciwko szczurzym immunoglobulinom, nie wykazała wyraźnych różnic w wiązaniu surowicy badanej i kontrolnej z komórkami śródbłonka naczyń krwionośnych serca BN (Ryc.18ab). Obserwowałam nieznaczny stopień wiązania się obu surowic ze śródbłonkiem.

Analiza cytofluorymetryczna izolowanych komórek śródbłonka serca BN inkubowanych z surowicą LEW po DST wykazała obecność immunoglobulin szczurzych na powierzchni tych komórek (Ryc.19). Badana surowica wiązała się również z izolowanymi komórkami śródbłonka szczura LEW, ale intensywność tego wiązania była znacznie mniejsza niż w przypadku komórek BN.

4.DYSKUSJA

W pracy mojej zaobserwowałam, że u szczurów LEW jednorazowa transfuzja krwi BN, podana na 7 lub 30 dni przed przeszczepem, przyspieszała odrzucanie podanych dożylnie, znakowanych ^{51}Cr lub FITC, limfocytów BN. Stopień odrzucania oceniałam na podstawie rozmieszczenia podanych limfocytów w limfatycznych i nielimfatycznych narządach biorcy. Niski poziom akumulacji komórek w śledzionie, węzłach chłonnych, oraz wysoki poziom znaczników w wątrobie i nerkach, świadczył o niszczeniu podanych komórek. Podobne, aczkolwiek bardziej zaznaczone, wzory rozmieszczenia radioaktywności obserwowałam po podaniu komórek martwych. W przeciwieństwie do przeszczepionych limfocytów, przeszczep serca przeżywał u biorców DST znamienne dłużej niż u zwierząt kontrolnych. Transfuzje krwi od szczurów "trzeciego szczepu" (DA) przyspieszały eliminację limfocytów, ale w mniejszym stopniu niż DST. Blokowanie antygenów MHC klasy I lub II na przeszczepianych limfocytach, przy pomocy przeciwciał monoklonalnych OX-18 (anty-MHC I) lub OX-6 (anty-MHC II), nie miało wpływu na eliminację tych komórek przez biorców DST. Efekt nadostrego odrzucania allogenicznych limfocytów można było przenieść wraz z surowicą zwierząt po DST, mimo że surowica ta nie zawierała przeciwciał cytotoksycznych skierowanych przeciwko antygenom MHC dawcy. W surowicy tej występowały natomiast allospecyficzne przeciwciała klasy IgG i IgM wiążące się z antygenami limfocytarnymi o masie cząsteczkowej ok.60 kD. Przeciwciała te nie były skierowane przeciwko antygenom MHC klasy I lub II. Surowica pochodząca od szczurów LEW po DST wiązała się również z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych serca BN i w nieznacznym stopniu z komórkami z serc LEW.

Stwierdzenie, że DST wydłuża przeżycie przeszczepu serca i jednocześnie powoduje nadostre odrzucanie dożylnie przeszczepionych limfocytów wydaje się być najistotniejszą obserwacją. Po pierwsze wskazuje ona na istnienie odmiennych mechanizmów odpowiedzialnych za odrzucanie przeszczepów narządowych i komórkowych, co może mieć duże znaczenie w dalszych badaniach dotyczących

przeszczepiania komórek. Po drugie wykazuje, że DST nie wywołuje u biorcy pełnego stanu tolerancji na antygeny dawcy.

Różny wpływ DST na przeżycie różnego rodzaju przeszczepów, znamienne przedłużanie przeżycia serca (32,37,26,41) i nerki (36,38,39), niewielkie skóry (42,43) lub trzustki (41), a nadostre odrzucenie jelita cienkiego (44) i limfocytów, może wynikać z różnic w zawartości komórek pasażerowych w tych przeszczepach, oraz z obecności na powierzchni komórek przeszczepionych antygenów specyficznych dla danej tkanki. Hipotezę, że komórki pasażerowe są bardziej immunogenne i dlatego inicjują proces odrzucania stworzył Snell w 1957 roku (114), a później rozwinął Steinmuller (115). Następnie wykazano, że pośród komórek pasażerowych komórki dendrytyczne stanowią najsilniejszy bodziec antygenowy (116,117). Oprócz komórek dendrytycznych każdy narząd zawiera zmienną liczbę limfocytów T i B, makrofagów i komórek mieloidalnych. Dlatego też każdy rodzaj przeszczepu narządowego posiada różną zdolność do allostymulacji.

W odpowiedzi immunologicznej na przeszczep istotną rolę odgrywają również specyficzne dla danej tkanki alloantygeny nie należące do głównego kompleksu zgodności tkankowej. Ich struktura nie jest dotąd poznana, w dużym stopniu jest to wynikiem odpowiedzi słabiej wyrażonej niż odpowiedź na antygeny MHC. Wykazano, że specyficzne dla tkanki antygeny są cząsteczkami rozpoznawanymi przez układ immunologiczny. Mogą wywoływać odpowiedź humoralną i komórkową, a co za tym idzie powodować destrukcję (zgodnych pod względem MHC) przeszczepionych narządów takich jak: skóra, serce lub nerka (118,119).

Furuya (120) stwierdził, że immunizacja szczurów na drodze przeszczepiania różnych narządów: skóry, serca oraz transfuzją krwi wywołuje różne efekty. Po przeszczepie skóry lub serca występuje nadostre odrzucanie przeszczepu wątroby i wysoki poziom przeciwciał cytotoksycznych skierowanych przeciwko śródbłonkowi naczyń krwionośnych, podczas gdy immunizacja krwią powoduje przedłużenie przeżycia wątroby i stosunkowo niski poziom przeciwciał słabo wiążących się ze śródbłonkiem. Autor tłumaczy to zjawisko możliwością występowania na śródbłonku specyficznych antygenów, które nie są obecne na komórkach krwi. W badanym przeze

mnie układzie, biorca DST immunizowany był limfocytami zawartymi w podawanej krwi i rozwijał odpowiedź humoralną na antygeny obecne na limfocytach, dlatego też następowało nadostre odrzucanie limfocytów. Obserwowałam również pewien poziom przeciwciał wiążących się z komórkami śródbłónka dawcy. Biorąc pod uwagę fakt, że DST znamienne wydłużało przeżycie przeszczepu serca można przypuszczać, że powstająca na skutek DST odpowiedź humoralna na antygeny obecne na komórkach śródbłónka nie jest na tyle rozwinięta aby spowodowała odrzucenie przeszczepu serca.

Rodzi się pytanie czy w procesie odrzucania limfocytów przez biorców DST istotną rolę spełniają antygeny MHC. Mimo że, w niektórych pracach (80) wskazuje się, że tylko antygeny RT1Aa (MHC klasy I szczura) są strukturami docelowymi przeciwciał powstających u szczurów po DST, to w świetle uzyskanych przeze mnie wyników oraz wyników innych autorów twierdzenie takie nie wydaje się być uzasadnione. O tym, że to nie przeciwo antygenom MHC klasy I skierowane są przeciwciała produkowane przez biorców DST świadczy obserwowane przeze mnie:

a/ wiązanie się surowicy DST z białkami o innej masie cząsteczkowej niż masa MHC klasy I;

b/ brak blokowania przez surowice DST wiązania MHC klasy I z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko tym antygenom;

c/ brak efektywności absorpcji surowicy DST na erytrocytach biorcy w usuwaniu efektu nadostrego odrzucania limfocytów.

Wielu autorów opisuje zahamowanie odpowiedzi na MHC klasy I u biorców DST (37,43,121). Poza tym wykazano, że pod wpływem DST ekspresja antygenów MHC obu klas wyraźnie wzrasta i jest nawet wyższa niż w przypadku komórek narządów przeszczepianych biorcom nie poddawanych DST (38,122), a narządy takie przeżywają znamienne dłużej. Gdyby rozwijała się u nich odpowiedź humoralna przeciwko MHC to byłyby one nadostro odrzucane.

W obserwowanym przeze mnie modelu wystąpiły natomiast inne allospecyficzne przeciwciała wiążące się z białkami o masie cząsteczkowej 60 kD. Spekulacje na temat jakie są to antygeny, na obecnym etapie badań byłyby przedwczesne. Można

przypuszczać, że nie są to tzw. słabe antygeny zgodności tkankowej, gdyż według dotychczasowych danych z literatury większość tych antygenów nie wywołuje odpowiedzi humoralnej, a jedynie odpowiedź komórkową (123,124). Uzyskane przeze mnie wyniki są zgodne z wynikami Singala (125), który obserwował w surowicy myszy poddawanych DST, przeciwciała klasy IgG specyficznie wiążące się z alloantygenami obecnymi na powierzchni limfocytów dawcy. Alloantygeny te miały masy cząsteczkowe 30 KD, 60 KD, 72 KD, 86 KD, 92 KD. Padany (126) badając, u pacjentów po licznych transfuzjach, obecność przeciwciał blokujących receptor dla fragmenty Fc immunoglobulin wykazała, że obecność ich koreluje pozytywnie z przedłużeniem przeżycia przeszczepu nerki i że skierowane są one przeciwko alloantygenom dawcy innym niż antygeny MHC klasy I. Absorbpcja surowic na erytrocytach nie usuwała ich własności blokujących. Przeciwciała te były klasy IgG i pojawiały się w ciągu 10 dni po transfuzji, zapobiegały aktywacji komórek efektorowych allospecyficznie blokując MLR. Petransy (127) uważa, że są to przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi TLX występującemu na limfocytach i trofoblaście. Antygen ten jest produktem polimorficznych genów. Powstawanie przeciwciał blokujących FcR u szczurów po DST wykazał Marshall (128). Absorbpcja na erytrocytach dawcy nie usuwała właściwości blokujących, w przeciwieństwie do absorbpcji na splenocytach. Autor wysnuwa wniosek, że są to przeciwciała skierowane przeciwko antygenom MHC klasy II. Biorąc pod uwagę wyniki moje, Padany i Singala można przypuszczać, że obserwowane przez Marshalla usunięcie aktywności surowicy przez absorbpcję na splenocytach jest wynikiem wiązania się przeciwciał z antygenami innymi niż antygeny MHC klasy II.

Jeżeli u biorców DST nie rozwija się cytotoksyczna odpowiedź na antygeny MHC, powstaje pytanie dlaczego tak się dzieje? Można przypuszczać, że zjawisko to jest spowodowane m.in. występowaniem przeciwciał antyidiotypowych, co zostało opisane (45). Powstają one w celu wygaszenia odpowiedzi na podany antygen. Dlaczego jednak nie zostaje zahamowana również odpowiedź na inne allospecyficzne antygeny (opisane wcześniej antygeny tkankowe)? Być może odpowiedź na nie jest o tyle słabsza, że nie uruchamia mechanizmu wygaszania przy pomocy przeciwciał

antyidiotypowych. Tak więc wydaje się, że DST najpierw pobudza odpowiedź na antygeny MHC, a następnie ją tłumi przy pomocy przeciwciał antyidiotypowych (45), a w krążeniu pozostają niecytotoksyczne allospecyficzne przeciwciała skierowane przeciwko antygenom obecnym na powierzchni limfocytów. Przeciwciała te nie są w stanie uszkadzać przeszczepionego narządu lub inicjować adhezję limfocytów biorcy, natomiast rozpoznając struktury docelowe na limfocytach opsonizują te komórki. Pokryte przeciwciałami allogeniczne limfocyty są zatrzymywane w wątrobie i tam niszczone. To, że nie obserwowałam w wątrobach biorców DST wyznakowanych komórek tylko debris komórkowe może wynikać z tego, że obserwacje były prowadzone po 6 godzinach, a zjawisko niszczenia komórek może mieć miejsce o wiele wcześniej.

Wpływ transfuzji krwi od "trzeciego szczepu" szczurów na przyspieszone odrzucanie limfocytów, jak również nieznaczne, ale znamienne przedłużenie przeżycia przeszczepu serca może być spowodowane krzyżową reaktywnością między alloantygenami dawcy krwi i alloantygenami dawcy przeszczepu, co opisują też inni autorzy (35).

Wydaje się, że przedłużanie przeżycia przeszczepu narządowego przez DST może być spowodowane m.in. niszczeniem na drodze opsonizacji przez niecytotoksyczne allospecyficzne przeciwciała, komórek pasażerowych wychodzących z przeszczepu. Larsen (129,130,131) opisał zjawisko migracji komórek dendrytycznych z unaczynionych przeszczepów do śledziony. Komórki te migrują drogą krwionośną (śledziona nie ma naczyń limfatycznych doprowadzających), wchodzi do śledziony i zatrzymują się w miazdze białej, w strefie brzeżnej w sąsiedztwie komórek CD4+. Ta droga następuje centralne wywołanie odpowiedzi na allogeniczny przeszczep narządowy. U biorców DST pasażerowe komórki dendrytyczne są w krwioobiegu opsonizowane, a następnie niszczone i nie dopływają do śledziony, a więc nie wywołują pobudzenia odpowiedzi na alloantygen. Ostatnio wykazano istnienie dwóch dróg rozpoznania alloantygeny (132). Drogę bezpośrednią gdy komórki T rozpoznają allogeniczne cząsteczki MHC obecne na powierzchni komórek dawcy (133) oraz drogę pośrednią kiedy komórki T rozpoznają alloantygen przetworzony przez komórki biorcy

i prezentowany w postaci peptydu związanego z MHC biorcy występującymi na powierzchni komórek prezentujących antygen (134). Obie te drogi nie wykluczają się wzajemnie, a każda z nich związana jest z pobudzeniem innych klonów komórek T. Braun (135) sugeruje, że komórki pobudzone bezpośrednio odgrywają rolę w ostrym odrzucaniu i we wczesnym jego etapie. Komórki dendrytyczne dawcy wchodzące do śledziony biorcy pobudzają odpowiedź właśnie tą drogą. Komórki pobudzone drogą pośrednią biorą udział w chronicznym odrzucaniu mediowanym humoralnie.

To, że DST zapobiega docieraniu do śledziony biorcy komórek pasażerowych dawcy i tą drogą zmniejsza odpowiedź na przeszczep narządowy wydaje się być sprzeczne z hipotezą "mikrochimeryzmu". Starzl (136,137) opisał występowanie u biorców przeszczepów wątroby i innych narządów, komórek dawcy w różnych narządach biorcy (skórze, narządach limfatycznych). Komórki te można było obserwować nawet wiele lat po przeszczepie. U takich biorców przeszczepy były tolerowane mimo przerwania leczenia immunosupresyjnego. Starzl stworzył hipotezę, że obecność tej nie wielkiej liczby komórek dawcy w organizmie biorcy wywołuje tolerancję na alloantygeny biorcy. Należy jednak podkreślić, że do wystąpienia tolerancji obserwowanej przez Starzl'a niezbędne było poddawanie biorców działaniu immunosupresji w pierwszej fazie odpowiedzi immunologicznej na przeszczep. Można przypuszczać, że obserwowany "mikrochimeryzm" jest wynikiem, a nie przyczyną tolerancji. Na skutek wytworzenia się tolerancji, w narządach limfatycznych biorców mogą współwystępować komórki biorcy i dawcy. DST nie wywołuje pełnej tolerancji na alloantygeny dawcy o czym świadczy odrzucanie podanych dożylnie limfocytów. Wydaje się więc, że w takiej sytuacji dojście do śledziony biorcy komórek pasażerowych przeszczepu wywołałoby **zwiększenie** odpowiedzi na antygeny dawcy, a nie wywołanie tolerancji.

Zaobserwowany przeze mnie negatywny wpływ dawco-specyficznych transfuzji krwi na przeżycie dożylnego przeszczepu limfocytów może mieć wpływ na rozumienie zjawisk odpowiedzialnych za odrzucanie allogenicznych limfocytów. Udział w tym zjawisku niecytotoksycznych przeciwciał skierowanych przeciwko innym antygenom niż antygeny MHC zwraca uwagę na takie aspekty procesu odrzucania, które do tej

pory wydawały się nie istotne. I tak np. biorcy allogenicznego szpiku, leczeni uprzednio transfuzjami, nie mający przeciwciał cytotoksycznych skierowanych przeciwko antygenom MHC dawcy mogą odrzucać przeszczepiony szpik. To samo może dotyczyć innych pacjentów leczonych przeszczepami limfocytów.

5. WNIOSKI

1. U szczurów w układzie pełnej niezgodności antygenów MHC transfuzja krwi BN podana LEW na siedem dni przed przeszczepem powoduje nadostre odrzucanie podanych dożylnie limfocytów pochodzących od tego samego dawcy co krew (BN).
2. Nadostre odrzucanie podanych dożylnie allogenicznych limfocytów można wywołać podając nieuczulonym zwierzętom surowicę pochodzącą od biorców dawco-specyficznych transfuzji.
3. Surowica ta zawiera niecytotoksyczne przeciwciała klasy IgG i IgM wiążące się allospecyficznie z powierzchnią limfocytów dawcy. Przeciwciała te wiążą się z białkiem o masie cząsteczkowej ok. 60kD i nie blokują wiązania przeciwciał monoklonalnych OX18 i OX6 z antygenami MHC klasy I i II.
4. Efektu przyspieszonego odrzucania allogenicznych limfocytów biorcom dawco-specyficznych transfuzji krwi nie można przełamać blokując antygeny MHC klasy I i II przeciwciałami monoklonalnymi OX18 i OX6.
5. Nadostre odrzucanie po DST dożylnie przeszczepionych allogenicznych limfocytów, a jednoczesne przedłużanie przeżycia allogenicznego przeszczepu serca wskazuje, iż nie tylko układ MHC, ale i inne układy alloantygenów odgrywają rolę w odrzucaniu allogenicznych komórek.

STRESZCZENIE

W transplantologii klinicznej i eksperymentalnej przeszczepy komórek stosuje się obecnie obok przeszczepów narządowych, ze względu na duże zapotrzebowanie na przeszczepianie komórek narządów, których czynność uległa ograniczeniu lub całkowitemu zahamowaniu wskutek procesu chorobowego (np. cukrzyca, niewydolność wątroby, miopatie). W ciągu ostatnich lat podjęto próby przeszczepiania wysepek Langerhansa, hepatocytów, mioblastów, komórek neurohormonalnych. Oprócz komórek wyizolowanych z narządów przeszczepiane są również komórki układu białokrwinkowego. Do tego typu przeszczepów należą: dożylny przeszczep szpiku, przeszczep limfocytów naciekających nowotwór, przeszczep cytotoksycznych limfocytów CD8⁺ specyficznie skierowanych przeciwko wirusom CMV lub HIV jak również przeszczep limfocytów z transfekowanym genem.

Teoretycznie proces odrzucania przeszczepionych narządów i komórek powinien zachodzić w podobny sposób, gdyż jedno i drugie mają na swojej powierzchni te same antygeny zgodności tkankowej. Zaobserwowano jednak istnienie znacznych różnic między długością przeżycia przeszczepu allogenicznego narządu i limfocytów. W procesie przyjmowania się przeszczepów komórkowych widoczne są, w porównaniu z przeszczepem całego, funkcjonalnie zintegrowanego narządu, znaczące odrębności. Wynikają one z zapotrzebowania na odpowiednie komórkowe i humoralne środowisko dla przeszczepionych komórek, zapewniające warunki dla ich prawidłowej czynności i proliferacji. Inna też jest kinetyka ataku komórek odpornościowych biorcy na przeszczepione komórki allogeniczne, w porównaniu z takim procesem w przeszczepionym narządzie. W modelu szczurzym przy pełnej niezgodności w obrębie głównego kompleksu zgodności tkankowej między dawcą a biorcą, przeszczepy serca przeżywały 6 do 8 dni, podczas gdy komórki limfoidalne przeszczepione dożylnie nieuczulonemu biorcy były niszczone w znacznym procencie już w ciągu 6 godzin.

Przeżycie przeszczepu allogenicznego narządu można skutecznie przedłużyć stosując środki immunosupresyjne :

- nieswoiste - zaburzające odpowiedź immunologiczną, uniemożliwiające ustrojowi biorcy przeszczepu uruchomienie mechanizmów obrony przed przeszczepem, ale

również przed zakażeniem (np. cyklosporynę A, sterydy nadnerczowe, surowicę antylimfocytarną);

- swoiste - skierowane na efekt działania antygenów transplantacyjnych i narządowych (np. podawanie prospektywnemu biorcy krwi dawcy tzw. dawco-specyficzne przetaczanie krwi-DST).

Zupełnie nie wiadomo jak przebiega proces hamowania ataku komórek odpornościowych gospodarza na przeszczep allogenicznych komórek, przy zastosowaniu wyżej wyliczonych środków immunosupresyjnych.

Celem mojej pracy było sprawdzenie: jaki wpływ na przeżycie przeszczepionych dożylnie limfocytów ma dawco-specyficzna transfuzja (DST) - metoda przedłużająca znamienne przeżycie przeszczepów narządowych; jaki jest mechanizm oddziaływania DST na dożylnie przeszczepione allogeniczne limfocyty oraz w jakim stopniu antygeny zgodności tkankowej klasy I i II biorą udział w procesie reakcji na przeszczepione limfocyty.

Badania prowadziłam używając 3 wsobnych szczepów szczurów różniących się silnymi antygenami zgodności tkankowej (RT1): Lewis (LEW), Brown Norway (BN) i Dark Aguti (DA). Dawcami krwi, serca oraz limfocytów były szczury szczepu BN (RT1^a). Grupę dawców tzw. trzeciego szczepu stanowiły szczury DA (RT1^a). Biorcami były szczury szczepu LEW (RT1^b). DST wykonywałam podając szczurowi LEW 1ml krwi BN na 7 lub 30 dni przed przeszczepem limfocytów BN. Limfocyty pochodziły z krezkowych węzłów chłonnych, znakowane były ⁵¹Cr i podawane były i.v. w dawce 2×10^7 . W 6 h po podaniu znakowanych komórek mierzyłam radioaktywność narządów limfatycznych, wątroby, surowicy, elementów morfotycznych krwi, płuc i nerek. Tkankową lokalizację przeszczepionych dożylnie limfocytów badałam podając szczurom komórki znakowane izotocyjanianem fluoresceiny. Surowicę od szczurów LEW po DST otrzymywałam po 7 dniach od transfuzji. W celu usunięcia przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom MHC klasy I dawcy, surowicę LEW po DST absorbowałam na erytrocytach BN. Surowice absorbowane i nieabsorbowane podawałam i.v. razem ze znakowanymi ⁵¹Cr limfocytami BN szczurowi LEW. Aby określić rolę cząsteczek zgodności tkankowej klasy I i II w procesie odrzucania

allogenicznych limfocytów, blokowałam te cząsteczki przeciwciałami monoklonalnymi OX-6 (anty-MHC II) oraz OX-18 (anty-MHC I) na znakowanych ^{51}Cr komórkach, które następnie były podawane i.v. szczurom LEW po DST. Przeciwciała cytotoksyczne zależne od dopełniacza oznaczałam standardowym testem mikrolimfocytotoksycznym. Allospecyficzne przeciwciała klasy IgG i IgM wiążące się z limfocytami oraz z komórkami śródbłonka naczyń krwionośnych serca biorcy oznaczałam w cytometrze przepływowym używając związanych z FITC króliczych poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko szczurzym IgG i IgM. W celu sprawdzenia z białkami o jakiej masie cząsteczkowej wiążą się te przeciwciała wykonałam immunoblotting antygenów limfocytarnych BN wiążących się z surowicą LEW po DST.

W pracy mojej zaobserwowałam, że u szczurów LEW jednorazowa transfuzja krwi BN, podana na 7 lub 30 dni przed przeszczepem, przyspieszała odrzucanie podanych dożylnie, znakowanych ^{51}Cr lub FITC, limfocytów BN. Stopień odrzucania oceniałam na podstawie rozmieszczenia podanych limfocytów w limfatycznych i Nielimfatycznych narządach biorcy. Niski poziom akumulacji komórek w śledzionie, węzłach chłonnych, oraz wysoki poziom znaczników w wątrobie i nerkach, świadczył o niszczeniu podanych komórek. Podobne, aczkolwiek bardziej zaznaczone, wzory rozmieszczenia radioaktywności obserwowałam po podaniu komórek martwych. W przeciwieństwie do przeszczepionych limfocytów, przeszczep serca przeżywał u biorców DST znamienne dłużej niż u zwierząt kontrolnych. Transfuzje krwi od szczurów "trzeciego szczepu" (DA) przyspieszały eliminację limfocytów, w mniejszym stopniu niż DST. Blokowanie antygenów MHC klasy I lub II na przeszczepianych limfocytach, przy pomocy przeciwciał monoklonalnych OX-18 (anty-MHC I) lub OX-6 (anty-MHC II), nie miało wpływu na eliminację tych komórek przez biorców DST. Efekt nadostrego odrzucania allogenicznych limfocytów można było przenieść wraz z surowicą zwierząt po DST, mimo że surowica ta nie zawierała przeciwciał cytotoksycznych skierowanych przeciwko antygenom MHC dawcy. W surowicy tej występowały natomiast allospecyficzne przeciwciała klasy IgG i IgM wiążące się z antygenami limfocytarnymi o masie cząsteczkowej ok. 60 kD. Przeciwciała te nie były

skierowane przeciwko antygenom MHC klasy I lub II. Surowica szczurów LEW po DST wiązała się również z powierzchnią izolowanych komórek śródbłonna naczyń krwionośnych serca BN.

Stwierdzenie, że DST wydłuża przeżycie przeszczepu serca i jednocześnie powoduje nadostre odrzucanie dożylnie przeszczepionych limfocytów wydaje się najistotniejszą obserwacją. Po pierwsze wskazuje ona na możliwość istnienia częściowo odmiennych mechanizmów odpowiedzialnych za odrzucanie przeszczepów narządowych i komórkowych, co może mieć duże znaczenie w dalszych badaniach dotyczących przeszczepiania komórek w klinice. Po drugie wykazuje, że DST nie wywołuje u biorcy stanu pełnej tolerancji na antygeny dawcy.

PIŚMIENNICTWO

1. Hering B.J., Brandhorst H., Brandhorst D. et al (1994): Human islet allotransplantation into six type-1 diabetics with established kidney grafts. *Cell Transpl.* 3, 211
2. Jain K., Cai B.R., Patel S. et al. (1994): Class I antigen disparity is not a barrier to successful pancreatic islet engraftment. *Cell Transpl.* 3, 217
3. Posselet A.M., Barker C.F., Tomaszewski J.E. et al. (1990): Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 249, 1293-1295
4. Mito M., Kusano M. (1993): Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transpl.* 2, 65-74
5. Mito M., Kusano M., Sawa M. (1993): Hepatocyte Transplantation for hepatic Failure. *Transpl.Rev.* 7,35-43
6. Gupta S., Johnstone R., Darby H., Selden C., Price Y., Hodgson H.J.F. (1987): Transplanted isolated hepatocytes: Effect of partial hepatectomy on proliferation of long-term syngeneic implants in rat spleen. *Pathology* 19, 28-30
7. Law P.K., Goodwin T., Fang Q. et al. 1994: Whole Body Myoblast Transfer. *Cell Transpl.* 3, 229
8. Bjorklund A. (1992): Neural transplantation: an experimental tool with clinical possibilities. *Cell Transpl.* 1, 191.
9. Martin P.J., Hansen J.A., Storb R., Thomas E.D. (1987): Human marrow transplantation: An immunological perspective. *Adv.Immunol.* 40, 379-400
10. Rosenberg S.A., Spiess P., Lafreniere R. 1986: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318
11. Marcus S.G., Perry-Lalley D., Mule J.J., Rosenberg S.A., Yang J.C. (1994): The use of interleukin-6 to generate tumor-infiltrating lymphocytes with enhanced in vivo antitumor activity. *J.Immunother.Emphasis Tumor Immunol.* 15, 105-112

12. Ikarashi H., Fujita K., Takakuwa K. et al. (1994) Immunomodulation in patients with epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Res.* 54, 190-196
13. Riddell S.R., Watanabe K.S., Goodrich J.M. et al. 1992: Restoration of viral immunity in immunocompromised humans by the adoptive transfer of cell clones. *Science* 257, 238-241
14. Riddell S.R., Gilbert M.J., Greenberg P.D. 1993: CD8+ cytotoxic T cell therapy of cytomegalovirus and human immunodeficiency virus infection. *Curr.Opin.Immunol.*5, 484
15. Bex F., Hermans P., Sprecher S. et al. (1994): Syngeneic adoptive transfer of anti-Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)-primed lymphocytes from a vaccinated HIV-seronegative individual to his HIV-1-infected identical twin. *Blood* 84, 3317-3326
16. Richt J.A., Schmeel A., Frese K. et al. (1994): Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological borna disease. *J. Exp. Med.* 179, 1467-1473
17. Dieli F., Asherson G.L., Romano G.C. et al. (1994): IL-4 essential for the systemic transfer of delayed hypersensitivity by T cell lines. *J. Immunol.* 152, 2698-2704
18. Papadopoulos E.B., Ladanyi M., Emanuel D. et al. (1994): Infusion of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 330, 1185-1191
19. Rosenberg S.A., Aebersold P., Cornetta K. et al. 1990: Gene transfer into humans: immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N.Engl.J.Med.* 323, 570-576
20. Nienhuis A.W. (1994): Gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood Cells* 20, 141-148
21. Miller A.D. (1992): Human gene therapy comes of age. *Nature* 357, 455-460
22. Culver K., Cornetta K., Morgan R. et al. (1991): Lymphocytes as cellular

- vehicles for gene therapy in mouse and man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3155-3159
23. Orlewska E., Olszewski W.L. (1987): Rejection of allogeneic lymphocytes and heart allografts from the same donor is mediated by different mechanism. *Transpl. Proc.* 19, 437-438
24. Orlewska E., Olszewski W.L. (1987): Different kinetics of rejection of transplanted allogeneic lymphocytes and heart from the same donor. *Eur.Surg.Res.* 19, S.1, 19
25. Orlewska E., Olszewski W.L. (1989): Comparison of natural elimination of i.v. transplanted lymphoid and nonlymphoid cells by unsensitized allogeneic and syngeneic recipients. *Transpl.Proc.* 21, 190-191
26. Wąsowska B., Adamczyk G., Ryffa T., Ziółkowska H., Olszewski W.L. (1989): Prolongation of heart graft survival and spleen suppressor cell activity after donor specific blood transfusion in rats differing across the MHC. *Arch.Immunol.et Ther.Exp.* 37, 1-10
27. Romaniuk A., Ryffa T., Rowiński W., Olszewski W.L. (1989): Prolongation of heart allograft survival in course of donor specific antigen and alloserum treatment in the rat. *Arch.Immunol.et Ther.Exp.* 37, 253-260
28. Olszewski W.L., Orlewska E., Ryffa T., Podgórska D. (1990): Allogeneic lymphocytes are rejected by CsA-treated rats with accepted heart allograft from the same donor in a hyperacute fashion. *Transpl.Proc.* 22, 1985-1986
29. Opelz G., Sengar D.P.S., Mickey M.R. et al. (1973): Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant. Proc.* 5, 253-259
30. Opelz G., Terasaki P.I. 1978: Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. *N.Engl.J.Med.* 299,799-803
31. Halasz N.A., Orloff M.J., Hirose F. (1964): Increased survival of renal homografts in dogs after injection of graft donor blood. *Transplantation* 2, 453-458
32. Soullillou J.P., Blandin F., Gunther E., Lemoine V. (1984): Genetics of the

- blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 41, 63-69
33. Medawar P.B. (1945): Immunity to homologous grafted skin. *Br.J.Exp.Pathol.* 127, 15-24
 34. Salvatierra O.Jr, Vincenti F., Amend W. et al. (1980): Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach. *Ann.Surg.* 192, 543-552
 35. Peugh W.N., Wood K.J., Morris P.J. (1988): Genetic aspects of blood transfusion effect. *Transplantation* 46, 438-443
 36. Fabre J.W., Morris P.J. (1972): The effect of donor strain blood pretreatment on renal allograft rejection in rats. *Transplantation* 14, 708-710
 37. Hamano K., Ohmi M., Esato K., Fukumoto T. (1989): Effect of donor specific transfusion is restricted to the rat combination used and closely related with alloantibody in heart transplantation. *Immunol.Cell.Biol.* 67, 297-302
 38. Armstrong H.E., Bolton E.M., McMillan I., Spencer S.C., Bradley J.A. (1987): Prolonged survival of actively enhanced rat renal allografts despite accelerated cellular infiltration and rapid induction of both class I and II MHC antigens. *J.Exp.Med.* 164, 891-907
 39. Quigley R.L., Wood K.J., Morris P.J. (1988): Investigation of the mechanism of active enhancement of renal allograft survival by blood transfusion. *Immunology* 63, 373-381
 40. Ishii E., Sumimoto R., Yamaguchi A. (1992): A role for MHC antigens in donor-specific blood transfusion for the inhibition of liver allograft rejection in the rat. *Transplantation* 54, 750-751
 41. Cooke J.C., McBride J.L., Schulak J.A. (1989): A comparison between pancreas and heart allotransplantation after administration of donor-specific antigen and cyclosporine. *Transplantation* 48, 15-19
 42. Okazaki H., Maki T., Wood M.L., Monaco A.P. (1980): Effect of single transfusion of donor-specific and non-specific blood on skin allograft in mice. *Transplantation* 30, 421-
 43. Lenhard V., Renner D., Hansen B., Opelz G. (1985): Suppression of antibody

- response and prolongation of skin graft survival by multiple blood transfusions in the rat. *Transplantation* 39, 424-429
44. Fecteau A., Tchervenkov J., Guttman F.M., Rosenmann E. (1992): Small bowel transplantation in the rat: The effect of donor-specific transfusion 24 hours pretransplant and cyclosporine. *Transpl.Proc.* 24, 1166
 45. Downey III W.E., Bladwin III W.M., Sanfilippo F. (1990): Association of donor-specific blood transfusion enhancement of rat renal allografts with accelerated development of antiidiotypic antibodies and reduced alloantibody responses. *Transplantation* 49, 160-166
 46. Blow O., Baldwin W.M.III, Sanfilippo F.P. (1993): Evidence that the thymus has significant role in donor-specific blood transfusion-induced rat renal allograft enhancement. *Transplantation* 56, 1558-1560
 47. Billingham R.E., Brent I., Medawar P.B. (1953): Actively acquire tolerance to foreign cells, twin diagnosis and the Freemartin condition in cattle. *Nature* 172, 603-606
 48. Vandekerckhove B.A.E., van Bree S., Zhang L. et al. (1989): Increase of donor-specific cytotoxic T lymphocyte precursors after transfusion. *Transplantation* 48, 672-675
 49. Vandekerckhove B.A.E., Datema G., Zantvoort F., Claas F.H.J. (1990): An increase of donor-specific T helper precursors resulting from blood transfusions. *Transplantation* 49, 987-991
 50. Kaminski E.R., Hows J.M., Goldman J.M., Batchelor (1990): Pretransfused patients with severe aplastic anemia exhibit high number of cytotoxic T lymphocyte precursors probably directed at non-HLA antigens. *Br.J.Hematol.* 76, 401-405
 51. Kaminski E.R., Hows J.M., Goldman J.M Batchelor J.R. (1991): Lymphocytes from multi-transfused patients exhibit cytotoxicity against autologous cells. *Br.J. of Haematol.* 81, 23-26
 52. Wasowska B., Baldwin III W.M., Howell D.N., Sanfilippo F. (1991): The effects of donor-specific blood transfusion enhancement of rat renal allografts

- on cytotoxic activity and phenotypes peripheral blood lymphocytes , splenocytes, and graft-infiltrating cells. *Transplantation* 51, 451-459
53. Stephan R.N., Kisala J.M., Dean R.E. et al. (1988): Effect of blood transfusion on antigen presentation function and on interleukin-2 generation. *Arch. of Surg.* 123, 235-240
54. Wood M.L., Gottschalk R., Monaco A.P. (1988): Effect of blood transfusion on IL-2 production. *Transplantation* 45, 930-935
55. Dallman M.J., Shiho O., Page T.H. et al. (1991): Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin-2 pathway. *J.Exp.Med* 173, 79-87
56. Bugeon L., Cuturi M-C., Hallet M-M. et al. (1992): Peripheral tolerance of an allograft in adult rats - characterization by low interleukin-2 and interferon- γ mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation* 54, 219-225
57. Knulst A.C., Bazuin C., Benner R. (1989): Blood transfusion induced suppression of delayed-type hypersensitivity to allogeneic histocompatibility antigens. *Transplantation* 48, 829-833
58. Schot J.D.L., Schuurman R.K.B. (1986): Blood transfusion suppresses cutaneous cell-mediated immunity. *Clin.Exp.Immunol* 65, 336-344
59. Mosmann T.R. Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136, 2348-2357
60. O'Garra A., Murphy K. (1994): Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr.Opinion Immunol.* 6, 458-466
61. Takeuchi T., Lowry R.P., Konieczny B. (1992): Heart allografts in murine systems. *Transplantation* 53, 1281-1294
62. Kupiec-Wegliński J.W., Wasowska B., Papp I. et al (1993):. CD4 mAb therapy modulates alloantibody production and intracardiac graft deposition in association with selective inhibition of Th1 lymphokines. *J.Immunol.* 151, 5053-

5061

63. Cunningham D.A., Dunn M.J., Yacoub M.H., Rose M.L. (1994): Local production of cytokines in the human cardiac allograft. *Transplantation* 57, 1333-1337
64. Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R. (1989): Two types of mouse T helper cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp.Med.* 170, 2081-2095
65. del Prete G., Maggi E., Romagnani S. (1994): Biology of disease. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Lab.Invest.* 70, 299-306
66. Maedwa H., Takata M., Takahashi S., Ogoshi S., Fujimoto S. (1994): Adoptive transfer of a Th 2-like cell line prolongs MHC class-II antigen disparate skin allograft survival in the mouse. *Inter.immunol.* 6, 855-862
67. Dallman M., Toogood G., Vossen A. et al. (1994): Continuous production of interleukin 4 in vivo causes prolongation of graft survival. *Abstracts Book of XVth WCTS in Kyoto*, 48
68. LeGros G., Erard F. (1994): Non-cytotoxic, Il-4, Il-5, Il-10 producing CD8+ cells: their activation and effector functions. *Curr.Opinion in Immunol.* 6, 453-457
69. Erard F., Wild M.T., Garcia-Sanz J.A. et al. (1993): Switch of CD8 cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make Th2 cytokines and help B cells. *Science* 260, 1802-1805
70. Brunson M.E. Alexander J.W. (1990): Mechanisms of transfusion- induced immunosuppression. *Transfusion* 30, 651-658
71. Gafter U., Kalechman Y., Sredni B. (1992): Induction of a subpopulation of suppressor cells by a single blood transfusion. *Kidney Inter.* 41, 143-148
72. Wramner L., Olausson M., Soderstrom T. et al. (1987): Evidence of donor-specific cellular suppressor activity in donor-specific cell-mediated lympholysis unresponsiveness in renal transplant patients. *Transplantation* 44, 390-395
73. Marquet R.L., Haysteek G. (1981): Induction of suppressor cells by donor

- specific transfusion and heart transplantation in rats. *Transplantation* 31, 272-278
74. Maki T., Okasaki O., Wood M.L. et al. (1981): Suppressor cells in mice bearing intact skin allografts after blood transfusion. *Transplantation* 32, 463-470
75. Oluwole S.F., Tezuka K., Wasfie T., et al. (1989): Humoral immunity in allograft rejection. *Transplantation* 48, 751-755
76. Jerne N.K. (1974): Towards a network theory of the immune system. *Ann.Immunol. (Inst. Pasteur)* 1256, 373-389
77. McInerney T.L., Brown L.E., Sutton V.R., Jackson D.C. (1994): Analysis antibody-antigen and antibody-anti-(idiotypic antibody) cross-reactivity using synthetic peptide probes. *Molec.Immunol.* 31, 289-299
78. Cuturi M-C., Josien R., Cantarovich D. et al. (1994): Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur.J.Immunol.* 24, 1627-1631
79. Baldwin W.M.III, Rhoton K., Sanfillippo F. (1991): IgM and IgG alloantibody production by splenocytes and deposition in rat renal allografts are decreased by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 51, 481-485
80. Wasowska B., Baldwin W.M.III, Howell D.N., Sanfilippo F. (1993): The association of enhancement of renal allograft survival by donor-specific blood transfusion with host MHC-linked inhibition of IgG anti-donor class I alloantibody responses. *Transplantation* 56, 672-680
81. Wasowska B., Baldwin W.M.III, Sanfilippo F. (1992): IgG alloantibody responses to donor-specific blood transfusion in different rat strain combinations as a predictor of renal allograft survival. *Transplantation* 53, 175-180
82. Keown P.A., Descamps B. (1979): Improved renal allograft survival after blood transfusion: a non-specific, erythrocyte-mediated immunoregulatory process? *Lancet* i: 20-22
83. Grindel S.I., Wiedekeher J.C., Pollak R. (1990): The transfusion effect is influenced by nature of MHC antigen presentation. *Curr.Surg.* 321-326

84. Ogle C.K., Wood S., Nagy H. et al. (1988): In vitro tests on macrophage prostaglandin E2 and thromboxane B2 production after blood transfusion. *Transpl. Proc.* 20, 1179-1183
85. Ross W.B., Leaver H.A., Yap P.L. et al. (1993): Macrophage prostaglandin E2 and oxidative responses to endotoxin during immunosuppression associated with anaesthesia and transfusion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 49, 945-953
86. Shelby J., Marushack M.M., Nelson E.W. (1987): Prostaglandin production and suppressor cell induction in transfusion-induced immunosuppression. *Transplantation* 43, 113-116
87. Perez R.V., Munda R., Alexander J.W. (1989): Augmentation of donor-specific transfusion and cyclosporine effects with dietary linoleic acid. *Transplantation* 47, 937-940
88. Tchervenkov J. I., Epstein M.D., Alexander J.W., Schroeder T.J. (1989): The effect of donor-specific blood transfusion, cyclosporine, and dietary prostaglandin precursors on rat cardiac allograft survival. *transplantation* 47, 177-181
89. Adams P.T., Davenport R.D., Reardon D.A., Roth M.S. (1992): Detection of circulating donor white blood cells in patients receiving multiple transfusions. *Blood* 80, 551-555
90. Roberts J., To L.B., Gillis D. et al. (1993): Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 12, 469-475
91. McNeilage I.J., Heslop B.F. (1980): Lymphocyte homing in syngeneic and unsensitized MHC compatible allogeneic hosts. *Cell. Immunol.* 50, 58-70
92. Bainbridge R. (1983): Elimination of allogeneic lymphocytes by mice. *Immunol. Rev.* 73, 5-34
93. Tonnesen B., Rolstad B. (1983): In vivo elimination of allogeneic lymphocytes in normal and T-cell-deficient rats. Elimination does not require T cells.

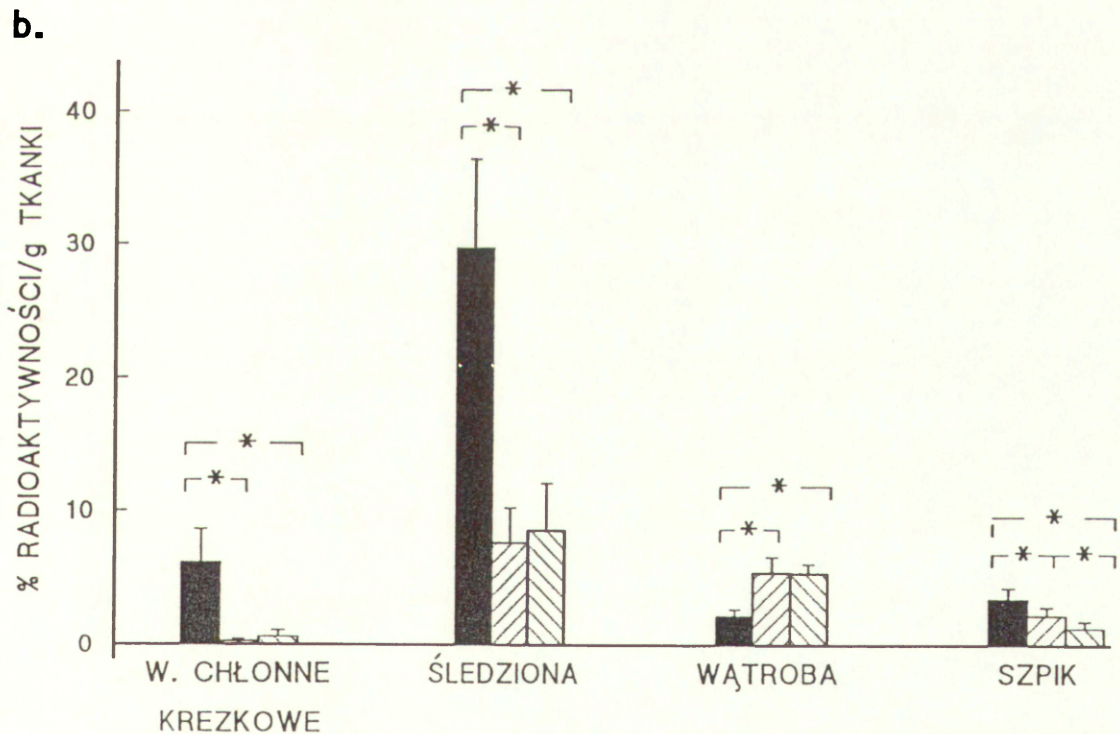
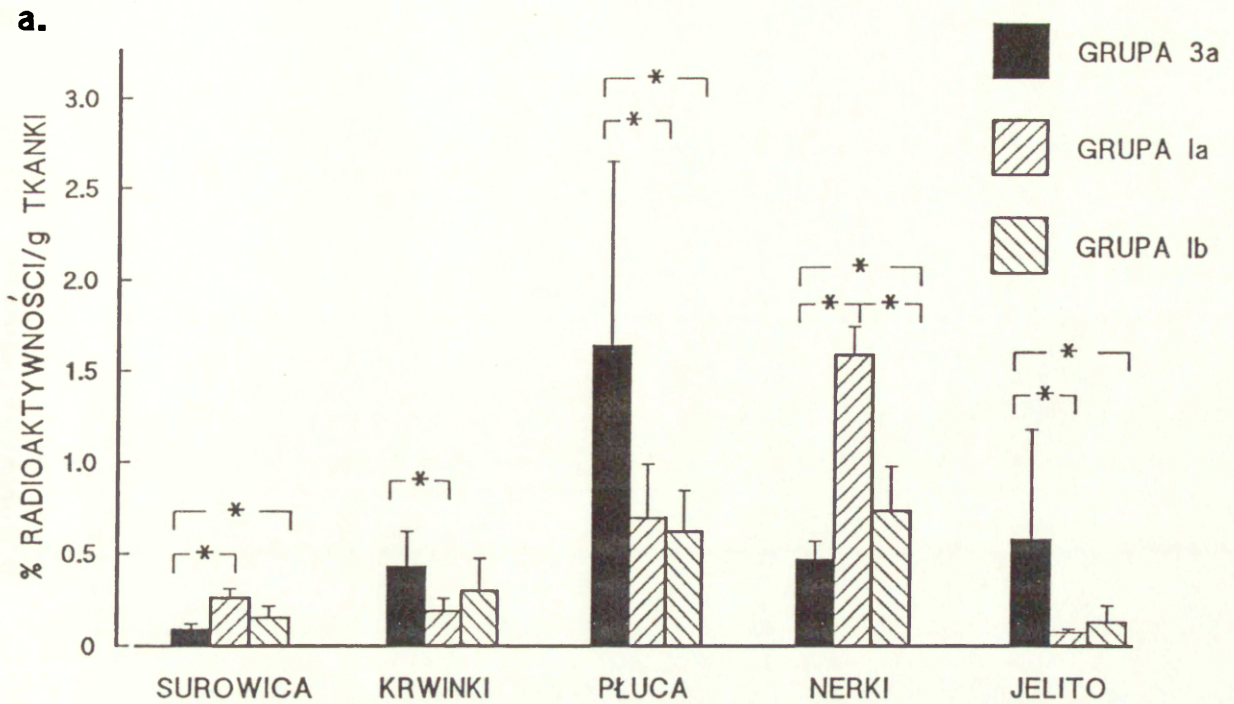
Scand.J.Immunol. 17, 303-312

94. Rolstad B., Ford W.L. (1983): The rapid elimination of allogeneic lymphocytes, relationship to established mechanisms of immunity and to lymphocyte traffic. *Immunol.Rev.* 73, 87-102
95. Binns R.M., Licence T. (1983): Long-term survival of MHC-compatible lymphocytes in the young pig. *Immunol.* 49, 727-730
96. Olszewski W.L. (1987): *In vivo* migration of immune cells. CRC Press, Ing, Boca Ratan, Florida
97. Ford W., Heslop B.F. (1987): Allogeneic lymphocyte cytotoxicity: Evidence that target cells include most, if not all, donor lymphocytes. *Transplantation* 43, 753-757
98. McNeilage I.J., Heslop B.F., Heyworth M.R., Gutman G.A. (1982): Natural cytotoxicity in rats: Strain distribution and genetics. *Cell.Immunol.* 72, 340-350
99. Rolstad B., Fossum S., Bazin H., et al. (1985): The rapid rejection of allogeneic lymphocytes by non-adaptive, cell-mediated mechanism (NK activity). *Immunol.* 54, 127-137
100. Piguet P-F., Vassalli P. (1980): Failure of allogeneic thymocytes to survive in nude mice. *Eur.J.Immunol.* 10, 12-15
101. Sheng-Tanner X., Miller R.G. (1992): Correlation between lymphocyte-induced donor-specific tolerance and donor cell recirculation. *J. Exp. Med.* 176, 407-413
102. Rolstad B., Fossum S. (1987): Allogeneic lymphocyte cytotoxicity (ALC) in rats: establishment of an *in vitro* assay, and direct evidence that cells with natural killer (NK) activity are involved in ALC. *Immunol.* 60, 151-157
103. Heslop B.F., McNeilage L.J. (1989): The F₁ hybrid effect in allogeneic lymphocyte cytotoxicity. Points of similar between hybrid resistance and ALC. *Transplantation* 48, 634-639
104. Trincheri G. (1994): Recognition of major histocompatibility complex class I antigens by natural killer cells. *J.Exp.Med.* 180, 417-421
105. Moretta L., Ciccone E., Poggi A., Mingari M.C., Moretta A. (1994):

- Ontogeny, specific functions and receptors of human natural killer cells. *Immunol.Letters* 40, 83-88.
106. Smits K.M., Kuppen P.J.K., Eggermont A.M.M., Fleuren G.J. (1994): Masking of MHC class I on target cells results in enhanced lysis by rat IL-2-Activated natural killer cells. *Natural Immunity* 13, 188
 107. Lao N., Bix M., Zijlstra R., Jaenish R., Raulet D. (1991): MHC class I deficiency susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253, 199-203
 108. Karlhofer F.M., Ribaldo R.K., Yokoyama W.M. (1992): MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ aIL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358, 66-69
 109. Yokoyama W.M., Seaman W.E. (1993): The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Ann.Rev.Immunol.* 11, 613
 110. Vaage J.T., Naper C., Lavik G. et al. (1994): MHC control of NK cell allorecognition in the rat. *Natural Immunity* 13, 189
 111. Fossum S., Rolstad B. (1986): The roles of interdigitating cells and natural killer cells in the rapid rejection of allogeneic lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 16, 440-450
 112. Breel M., Mebius R., Kraal G. (1988): The interaction of interdigitating cells and lymphocytes in vitro and in vivo. *Immunol.* 63, 331-337
 113. Abbott C.P., Lindsey E.S., Creech O. (1964): A technique for heart transplantation in the rat. *Arch.Surg.* 89, 645-652.
 114. Snell G.D. (1957): The homograft reaction. *Ann.Rev.Microbiol.* 11, 439-458
 115. Steinmuller D. (1967): Immunization with kin isografts taken from tolerant mice. *Science* 158, 127-129
 116. Steinman R.M., Cohn Z.A. (1973): Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitative tissue distribution. *J.Exp.Med.* 139, 380-397
 117. Steinman R.M., Cohn Z.A. (1974): Identification of novel cell type in

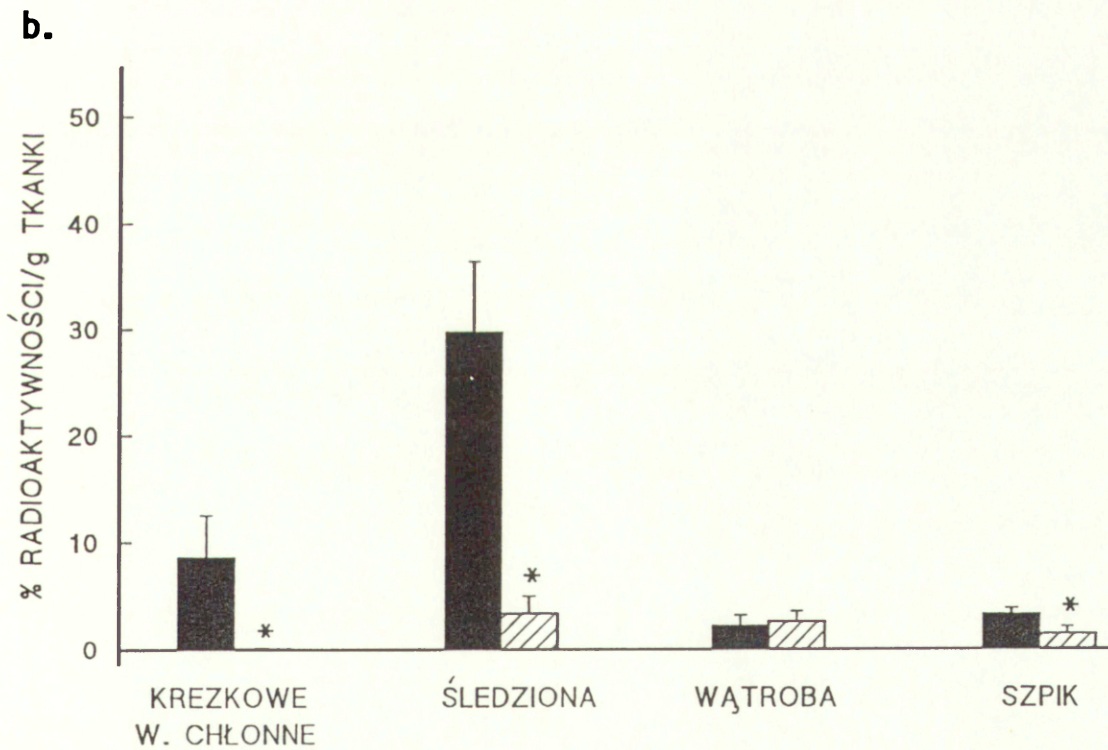
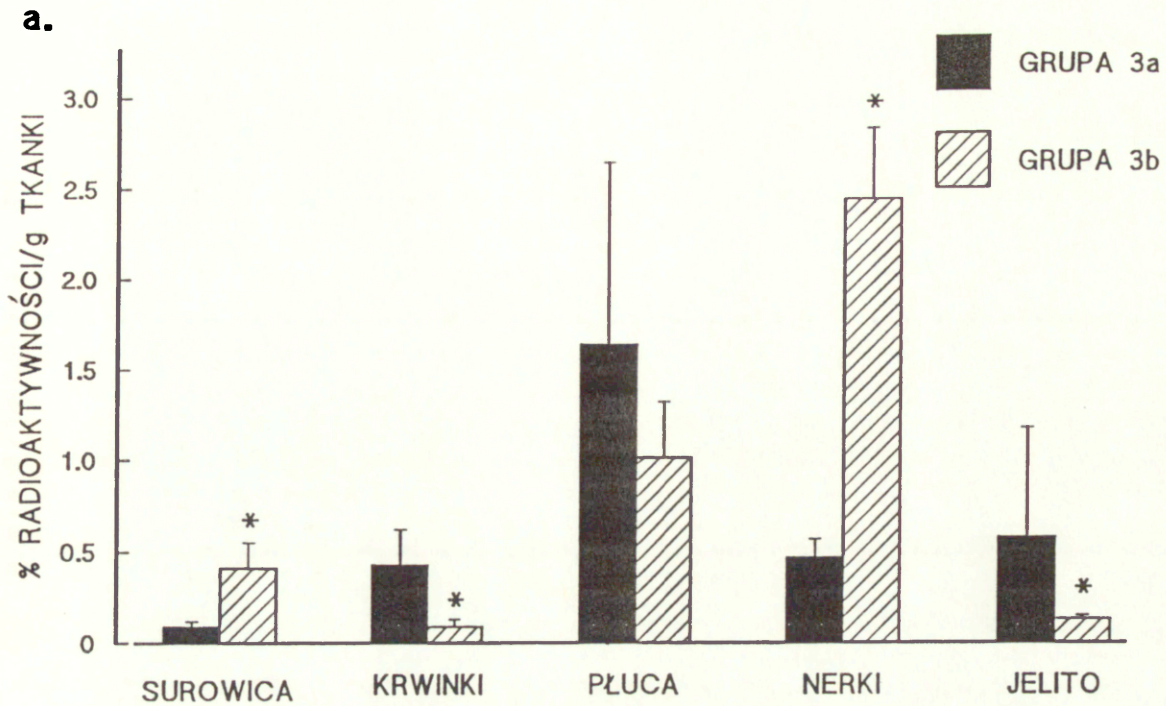
- peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J.Exp.Med.* 139, 1431-1445
118. Joyce S., Mathew J.M., Flye M.W., Mohanakumar T. (1992): A polymorphic human kidney-specific non-MHC alloantigen. *Transplantation* 53, 1119-1127
119. Steinmuller D. (1984): Tissue specific and tissue restricted histocompatibility antigens. *Immunol.Today* 5, 234-236
120. Furuya T., Murase N., Nakamura K. et al. (1992): Preformed lymphocytotoxic antibodies: The effects of class titer and specificity on liver vs heart allografts. *Hepatology* 16, 1415-1422
121. Aitouche A., Touraine J-L. (1993): Accelerated rejection of H-2-incompatible skin allografts in the absence specific cytotoxic antibodies. *Transplantation* 56, 503-508
122. Wood K.J., Hopley A., Dallman M.J., Morris P.J. (1988): Lack of correlation between the induction of donor class I and class II major histocompatibility complex antigens and graft rejection. *Transplantation* 45, 759-767
123. Perreult C., Decary F., Brouch S., Gyger M., Bekenge R., Roy D. (1990): Minor histocompatibility antigens. *Blood* 76, 1269-1280
124. de Bueger M., Goulmy E. (1993): Human minor histocompatibility antigens. *Transpl.Immunol.* 1, 28-38
125. Singal D.P., Ludwin D., Joseph S. et al. (1986): Induction of antiidiotypic antibodies by blood transfusions. *Transplantation* 42, 632-635
126. Padanyi A., Gyodi E., Sarmay G. et al. (1990): Functional and immunogenetic characterization of FcR-blocking antibody. *Immunol.Lett.* 26, 131-138
127. Petranlyi G.Gy. (1992): Cellular and humoral suppression in transplantation. *Immunol.Today* 13, A25-A26
128. Marshall H.E., Bolton E.M., Gracie J.E. et al. (1990): FcR blocking activity in serum of actively enhanced rat renal allograft recipients due to IgG anti-class II MHC alloantibody. *Immunology* 69, 379-384
129. Larsen C.P., Austyn J.M., Morris P.J. (1990): The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. *Ann.Surg.*

- 212, 308-317
130. Larsen C.P., Morris P.J., Austyn J.M. (1990): Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. *J.Exp.Med.* 171, 307-314
 131. Austyn J.M., Larsen C.P. (1990): Migration patterns of dendritic leukocytes. *Transplantation* 49, 1-7
 132. Sayegh M.H., Watschinger B., Carpenter C.B. (1994): Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. *Transplantation* 57, 1295-1302
 133. Lechler R.I., Batchelor J.R. (1982): Restoration of immunogenicity to passenger cell-dependent kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J.Exp.Med.* 155, 31-36
 134. Dalchau R., Fangmann J., Fabre J.W. (1992): Allorecognition of isolated denaturated chains of class I and class II major histocompatibility complex molecules. Evidence for an important role for indirect allorecognition in transplantation. *Eur. J.Immunol.* 22, 669-673
 135. Braun Y.M., McCormack A., Webb G., Batchelor R.J. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation* 55, 177-181
 136. Starzl T.E., Demetris A.J., Trucco M., Murase N., Ricordini C., Ildstad S., Ramos H., Todo S., Tzakis A., Fung J.J., Nalesnik M., Zeevi A., Rudert W.A., Kocova M. (1993): Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: The basis of graft acceptance. *Hepatology* 17, 1127-1152
 137. Demetris A.J., Murase N., Starzl T.E. (1992): Donor dendritic cells in grafts and host lymphoid and non-lymphoid tissues after liver and heart allotransplantation under short term immunosuppression. *Lancet* 339, 1610



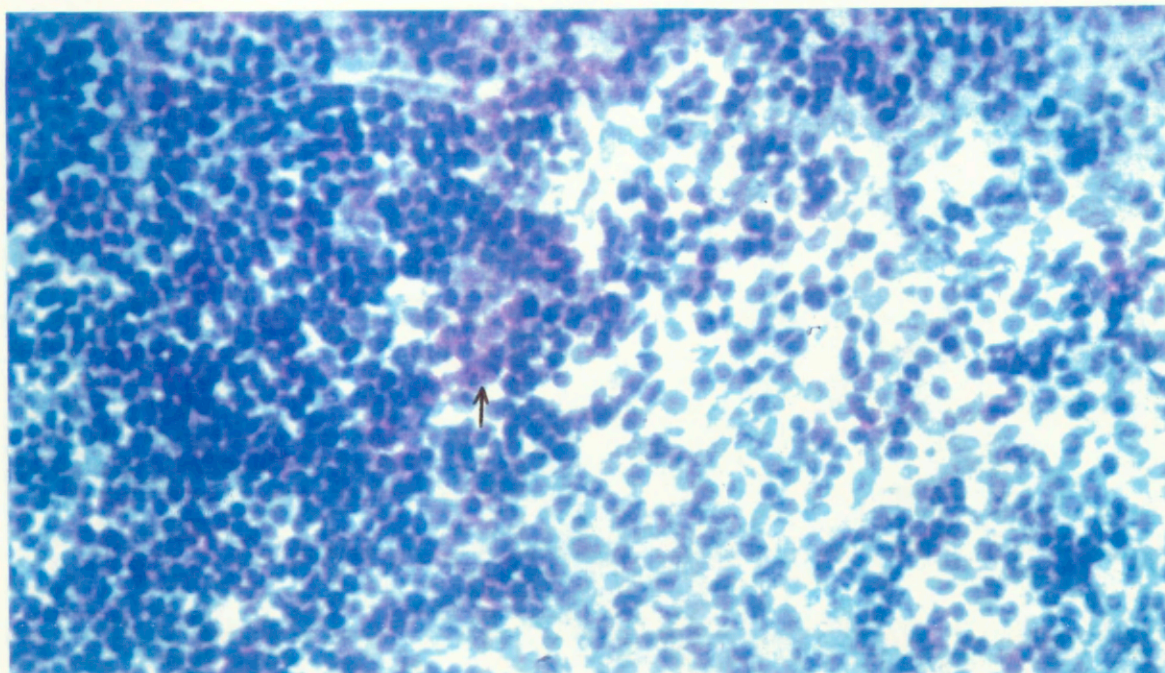
Ryc.1a.i b. Rozmieszczenie radioaktywności, 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów szczura BN, w tkankach szczurów LEW, które otrzymały DST siedem (grupa 1a) lub trzydzieści (grupa 1b) dni przed podaniem limfocytów oraz szczurów LEW, którym nie podawano krwi (grupa 3a).

* - znamienne statystycznie różnica między grupami, $p < 0.05$.

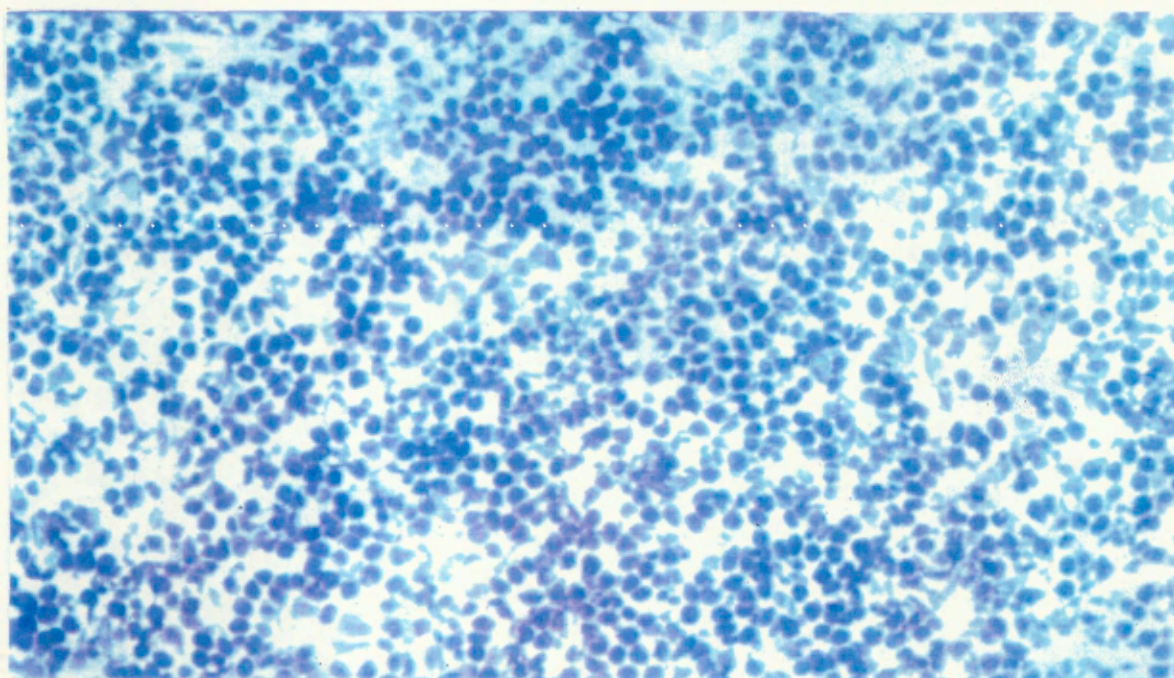


Ryc.2a.i b. Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach szczurów LEW 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów BN żywych (grupa 3a) i martwych (grupa 3b).

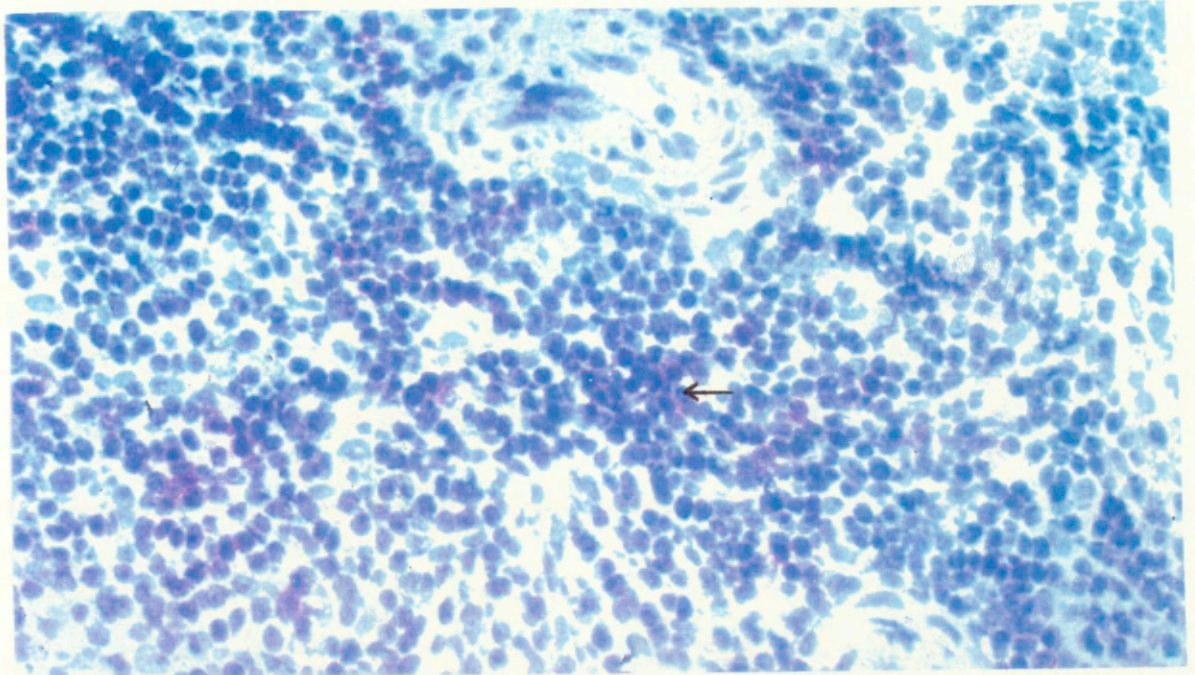
* - znamienne statystycznie różnica między grupami, $p < 0.05$.



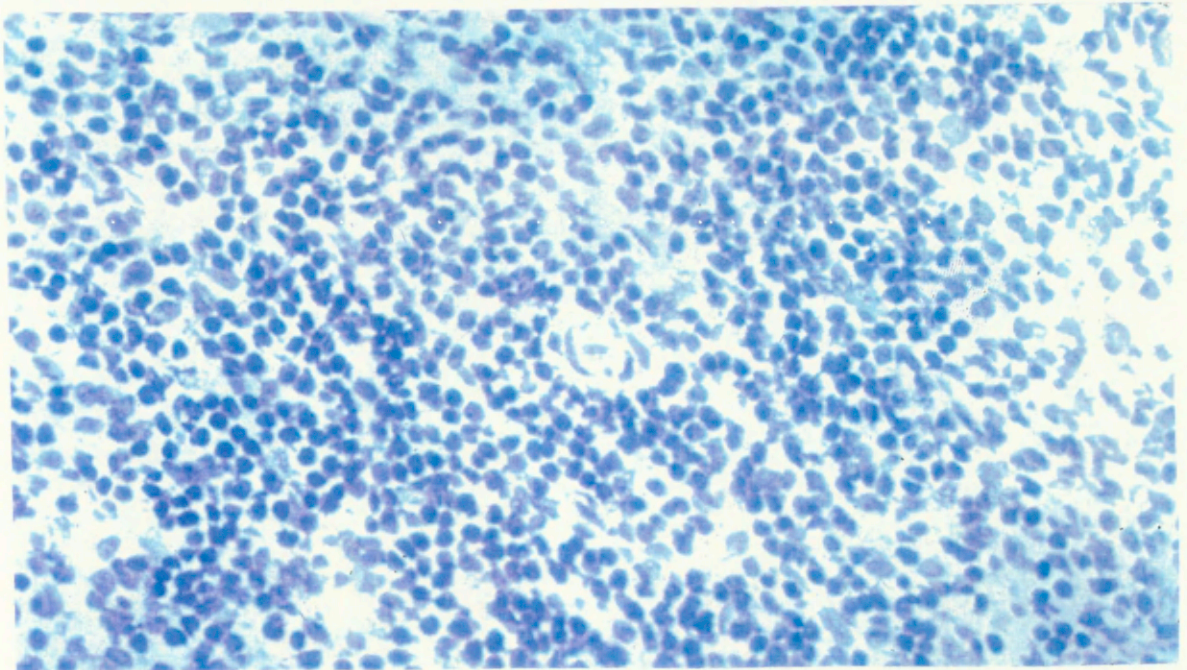
Ryc.3a. Mrożony skrawek krezkowego węzła chłonnego szczura LEW 6h po podaniu i.v. limfocytów szczura BN znakowanych FITC. Limfocyty ujawniano przy pomocy monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko FITC (technika alkalicznej fosfatazy, preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.100x). Na zdjęciu są widoczne wybarwione na różowo limfocyty znakowane FITC.



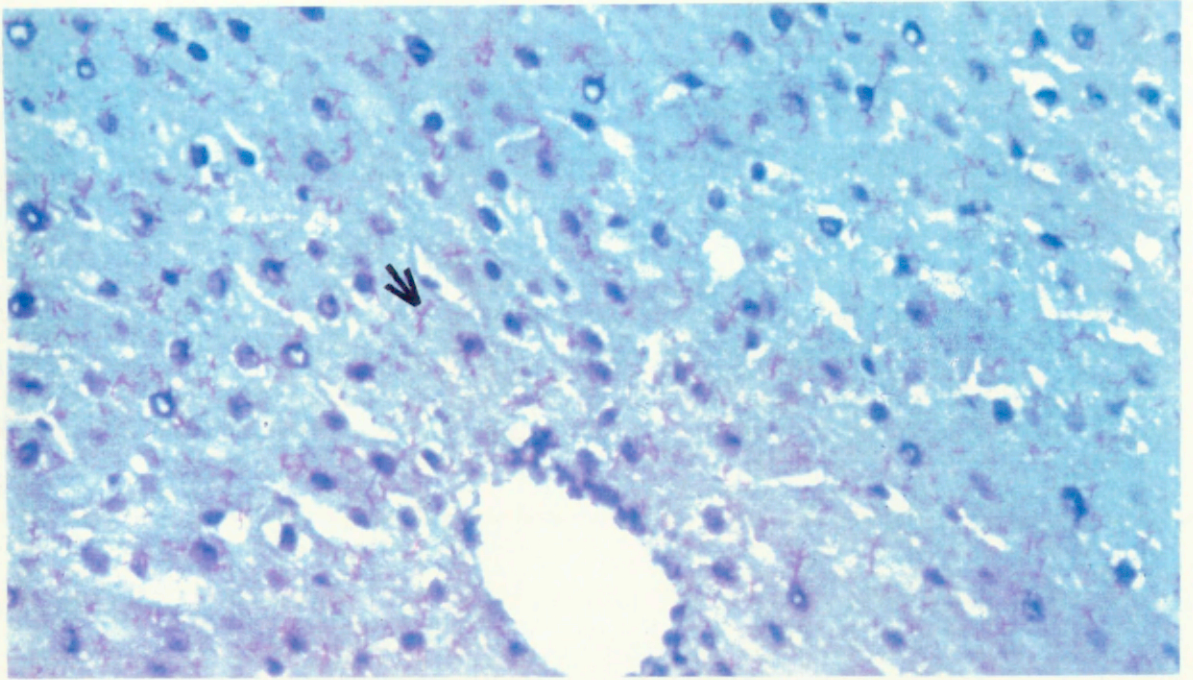
Ryc.3b. Mrożony skrawek krezkowego węzła chłonnego szczura LEW po DST, w 6h po dożylnym podaniu limfocytów szczura BN znakowanych FITC. Limfocyty ujawniano przy pomocy monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko FITC (technika alkalicznej fosfatazy, preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.100x).



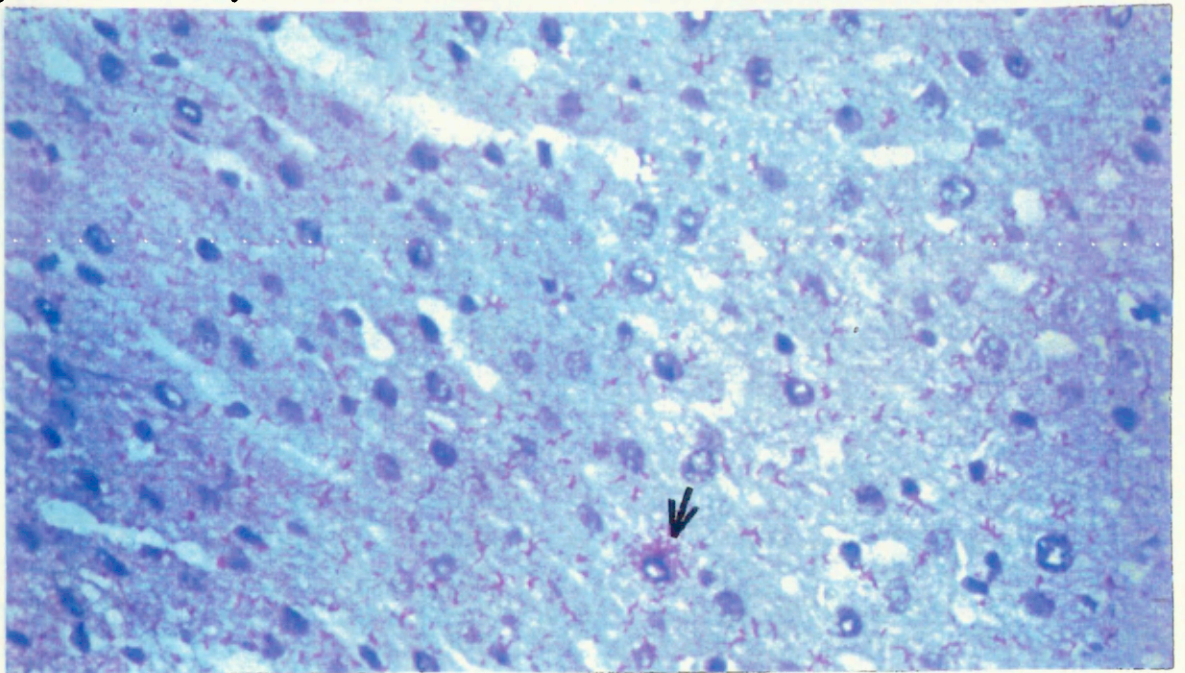
Ryc.4a. Mrożony skrawek śledziony szczura LEW 6h po podaniu i.v. limfocytów szczura BN znakowanych FITC. Limfocyty ujawniano przy pomocy monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko FITC (technika alkalicznej fosfatazy, preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.100x). Na zdjęciu są widoczne wybarwione na różowo limfocyty znakowane FITC.



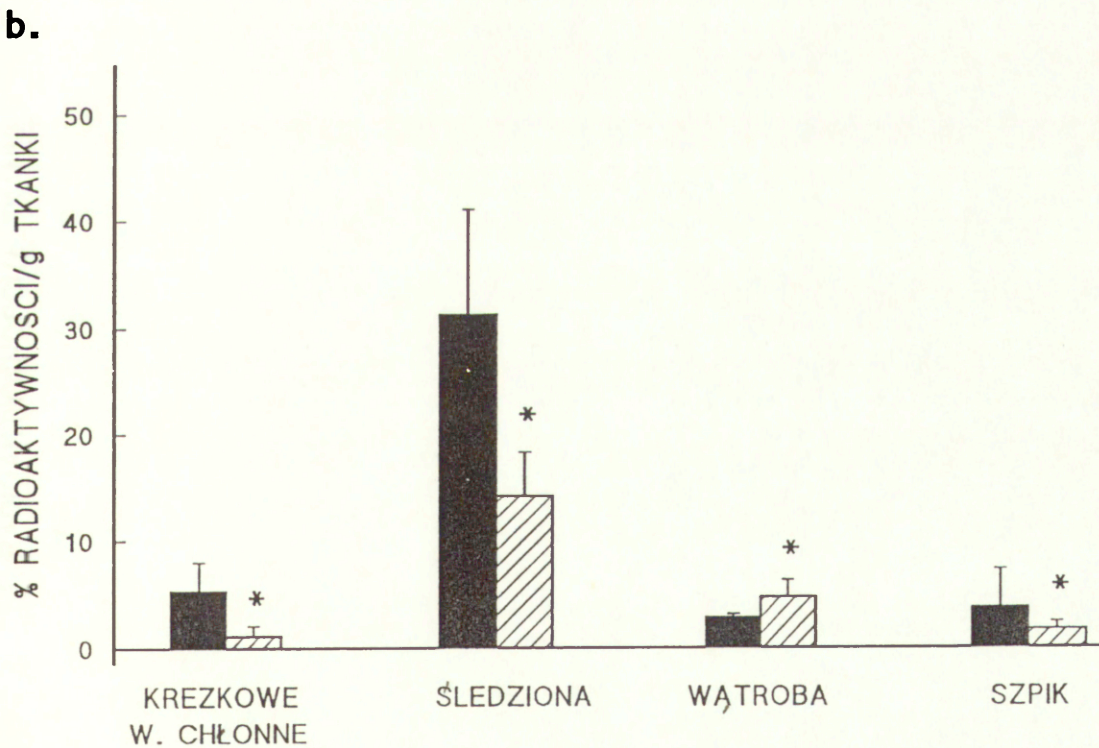
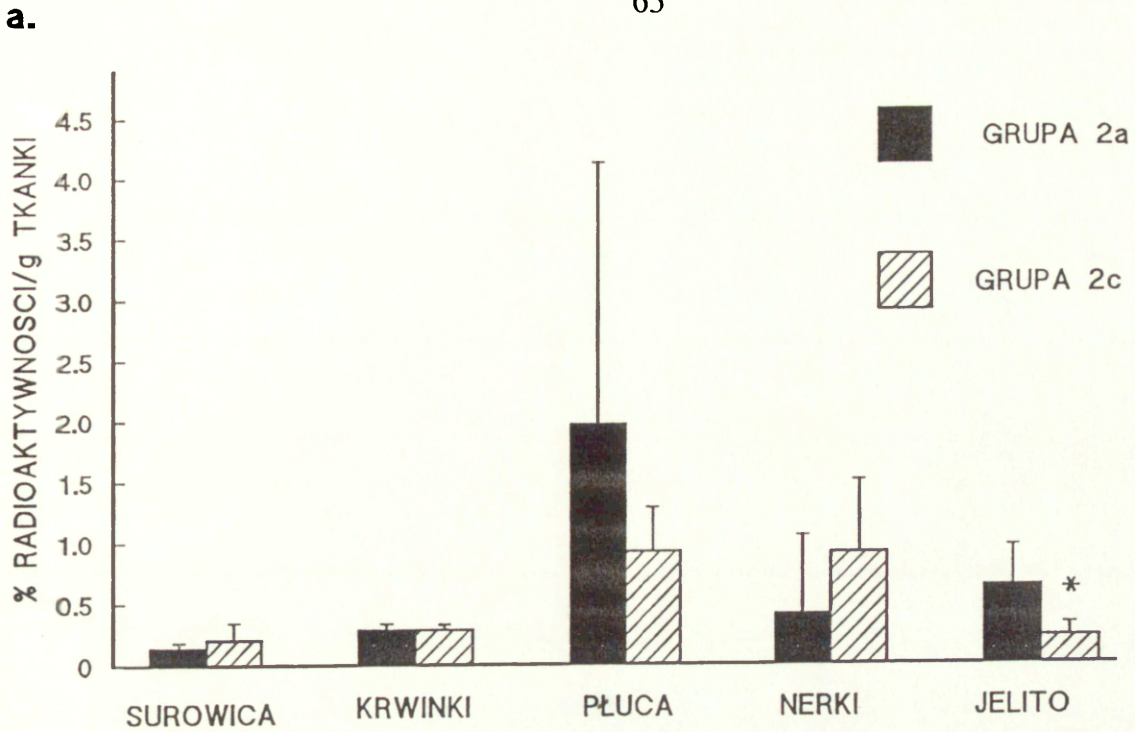
Ryc.4b. Mrożony skrawek śledziony szczura LEW po DST, w 6h po dożylnym podaniu limfocytów szczura BN znakowanych FITC. Limfocyty ujawniano przy pomocy monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko FITC (technika alkalicznej fosfatazy, preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.100x).



Ryc.5a. Mrożony skrawek wątroby szczura LEW 6h po podaniu i.v. limfocytów szczura BN znakowanych FITC. Limfocyty ujawniano przy pomocy monoklonalnego przeciwciałem skierowanego przeciwko FITC (technika alkalicznej fosfatazy, preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.100x). Na zdjęciu jest widoczne wybarwione na różowo debris komórkowe.

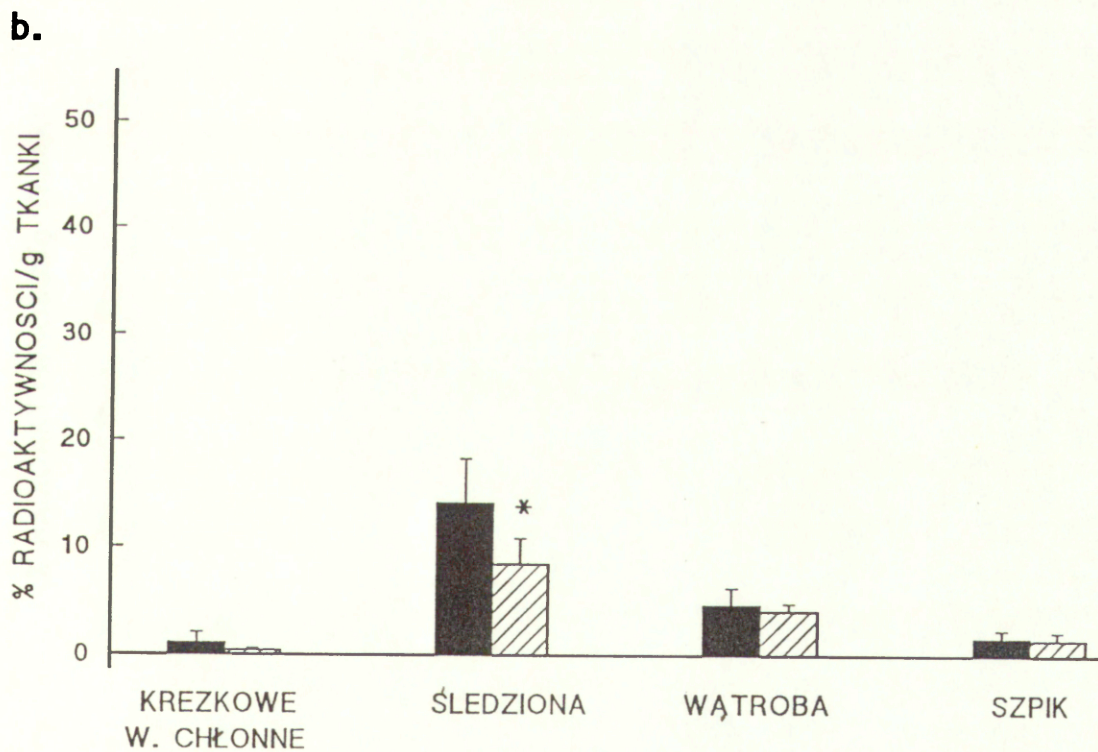
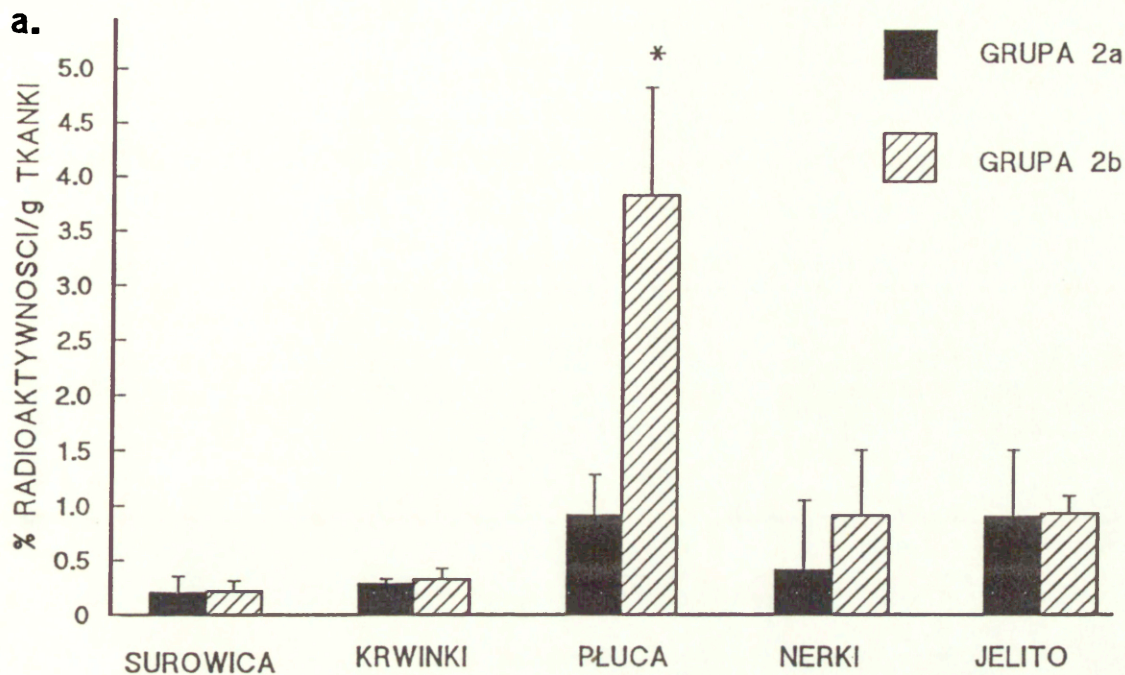


Ryc.5b. Mrożony skrawek wątroby szczura LEW po DST, w 6h po dożylnym podaniu limfocytów szczura BN znakowanych FITC. Limfocyty ujawniano przy pomocy monoklonalnego przeciwciałem skierowanym przeciwko FITC technika alkalicznej fosfatazy (preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.100x). Na zdjęciu widoczne wybarwione na różowo debris komórkowe.



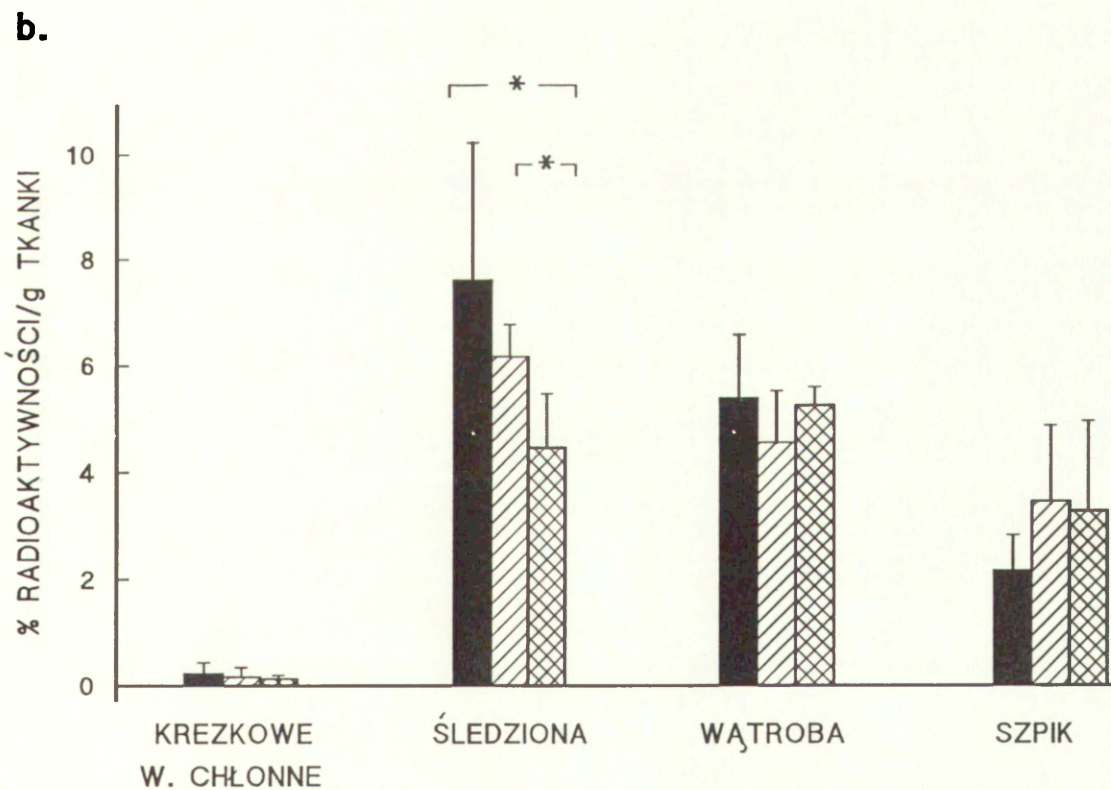
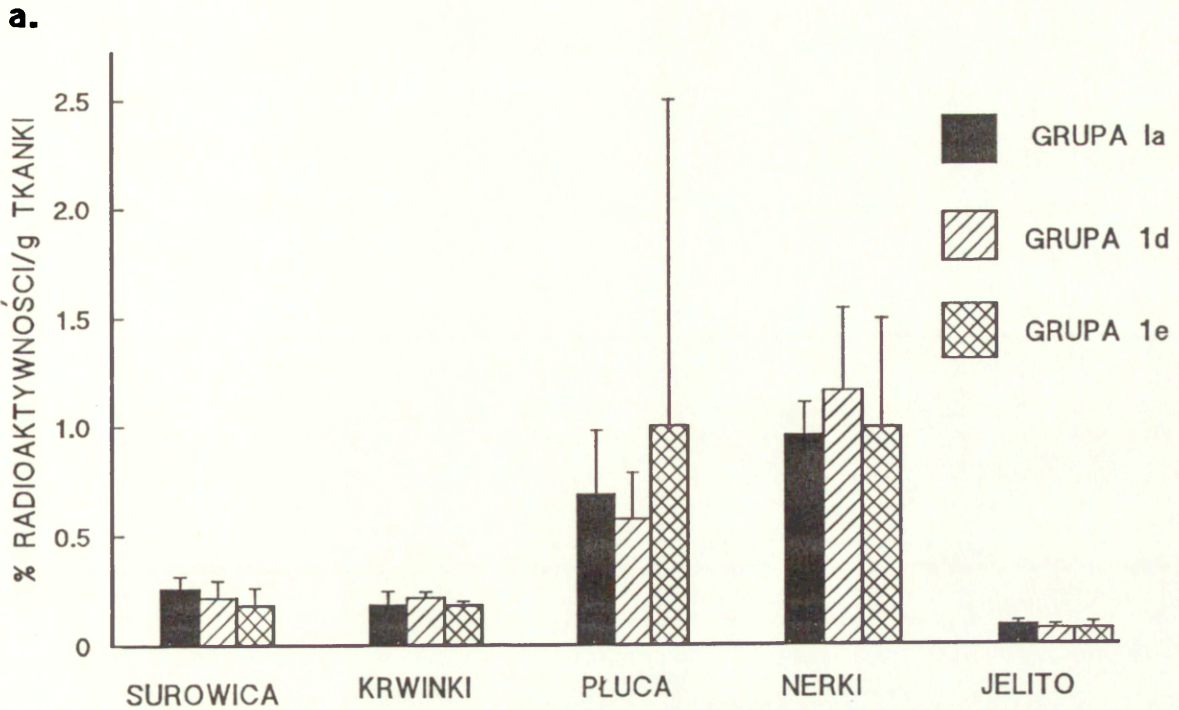
Ryc.6a.i b. Rozmieszczenie radioaktywności, 6 godzin po dożylnym podaniu znakowanych ^{51}Cr allogenicznych limfocytów, w tkankach szczurów LEW, które otrzymały 1ml surowicy LEW po DST (grupa 2a) lub 1ml normalnej surowicy LEW (grupa 2c).

* - znamiennej statystycznie różnica między grupami, $p < 0.05$.



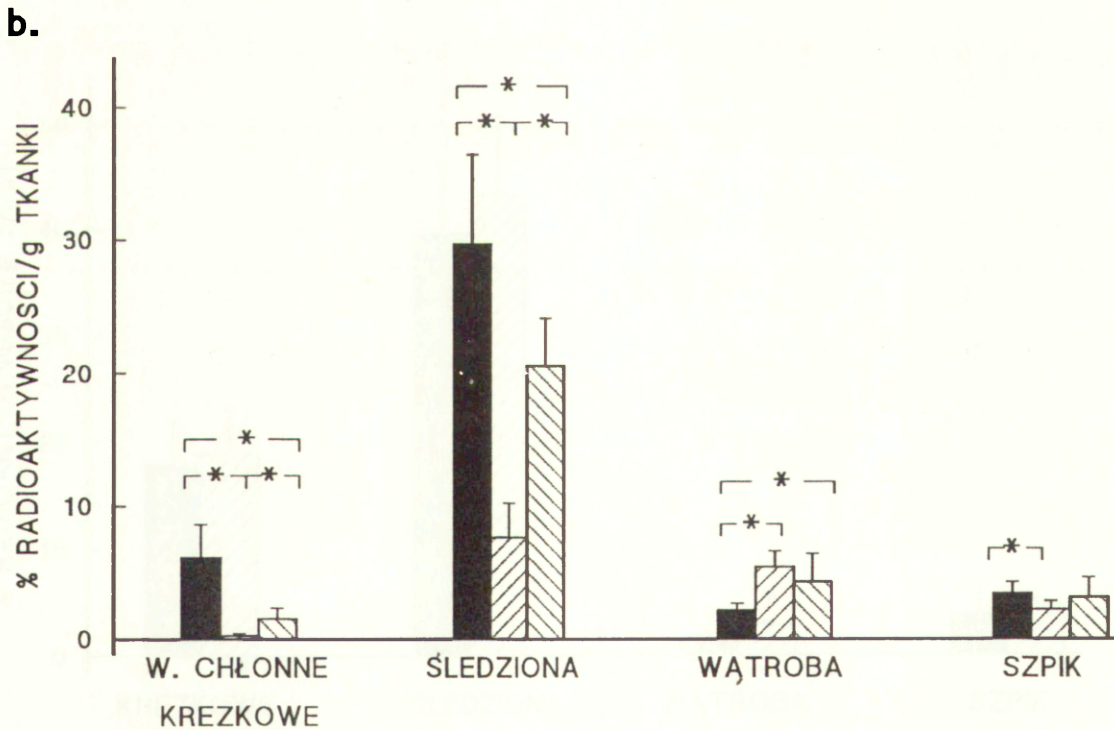
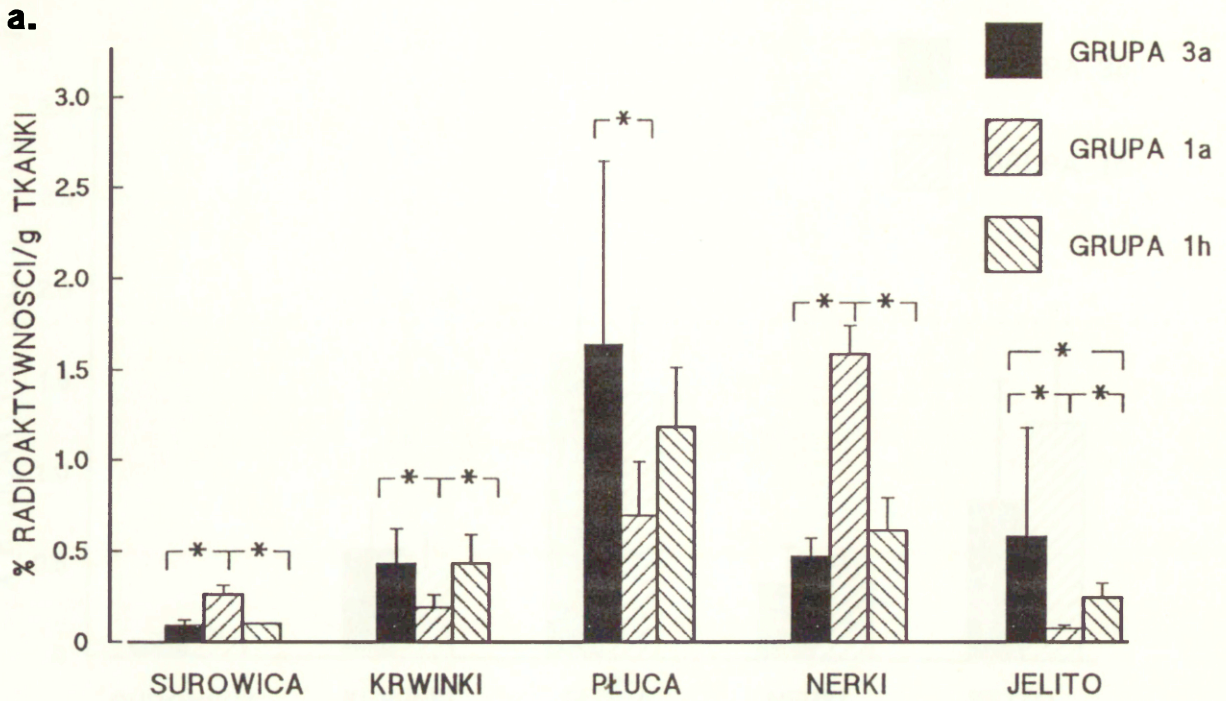
Ryc.7a.i b. Rozmieszczenie radioaktywności, 6 godzin po dożylnym podaniu znakowanych ^{51}Cr limfocytów szczura BN, w tkankach szczurów LEW, które otrzymały 1ml surowicy od LEW po DST (grupa 2a) lub 1ml surowicy LEW po DST absorbowanej na erytrocytach BN (grupa 2b).

* - znamienne statystycznie różnica między grupami, $p < 0.05$.



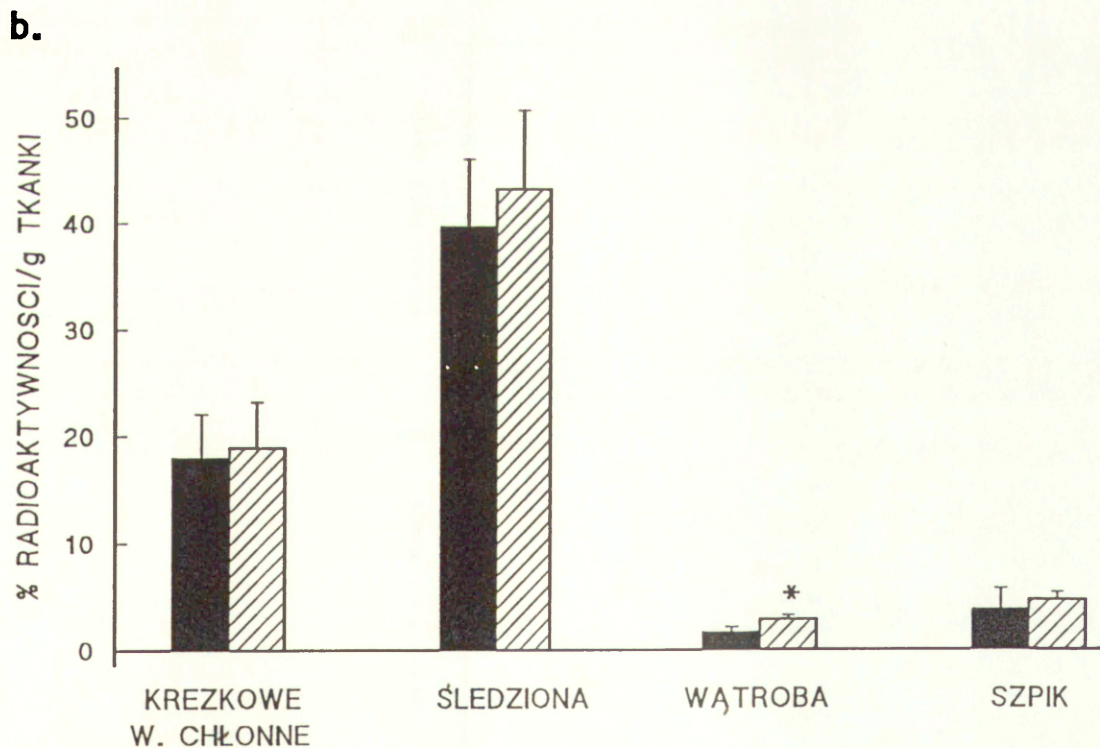
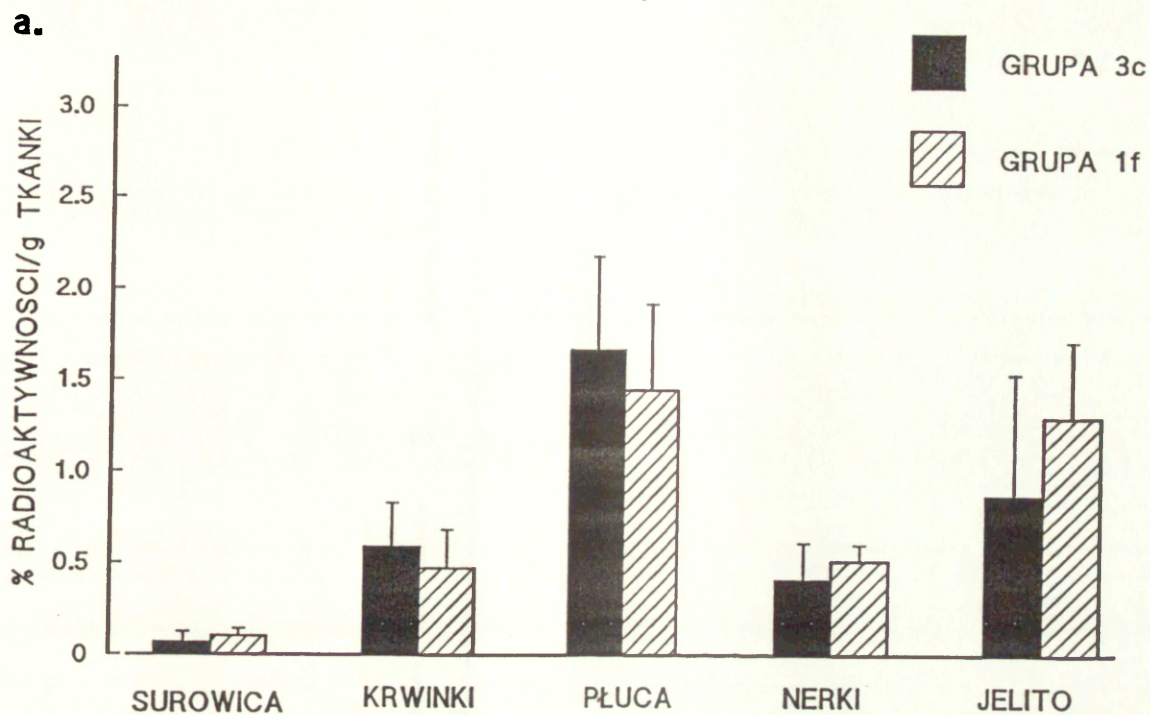
Ryc.8a.i b. Rozmieszczenie radioaktywności w tkankach szczurów LEW, które siedem dni wcześniej otrzymały DST, 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów szczura BN (grupa 1a), limfocytów BN związanych z przeciwciałem OX18 (grupa 1d) lub OX6 (grupa 1e).

* - znamiennej statystycznie różnica między grupami $p < 0.05$.



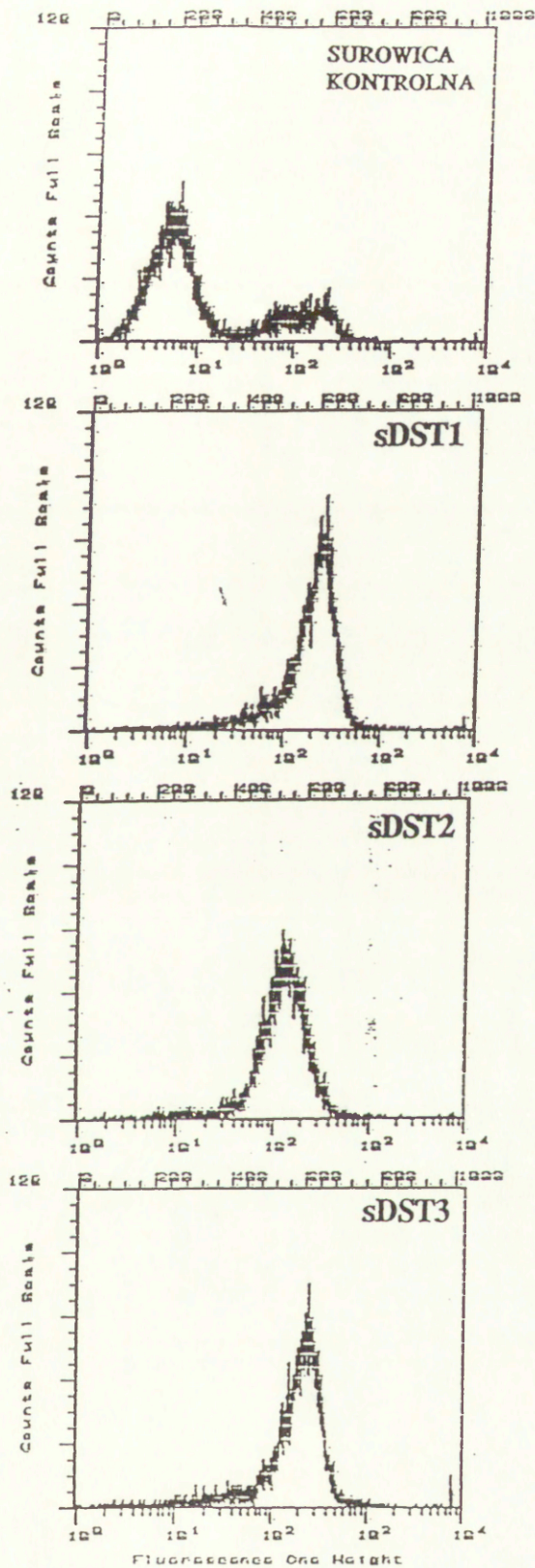
Ryc.9a.i b. Rozmieszczenie radioaktywności, 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów szczura BN w tkankach szczurów LEW, które otrzymały transfuzję krwi szczura DA (grupa 1h), transfuzję krwi BN (grupa 1a) oraz szczurów LEW nie poddawanych transfuzji (grupa 3a).

* - znamienne statystycznie różnica między grupami $p < 0.05$.

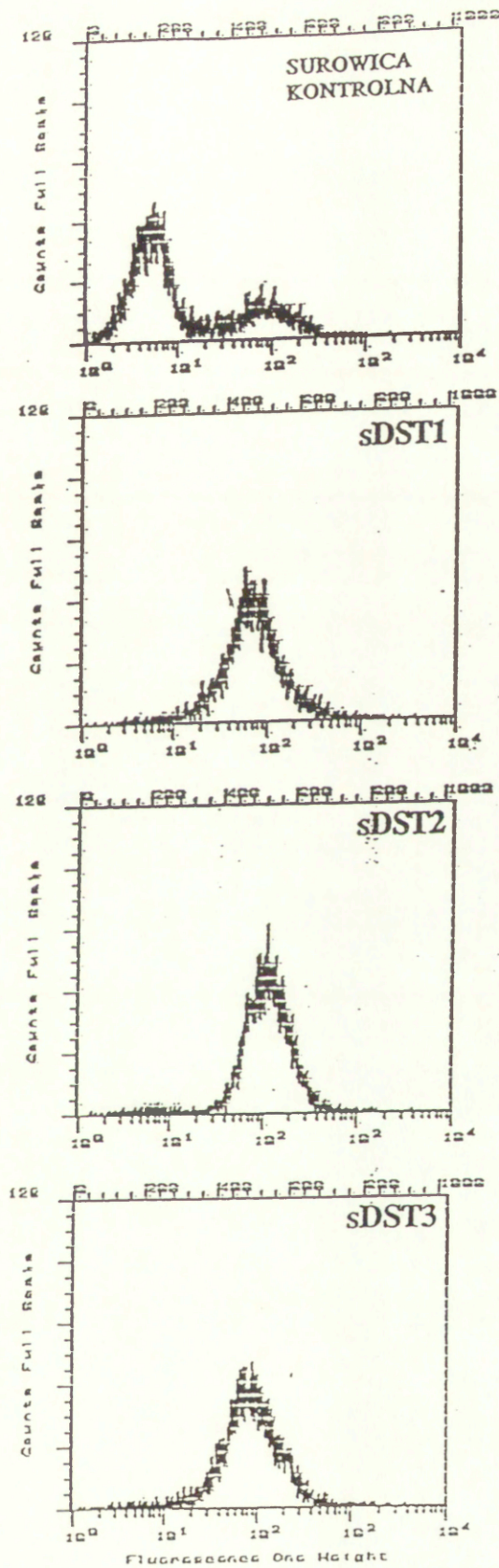


Ryc.10a.i b. Rozmieszczenie radioaktywności, 6 godzin po dożylnym przeszczepie znakowanych ^{51}Cr limfocytów LEW, w tkankach szczurów LEW, które 7 dni wcześniej otrzymały transfuzję allogenicznej krwi (BN) (grupa 1f) lub szczurów LEW, którym nie podawano krwi (grupa 3c).

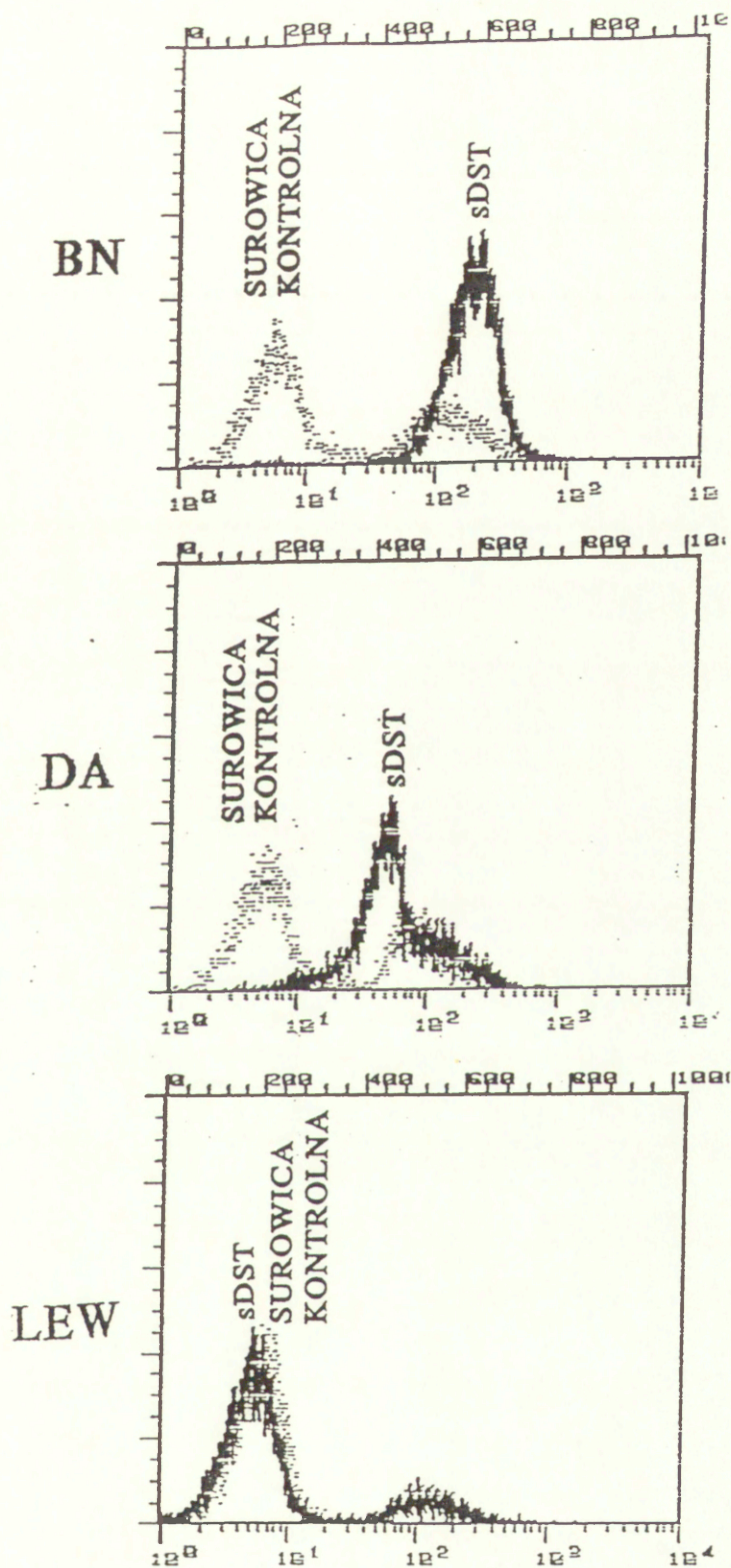
* - znamienne statystycznie różnica między grupami $p < 0.05$.



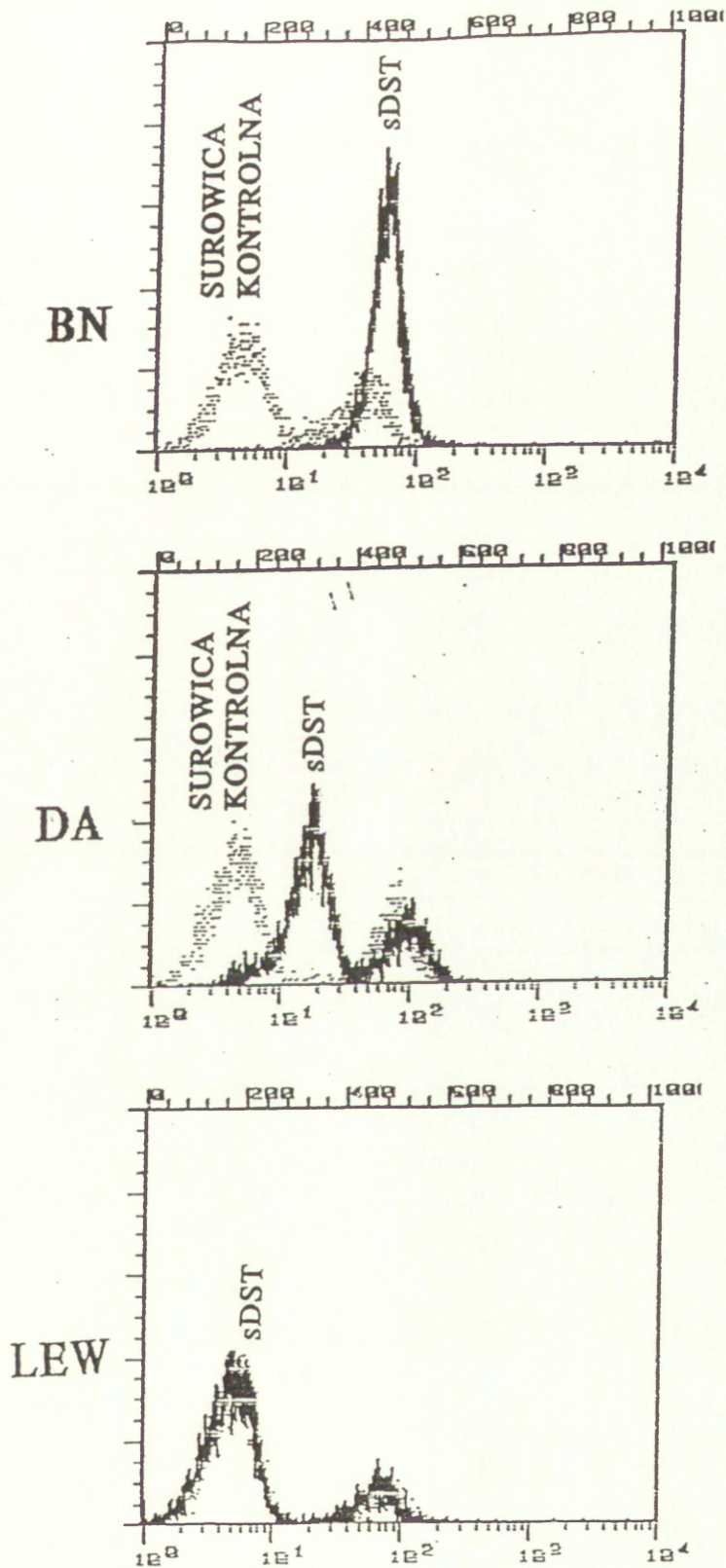
Ryc.11. Analiza cytofluorymeryczna limfocytów BN, inkubowanych z trzema różnymi surowicami LEW po DST (sDST1, sDST2, sDST3) lub normalną surowicą LEW, a następnie z przeciwciałami związanymi z FITC skierowanymi przeciwko szczurzym IgG. Wszystkie przebadane surowice zawierają IgG opłaszczające powierzchnię limfocytów BN.



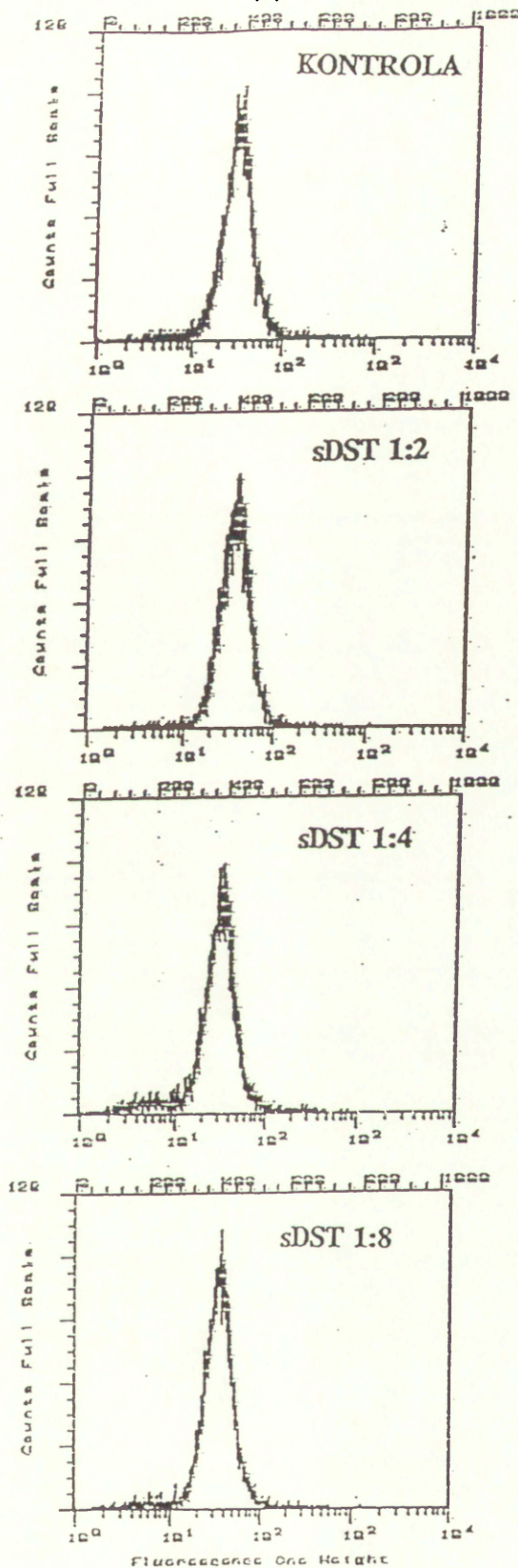
Ryc.12. Analiza cytofluorymeryczna limfocytów BN, inkubowanych z trzema różnymi surowicami LEW po DST (sDST1, sDST2, sDST3) lub normalną surowicą LEW, a następnie z przeciwciałami związanymi z FITC skierowanymi przeciwko szczurzym IgM. Wszystkie przebadane surowice zawierają IgM opłaszczające powierzchnię limfocytów BN.



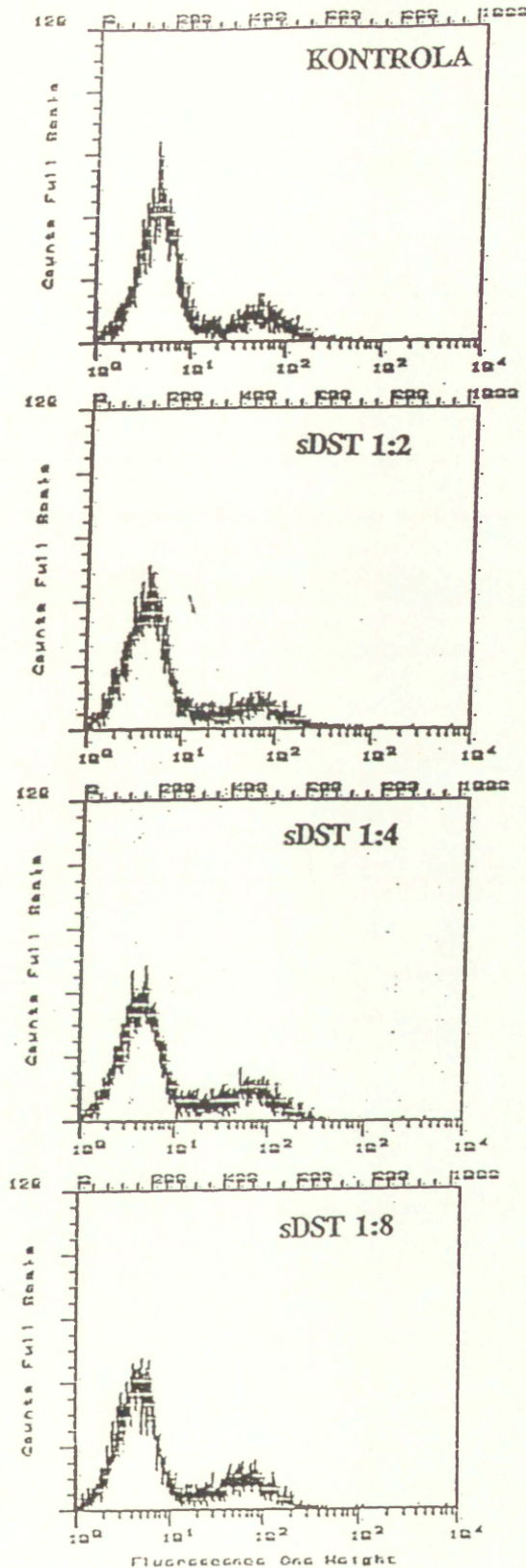
Ryc. 13. Analiza cytofluorymeryczna limfocytów BN, DA, LEW inkubowanych z surowicą LEW po DST lub normalną surowicą LEW, a następnie z przeciwciałami związanymi z FITC skierowanymi przeciwko szczurzym IgG. Badana surowica zawiera przeciwciała klasy IgG wiążące się z powierzchnią limfocytów BN, w mniejszym stopniu z powierzchnią limfocytów DA, a niewiążące się z limfocytami LEW.



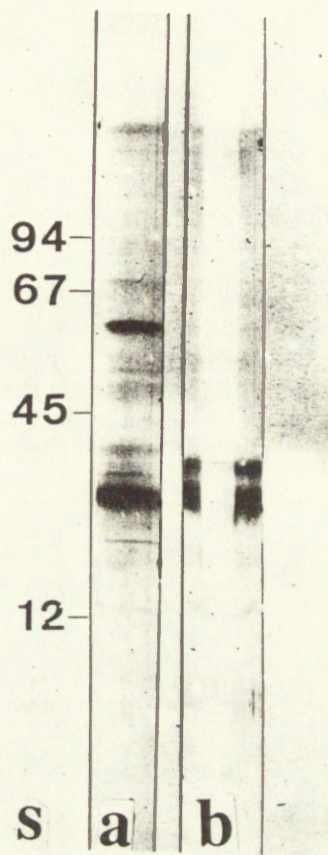
Ryc. 14. Analiza cytofluorymeryczna limfocytów BN, DA, LEW inkubowanych z surowicą LEW po DST lub normalną surowicą LEW, a następnie z przeciwciałami związanymi z FITC skierowanymi przeciwko szczurzym IgM. Badana surowica zawiera przeciwciała klasy IgM wiążące się z powierzchnią limfocytów BN, w mniejszym stopniu z powierzchnią limfocytów DA, a niewiążące się z limfocytami LEW.



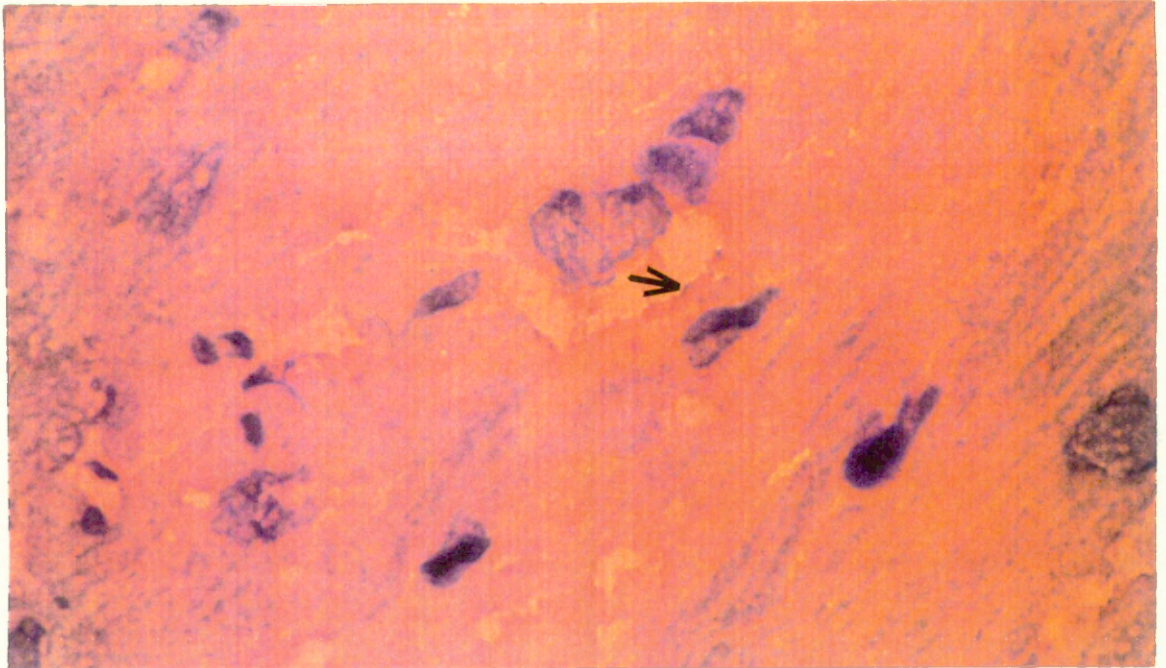
Ryc. 15. Analiza cytofluorymetryczna limfocytów BN inkubowanych z różnymi rozcieńczeniami (1:2; 1:4; 1:8) surowicy LEW po DST, a następnie z przeciwciałami monoklonalnymi OX18 związanymi z FITC. Kontrolę stanowiły limfocyty inkubowane z normalną surowicą LEW. Żadne z rozcieńczeń badanej surowicy nie wpływało na wiązanie się przeciwciała OX18 z MHC klasy I na powierzchni limfocytów BN.



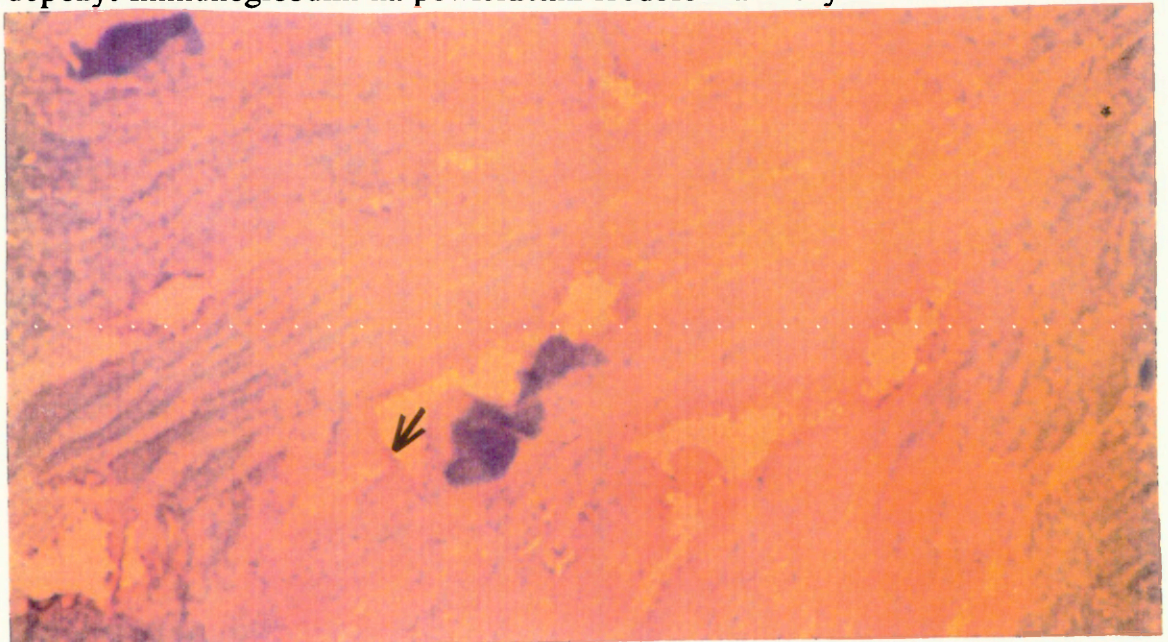
Ryc. 16. Analiza cytofluorometryczna limfocytów BN inkubowanych z różnymi rozcieńczeniami (1:2; 1:4; 1:8) surowicy LEW po DST, a następnie z przeciwciałami monoklonalnymi OX6 związanymi z FITC. Kontrolę stanowiły limfocyty inkubowane z normalną surowicą LEW. Żadne z rozcieńczeń badanej surowicy nie wpływało na wiązanie się przeciwciała OX6 z MHC klasy II na powierzchni limfocytów BN.



Ryc.17. Immunoblotting ekstraktu limfocytów BN z surowicą LEW po DST. Ekstrakt rozdzielono elektroforetycznie w warunkach redukujących, na 15% SDA-PAGE, a następnie przenoszono na błonę nitrocelulozową. Błone inkubowano z surowicą LEW po DST lub normalną surowicą LEW, a następnie z biotynylowanym przeciwciałem skierowanym przeciwko szczurzym immunoglobulinom. s - masa cząsteczkowa wg wzorca, a - surowica badana, b - surowica kontrolna.



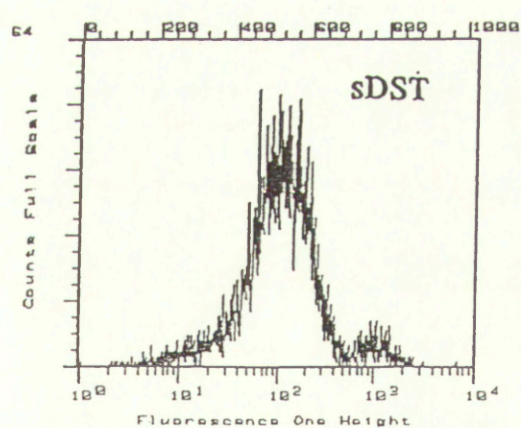
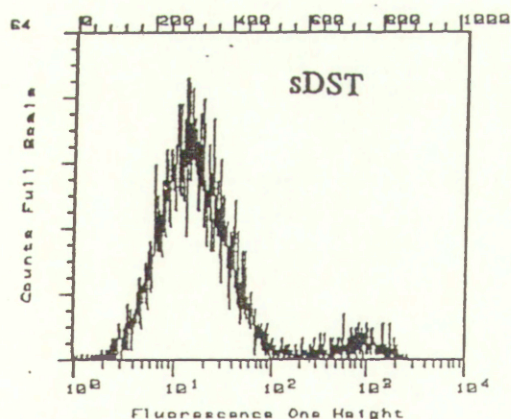
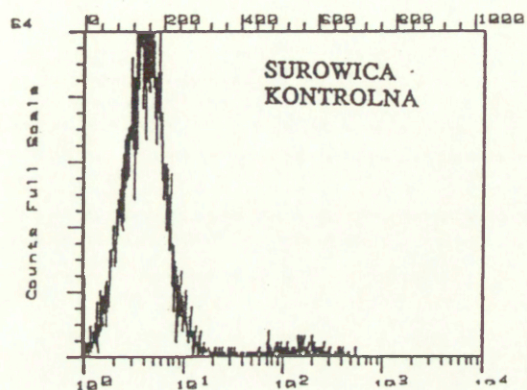
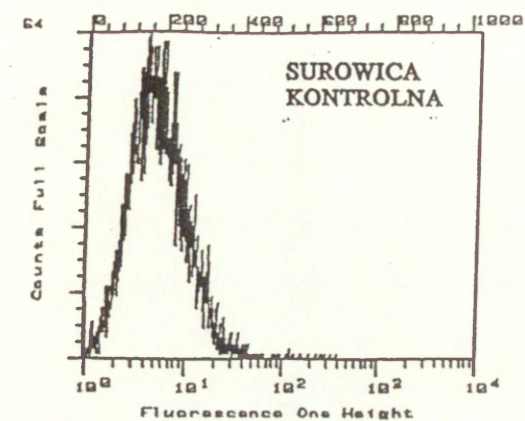
Ryc.18a. Mrożony skrawek serca szczura BN inkubowany z surowicą szczura LEW, a następnie z przeciwciałem skierowanym przeciwko szczurzym immunoglobulinom (technika alkalicznej fosfatazy, preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.250x). Na zdjęciu jest widoczny niewielki depozyt immunoglobulin na powierzchni śródbłonka naczynia.



Ryc.18b. Mrożony skrawek serca szczura BN inkubowany z surowicą szczura LEW po DST, a następnie z przeciwciałem skierowanym przeciwko szczurzym immunoglobulinom (technika alkalicznej fosfatazy, preparat podbarwiony hematoksyliną, mikroskop świetlny, pow.250x). Na zdjęciu jest widoczny niewielki depozyt immunoglobulin na powierzchni śródbłonka naczynia.

LEW

BN



Ryc. 19. Analiza cytofluorymeryczna izolowanych komórek śródbłonna naczyń krwionośnych serca BN i LEW inkubowanych z surowicą LEW po DST lub normalną surowicą LEW, a następnie z przeciwciałami związanymi z FITC skierowanymi przeciwko szczurzym immunoglobulinom. Badana surowica zawiera przeciwciała wiążące się z powierzchnią komórek śródbłonna BN, w znacznie mniejszym stopniu z powierzchnią komórek śródbłonna LEW.