

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Paweł Majcher

**Wpływ zabiegu operacyjnego u myszy
na rozmieszczenie limfocytów $T\gamma\delta$ i $T\alpha\beta$.**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Marian Szczepanik

Pracę wykonano w Zakładzie Biologii Rozwoju Człowieka CMUJ

Kierownik Zakładu: dr hab. n. biol. Leopold Śliwa

Kraków 2005

Podziękowanie

Składam serdeczne podziękowanie mojemu Promotorowi, Panu Docentowi Marianowi Szczepanikowi za niezwykle wartościowe wskazówki i rady w czasie wykonywania tej pracy.

Szczególnie pragnę podziękować Panu Profesorowi Włodzimierzowi Ptakowi za pomoc i cenne uwagi.

Dziękuję także Panu Profesorowi Krzysztofowi Selmajowi za umożliwienie przeprowadzenia części doświadczeń w Jego zakładzie.

Spis treści

Słowniczek użytych skrótów.....	4
1. Wstęp	6
2. Cel pracy	17
3. Materiały i metody.....	18
4. Wyniki	25
5. Dyskusja	32
6. Wnioski	40
7. Ryciny	41
8. Piśmiennictwo.....	60
9. Streszczenie	75
Summary	78

Słowniczek użytych skrótów.

Ab	- przeciwciało
ACTH	- (adrenocorticotrophic hormone) hormon adrenokortykotropowy, kortykotropina
Ag	- antygen
APC	- (antigen presenting cell) komórka prezentująca antygen
CARS	- (compensatory anti-inflammatory response syndrom) kompensacyjny zespół odpowiedzi przeciwzapalnej
CD	- (cluster of differentiation) kompleks różnicowania
CRH	- (corticotropin releasing hormone) hormon uwalniający kortykotropinę
DETC	- (dendritic epidermal T cell) dendrytyczny naskórkowy limfocyt T
EDTA	- kwas etylenodwuaminoczeroctowy, kwas wersenowy
FCS	- (foetal calf serum) płodowa surowica cielęca
FITC	- izotiocyanian fluoresceiny
GlyCAM	- (glycosylation-dependent cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji komórkowej zależna od glikozylacji
GM-CSF	- (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
HEV	- (high endothelial venule) żyłka z wysokim śródbłonkiem
HPA	- (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa
HSP	- (heat-shock proteins) białka szoku termicznego
ICAM	- (intercellular adhesion molecule) cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IFN	- interferon
Ig	- immunoglobulina
IL	- interleukina
KGF	- (keratinocyte growth factor) czynnik wzrostu keratynocytów
LFA	- (lymphocyte function-associated antigen) antygen związany z czynnością limfocytów
mAb	- (monoclonal antibody) przeciwciało monoklonalne
MadCAM	- (mucosal addressin cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji komórkowej będąca adresyną błon śluzowych
MHC	- (major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej

MICA	- nieklasyczne cząsteczki MHC posiadające łańcuch α klasy Ib
MICB	- nieklasyczne cząsteczki MHC posiadające łańcuch β klasy Ib
MLN	- (mesenteric lymph node) węzeł chłonny krezkowy
MODS	- (multiorgan dysfunction syndrome) zespół niewydolności wielonarządowej
NK	- komórka NK
PBS	- zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna, pozbawiona jonów wapnia i magnezu
PCL	- chlorek pikrylu (hapten)
PE	- fikoerytryna
PGE2	- prostaglandyna E2
PLN	- (peripheral lymph node) węzeł chłonny obwodowy
PP	- (Peyer's patches) kępkę Peyera
RC'	- (rabbit complement) liofilizowany dopełniacz króliczy
RPMI	- RPMI 1640, podłoże do hodowli komórek
SIRS	- (systemic inflammatory response syndrom) zespół uogólnionej reakcji zapalnej
SPL	- (spleen) śledziona
TCR	- (T-cell receptor) receptor limfocytów T
Tef	- limfocyt T efektorowy
TGF	- (transforming growth factor) transformujący czynnik wzrostu
TH	- (T helper) limfocyt T pomocniczy
TNF	- (tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu
TNP	- trójnitrofenyl
Tr	- limfocyt T regulacyjny
VCAM	- (vascular cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji komórkowej naczyń
VLA	- (very late antigen) antygen bardzo późny

Indeks ⁺ lub ⁻ oznacza istnienie (*) lub brak (°) odpowiedniej cechy

Znak [~] oznacza defektywną homozygotę z niefunkcyjnym genem danej cechy

1. Wstęp

1.1. Charakterystyka urazu.

W wyniku urazu dochodzi do przerywania barier ochronnych organizmu i związanej z tym destrukcji tkanek i komórek gospodarza. Następstwem tych zjawisk jest oligowolemia (hypowolemia) oraz pojawienie się dużej ilości własnych antygenów cytoplazmatycznych, jak również licznych antygenów obcych na terenie ustroju. W odpowiedzi na uraz organizm reaguje szeregiem zmian o charakterze obronno-adaptacyjnym. Celem tych zmian jest odseparowanie i ograniczenie miejsca urazu, przywrócenie objętości krwi krążącej, zapobieżenie infekcji, pobudzenie odbudowy zniszczonych tkanek i usunięcie tkanek martwiczych (1). Obserwowane zmiany mają charakter kompleksowy i obejmują procesy zachodzące z udziałem układu odpornościowego, neurohormonalnego, a także dotyczą przemian wodno-elektrolitowych oraz metabolicznych (procesy kataboliczno-anaboliczne). Stopień nasilenia odpowiedzi organizmu uzależniony jest przede wszystkim od ogólnego stanu ustroju oraz charakteru i siły przebytego urazu (2, 3, 4, 5). W przypadku urazów niewielkich reakcja obronna ustroju jest ograniczona do miejsca uszkodzenia i jej przebieg ma charakter lokalny. Natomiast rozległe urazy mechaniczne, poparzenia, jak również ciężkie urazy powstające w trakcie zabiegu operacyjnego wywołują zazwyczaj odpowiedź organizmu o charakterze uogólnionym, określaną obecnie jako „zespół uogólnionej reakcji zapalnej” [Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)] (6, 7, 8).

Jak już wspomniano, w wyniku urazu dochodzi do mobilizacji życiowo ważnych systemów organizmu, w tym układu odpornościowego oraz neurohormonalnego. W pierwszej fazie odpowiedzi na uraz szczególną rolę odgrywają mediatory zapalenia uwalniane przez śródbłonek uszkodzonych naczyń, komórki fagocytujące i limfocyty. Wśród wydzielanych w tym czasie substancji szczególne znaczenie odgrywają cytokiny prozapalne (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ , GM-CSF), aminy biogenne (histamina, serotonina), eikozanoidy (prostaglandyny, tromboksan, leukotrieny), a także inne mediatory zapalenia, takie jak między innymi tlenek azotu (NO), wolne rodniki tlenowe oraz białka ostrej fazy (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Uwolnione cytokiny stymulują i kontrolują przebieg reakcji zapalnej. Pod ich wpływem dochodzi do zwiększonej ekspresji

cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna naczyń oraz na powierzchni leukocytów, co z kolei sprzyja napływowi komórek układu odpornościowego do ogniska zapalenia (18, 19, 20). Pod kontrolą cytokin są także procesy krzepnięcia i fibrylizy, dzięki którym następuje odseparowanie miejsca urazu i ograniczenie zakresu reakcji zapalnej (21, 22, 23).

Jednocześnie aktywacji układu odpornościowego towarzyszy pobudzenie odpowiedzi neurohormonalnej. W następstwie stymulacji autonomicznego układu nerwowego oraz osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (HPA) dochodzi do wydzielenia hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH), kortykotropiny (ACTH), kortyzolu i katecholamin, a także prolaktyny i hormonu wzrostu. (11, 23, 24). W efekcie, w krótkim czasie po wystąpieniu urazu, ulega zmianie metabolizm ustroju (katabolizm pourazowy) i dochodzi do przesunięć wodno-elektrolitowych (25, 26). Zakres i czas trwania zmian obserwowanych w obrębie obu układów jest różny i zależy od charakteru oraz stopnia nasilenia przebytego urazu (27). Warto tutaj podkreślić, że reakcja neurohormonalna modyfikuje przebieg odpowiedzi zapalnej, wywierając wpływ zarówno stymulujący, jak i hamujący. Z jednej strony bowiem wydzielany przez przysadkę hormon wzrostu i prolaktyna, a także czynnik hamujący migrację makrofagów MIF, który uwalniany jest również przez biorące udział w reakcji zapalnej limfocyty T, oddziałują immunostymulująco (28, 29, 30). Z drugiej zaś uwalniane przez nadnercza glikokortykosteroidy wywierają efekt immunosupresyjny poprzez zmniejszenie sekrecji cytokin prozapalnych (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-12) przy jednoczesnym zwiększeniu syntezy cytokin przeciwzapalnych, takich jak między innymi IL-4 oraz IL-10, jak również na drodze ograniczenia migracji komórek do miejsca zapalenia, a także poprzez indukcję apoptozy limfocytów (31, 32, 33, 34, 35). Podobny immunosupresyjny i immunomodulacyjny efekt wywierają uwalniane w następstwie stresu katecholaminy, w wyniku czego w krótkim czasie od wystąpienia urazu rozwijającej się reakcji zapalnej towarzyszą symptomy osłabienia odporności (23, 36).

Ogół zmian posiadających charakter immunosupresyjny, które obserwowane są podczas rozwoju i na skutek zapalenia, określane jest obecnie jako „kompensacyjny zespół odpowiedzi przeciwzapalnej” [Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrom (CARS)] (37, 38). Istotą CARS jest kontrola stopnia nasilenia reakcji zapalnych i przywrócenie stanu homeostazy organizmu. Powrót chorego do zdrowia po przebytych urazie zależy od właściwego bilansu pomiędzy odpowiedzią pro- (SIRS) i przeciwzapalną (CARS)(39). Zarówno

krytycznie nadmierna, nieskompensowana odpowiedź zapalna organizmu, jak i brak kontroli stopnia nasilenia odpowiedzi przeciwzapalnej (CARS), mogą w konsekwencji prowadzić do wystąpienia zespołu niewydolności wielonarządowej [Multiorgan Dysfunction Syndrome (MODS)], a w niektórych przypadkach nawet do śmierci chorego (12, 40).

Pierwsze symptomy rozwoju reakcji przeciwzapalnej widoczne są wkrótce po wystąpieniu urazu i związane są z uwolnieniem cytokin przeciwzapalnych (IL-4, IL-10, IL-13 oraz TGF- β) (9). Uwolnienie tych mediatorów stymulowane jest przez cytokiny zapalne oraz wydzielane w odpowiedzi na uraz hormony stresowe, z których najistotniejszą rolę wydają się odgrywać kortyzol i katecholaminy. Uwolnione cytokiny przeciwzapalne hamują odpowiedź zapalną poprzez supresję produkcji mediatorów zapalenia (41). Mimo że działanie supresyjne cytokin nie jest jedynym mechanizmem supresji reakcji zapalnej, to warto jednak podkreślić, iż to, jakie cytokiny dominują w odpowiedzi – prozapalne czy przeciwzapalne - ma istotne znaczenie dla dalszego przebiegu i charakteru odpowiedzi immunologicznej (42, 43).

Stan immunosupresji pourazowej dotyczy szeregu aspektów odpowiedzi immunologicznej, zarówno nieswoistej jak i swoistej. Zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego mają zwykle charakter przejściowy i widoczne są w ciągu kilkunastu dni od wystąpienia urazu, a największe ich nasilenie przypada na pierwsze 3 do 7 dni po urazie. Większość parametrów odpowiedzi immunologicznej powraca do wartości wyjściowych w ciągu dwóch tygodni od chwili urazu (44, 45).

1.2. Wpływ urazu na odpowiedź immunologiczną.

Od szeregu lat wpływ różnego rodzaju urazów, w tym urazów operacyjnych, na odpowiedź immunologiczną był przedmiotem licznych prac badawczych. I tak, wielu autorów wykazało zaburzenia odpowiedzi nieswoistej na skutek przebytych urazów. Wyniki badań klinicznych pacjentów po przebytych urazach mechanicznych i oparzeniach wskazują na zaburzenia poziomu składników dopełniacza (wzrost składnika C3), które mogą być związane z rozwojem zespołu niewydolności wielonarządowej MODS (46, 47, 48). Istnieje także wiele doniesień wskazujących na zaburzenia funkcji fagocytarnej komórek dendrytycznych oraz

makrofagów w następstwie urazu (49). W wyniku urazu obserwowano również osłabienie chemotaksji neutrofilów oraz zmniejszenie ich zdolności bakteriobójczej (50, 51). Zarówno badania kliniczne, jak i doświadczalne wskazują na zmniejszenie ekspresji antygenów układu zgodności tkankowej MHC klasy II oraz prezentacji antygenów przez komórki prezentujące antygen [APC] w wyniku przebytych urazów (52). Wreszcie wielu autorów wskazuje na zahamowanie aktywności komórek NK zarówno w wyniku urazów eksperymentalnych, jak i zabiegów klinicznych (53).

Podobnie wpływ urazu na odpowiedź swoistą, komórkową i humoralną, był tematem licznych badań klinicznych i eksperymentalnych. Warto w tym miejscu nadmienić, że choć wcześniejsze badania dostarczyły wielu cennych informacji, to często były to informacje wzajemnie sprzeczne i przez to trudne do interpretacji. Z jednej strony bowiem liczne badania wskazywały, że w następstwie urazu dochodzi do obniżenia odporności zarówno komórkowej, mediowanej przez limfocyty T, jak i humoralnej z udziałem limfocytów B. Z drugiej natomiast strony wielu autorów wskazywało na podwyższenie niektórych parametrów odporności (np. odpowiedzi humoralnej) lub brak wpływu urazu na badane parametry (54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61).

Niezwykle istotne dla lepszego zrozumienia mechanizmu zaburzeń odporności związanych z przebyłym urazem wydaje się być wykazanie heterogenności fenotypowej oraz funkcjonalnej limfocytów T. Obecnie wiadomo, że kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej odgrywają limfocyty, które powszechnie nazywa się limfocytami $T\alpha\beta$. Komórki te rozpoznają antygen za pomocą receptora antygenowego TCR zbudowanego z łańcuchów α i β . Z kolei w oparciu o ekspresję koreceptorów CD4 oraz CD8 limfocyty $T\alpha\beta$ można podzielić na limfocyty $T\alpha\beta$ CD4⁺ oraz $T\alpha\beta$ CD8⁺. W obrębie limfocytów $T\alpha\beta$ CD4⁺, zwanych również komórkami T pomocniczymi (TH), wyróżnia się dwie populacje komórek: limfocyty pomocnicze typu pierwszego TH1 oraz limfocyty pomocnicze typu drugiego TH2. Obie populacje komórek TH różnią się w sposób istotny między sobą rodzajem uwalnianych cytokin oraz typem odpowiedzi immunologicznej, w której biorą udział.

Limfocyty TH1 wydzielają głównie IL-2, IFN- γ oraz TNF- β i odgrywają kluczową rolę w jednym z typów odpowiedzi komórkowej, której klasycznym przykładem jest reakcja nadwrażliwości typu późnego. Z kolei limfocyty TH2 uwalniają przede wszystkim IL-4, IL-6, IL-10 oraz IL-13 i są niezbędne dla pełnej aktywacji limfocytów B w przebiegu odpowiedzi humoralnej.

Warto podkreślić, że istnieje szereg czynników decydujących o tym, czy w odpowiedzi będą dominować limfocyty TH1, czy też komórki TH2. Wiadomo między innymi, że poza rodzajem antygeny, jego dawką i sposobem podania, na przebieg odpowiedzi immunologicznej ma również wpływ środowisko cytokinowe w miejscu indukcji odpowiedzi mediowanej przez komórki T. I tak, IL-12 oraz IFN- γ sprzyjają rozwojowi odpowiedzi komórkowej mediowanej przez limfocyty TH1, podczas gdy IL-4 oraz IL-6 preferencyjnie stymulują rozwój odpowiedzi humoralnej z udziałem komórek TH2. Jednocześnie cytokiny uwalniane przez obie populacje komórek TH1 i TH2 oddziałują na siebie wzajemnie antagonistycznie, co stanowi jeden z mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej (62, 63).

Zgodnie z przyjętym obecnie modelem opisującym wpływ urazu na odporność, pierwsza faza odpowiedzi organizmu, która ma charakter prozapalny i w przypadku urazów ciężkich może prowadzić do rozwoju reakcji SIRS, związana jest z rozwojem odpowiedzi typu TH1 (tj. z pobudzeniem odpowiedzi komórkowej) (64, 65, 66). Z kolei rozwijająca się w okresie od kilku godzin do kilku dni po wystąpieniu urazu odpowiedź przeciwzapalna, która w przypadku ogólnoustrojowej reakcji na uraz określana jest obecnie jako kompensacyjny zespół odpowiedzi przeciwzapalnej (CARS), związana jest z zahamowaniem odpowiedzi komórkowej (TH1) oraz przesunięciem równowagi w kierunku odpowiedzi humoralnej (TH2), z jednoczesną sekrecją cytokin przeciwzapalnych (67, 68).

Mechanizm zmiany profilu uwalnianych przez komórki TH cytokin pod wpływem urazu nie został do dziś w pełni wyjaśniony. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach sugerują, że istotne znaczenie odgrywa tutaj stymulacja syntezy IL-10 oraz supresja produkcji IL-12 (69, 70, 71). I tak, glikokortykosteroidy hamują odpowiedź komórkową zarówno poprzez bezpośredni wpływ na limfocyty T i komórki NK, który prowadzi do obniżenia ekspresji receptorów dla IL-12, jak również przez zahamowanie wydzielania IL-12 przez komórki prezentujące antygen (31). Z kolei uwolnione w następstwie urazu katecholaminy hamują wydzielanie IL-12 i jednocześnie silnie pobudzają syntezę IL-10, co w konsekwencji hamuje powstanie, proliferację i aktywację limfocytów TH1 (72). Podobny efekt wywiera uwalniana przez pobudzone komórki tuczne histamina, która oddziałując poprzez receptory H2, obecne na powierzchni monocytów, hamuje wydzielanie IL-12 i stymuluje produkcję IL-10 (73). Na zahamowanie produkcji IL-12 przez monocyty silnie wpływa również sama IL-10 oraz wydzielane przez monocyty prostaglandyny E2 (PGE2) (74, 75, 76, 77). Prostaglandyny E2 hamują ponadto

ekspresję receptora dla IL-12 (IL-12R β 1 oraz IL-12R β 2) na aktywowanych limfocytach krwi obwodowej (78).

Istotne znaczenie w procesie pourazowego zahamowania odpowiedzi komórkowej odgrywają także limfocyty T $\alpha\beta$ CD8⁺. Według klasycznego opisu komórek T $\alpha\beta$ CD8⁺ można wyróżnić dwie główne populacje komórek CD8⁺, tj. limfocyty T cytotoksyczne (Tc), zaangażowane w odpowiedzi komórkowej powstającej między innymi w zakażeniach wirusowych, oraz limfocyty T supresyjne (Ts), mające zdolność do negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznej. Warto również podkreślić, że komórki T $\alpha\beta$ CD8⁺, podobnie jak limfocyty T $\alpha\beta$ CD4⁺, są zdolne do uwalniania cytokin zarówno profilu TH1 (komórki Tc1), jak i TH2 (komórki Tc2) (79, 80). Wyniki badań klinicznych i laboratoryjnych ostatnich lat wskazują, że to właśnie limfocyty T $\alpha\beta$ CD8⁺, a nie T $\alpha\beta$ CD4⁺, odpowiedzialne są za rozwój odpowiedzi obserwowanej w następstwie urazu, w trakcie której dochodzi do sekrecji cytokin przeciwzapalnych, przypominających swym składem wzór cytokinowy komórek TH2 (81, 82).

W kontekście powyższych rozważań należy dodać, że tradycyjny podział limfocytów T na limfocyty T $\alpha\beta$ CD4⁺ oraz T $\alpha\beta$ CD8⁺, który, jak uważano, pokrywał się z podziałem limfocytów odpowiednio na limfocyty pomocnicze (TH) oraz limfocyty T supresyjne i limfocyty T cytotoksyczne, ma dziś już mniejsze znaczenie praktyczne. Tradycyjny podział limfocytów T został w połowie lat 80-tych uzupełniony o nową populację komórek T, które rozpoznają antygen przy użyciu receptora TCR zbudowanego z łańcuchów γ oraz δ . Limfocyty T tej populacji określa się mianem komórek T $\gamma\delta$. Limfocyty T $\gamma\delta$, podobnie jak komórki T $\alpha\beta$, mają na swojej powierzchni cząsteczki CD3, ale w większości komórki te nie posiadają ani koreceptorów CD4, ani CD8. Obecność limfocytów T $\gamma\delta$ potwierdzono u wszystkich dotychczas badanych kręgowców.

1.3. Limfocyty T $\gamma\delta$.

Oprócz odmiennej budowy receptora rozpoznającego antygen, limfocyty T $\gamma\delta$ odróżnia od limfocytów T $\alpha\beta$ szereg cech morfologicznych i funkcjonalnych, a także inny przebieg rozwoju ontogenetycznego. Limfocyty T $\gamma\delta$ dojrzewają w grasicy nieco wcześniej niż limfocyty T $\alpha\beta$, przy czym część komórek tej populacji podlega

różnicowaniu także poza grasnicą, w błonach śluzowych przewodu pokarmowego. Proces dojrzewania limfocytów $T\gamma\delta$ w grasicy ma nietypowy przebieg, który związany jest z podlegającą ścisłej kontroli mechanizmów regulacyjnych, zaprogramowaną rearanżacją określonych segmentów genu $V\gamma$ (83, 84, 85, 86, 87). W wyniku tego procesu dojrzałe limfocyty $T\gamma\delta$ opuszczają grasnicę i zasiedlają tkanki obwodowe tzw. falami. Proces dojrzewania limfocytów $T\gamma\delta$ najdokładniej poznano u myszy. U tych zwierząt jako pierwsze dojrzewają limfocyty T, których receptory TCR wykorzystują segmenty $V\gamma3$ oraz $V\delta1$. Wkrótce po nich powstają limfocyty T, których receptor TCR wykorzystuje segmenty $V\gamma4$ i $V\delta1$. Obie populacje komórek posiadają receptory TCR, które ze względu na całkowity brak zmienności na złączach oraz użycie tych samych segmentów genów V, D, J cechuje brak różnorodności. Dojrzałe komórki $T\gamma\delta$ po opuszczeniu grasicy zasiedlają odrębne tkanki obwodowe: komórki $V\gamma3$ docierają do skóry, a limfocyty $V\gamma4$ wędrują do błon śluzowych żeńskich narządów płciowych (88). Kolejne fale dojrzewających limfocytów $T\gamma\delta$ cechuje większe zróżnicowanie receptorów TCR, które wiąże się nie tylko z użyciem różnych genów V i J (dla łańcucha γ) oraz V, D i J (dla łańcucha δ), ale także z wykorzystaniem zmienności na złączach (88). I tak, kolejna subpopulacja limfocytów $T\gamma\delta$ posiada receptor TCR, który wykorzystuje segmenty $V\gamma2$ wraz z segmentami $V\delta5$, $V\delta6$ lub $V\delta7$. Komórki te obecne są we krwi i narządach limfatycznych dojrzałych myszy.

Na uwagę zasługuje wyjątkowa dystrybucja limfocytów $T\gamma\delta$ w organizmie. U ludzi oraz u większości badanych zwierząt limfocyty $T\gamma\delta$ stanowią niewielki odsetek (1-10%) limfocytów T krwi obwodowej oraz obwodowych narządów limfatycznych (89). Szczególnie licznie komórki te reprezentowane są natomiast w tkance nabłonkowej jelita i w skórze niektórych gatunków zwierząt. Pośród śród nabłonkowych limfocytów jelita (IEL) myszy komórki $T\gamma\delta$ stanowią około 50% wszystkich limfocytów, natomiast u ludzi odsetek ten wynosi około 20% (90). U myszy limfocyty $T\gamma\delta$ najliczniej reprezentowane są w skórze, gdzie występują jako dendrytyczne naskórkowe limfocyty T (DETC), posiadające na swojej powierzchni receptor TCR $V\gamma3/V\delta1$ (88). Tymczasem u ludzi komórki $T\gamma\delta$ rozmieszczone są bardziej równomiernie i stanowią zaledwie kilka procent limfocytów T śród naskórkowych. Rozmieszczenie limfocytów $T\gamma\delta$ w strategicznie ważnych tkankach (to jest na granicy ze środowiskiem zewnętrznym) umożliwia im

szybką reakcją na napotkane antygeny, zarówno obce jak i własne, pojawiające się na przykład w następstwie urazu fizycznego lub infekcji. Liczne badania na zwierzętach wykazały, że komórki DETC rozpoznają antygeny własne ustroju, prezentowane przez uszkodzone keratynocyty (91, 92). Aktywowane tą drogą komórki $T\gamma\delta$ uwalniają m.in. czynnik wzrostu keratynocytów (KGF), stymulując w ten sposób proces odbudowy uszkodzonych tkanek i gojenie ran (93, 94).

Większość limfocytów $T\gamma\delta$ rozpoznaje antygeny, które nie zostały poddane obróbce przez komórki APC i nie są w związku z tym prezentowane z udziałem antygenów układu zgodności tkankowej MHC klasy I lub II. Dzięki temu wachlarz antygenów rozpoznawanych przez komórki $T\gamma\delta$ jest bardzo szeroki i obejmuje m.in. peptydy, antygeny niebiałkowe (np. ufosforylowane metabolity bakteryjne, wielocukry, kwasy tłuszczowe), cząsteczki MICA i MICB, białka szoku cieplnego (HSP) (95, 96, 97). Sposób rozpoznawania i rodzaj rozpoznawanych antygenów to jedne z głównych cech odróżniających limfocyty $T\gamma\delta$ od komórek $T\alpha\beta$.

Limfocyty $T\gamma\delta$ stanowią heterogenną populację komórek, zróżnicowaną nie tylko pod względem morfologicznym, ale także funkcjonalnym. Istnieją doniesienia świadczące o zaangażowaniu limfocytów $T\gamma\delta$ w regulację przebiegu procesu zapalnego (98, 99, 100, 101). Liczne badania wskazują na udział limfocytów $T\gamma\delta$ w odpowiedzi przeciwwzakaźnej podczas różnego rodzaju infekcji wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych (102). Znaczna część limfocytów $T\gamma\delta$ przejawia zdolność do cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał, a także do nie podlegającej restrykcji MHC spontanicznej cytotoksyczności wobec komórek zmienionych nowotworowo (103, 104). Ponadto istnieje szereg doniesień na temat udziału komórek $T\gamma\delta$ w schorzeniach o podłożu autoimmunizacyjnym (105). Limfocyty $T\gamma\delta$ poza swą aktywnością cytotoksyczną, a nawet pomocniczą w przypadku odpowiedzi na niektóre antygeny rozpoznawane przez komórki B, posiadają również bardzo istotną funkcję immunoregulacyjną. Warto zaznaczyć, że komórki $T\gamma\delta$ w zależności od tego, na jakim etapie odpowiedzi immunologicznej zostały aktywowane, mogą stymulować lub hamować odpowiedź immunologiczną (106, 107, 108). Liczne prace doświadczalne wskazują także na zdolność limfocytów $T\gamma\delta$ do uwalniania cytokin charakterystycznych zarówno dla odpowiedzi typu TH1 (IL-2, IFN-gamma), jak i TH2 (IL-4, IL-10) (108, 109). Warto podkreślić, że biorące udział w odpowiedzi immunologicznej limfocyty $T\gamma\delta$ aktywowane są zwykle wcześniej niż limfocyty $T\alpha\beta$ (109). W związku z powyższym limfocyty

$T\gamma\delta$ aktywowane we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej mogą, poprzez możliwość kreowania odpowiedniego środowiska cytokinowego w miejscu rozpoznania antygeny przez komórki $T\alpha\beta$, wpływać w istotny sposób na dalszy przebieg odpowiedzi antygenoswoistej.

Oprócz zdolności do wydzielania różnego rodzaju cytokin i czynników wzrostu aktywowane limfocyty $T\gamma\delta$ uwalniają także szereg chemokin. Zarówno pobudzone komórki DETC, jak i intraepitelialne limfocyty $T\gamma\delta$ jelita uwalniają limfotaktynę, która wydaje się odgrywać kluczową rolę w przyciąganiu komórek zapalnych do uszkodzonych tkanek (110).

Udział limfocytów $T\gamma\delta$ w regulacji odpowiedzi immunologicznej nie ogranicza się jedynie do przesunięcia równowagi z TH1 w kierunku TH2 lub odwrotnie, lecz związany jest również z aktywnością supresyjną oraz kontrasupresyjną komórek $T\gamma\delta$. Istnieje szereg prac mówiących o kontrasupresyjnym, tj. pozytywnym wpływie limfocytów $T\gamma\delta$ na odpowiedź immunologiczną. Wykazano między innymi, iż dla powodzenia adoptywnego transferu zarówno odpowiedzi komórkowej, jak również odpowiedzi humoralnej, niezbędna jest obecność komórek $T\gamma\delta$. We wspomnianych badaniach wykazano, że limfocyty $T\gamma\delta$ posiadają zdolność do ochrony komórek T efektorowych przed działaniem limfocytów T supresyjnych zarówno w przypadku odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej (111, 112, 113, 114). Z kolei dalsze badania prowadzone w oparciu o zwierzęcy model stwardnienia rozsianego wykazały, że działanie kontrasupresyjne limfocytów $T\gamma\delta$ związane jest ze stymulacją komórek APC do sekrecji IL-12 (105).

Limfocyty $T\gamma\delta$ poza swym pozytywnym, kontrasupresyjnym wpływem na mechanizmy obronne organizmu mogą również działać hamująco na reakcje odpornościowe. I tak w badaniach doświadczalnych wykorzystujących model reakcji nadwrażliwości kontaktowej wykazano, że podanie wysokiej dawki antygeny defektywnym szczepom myszy $TCR\alpha^{-/-}$ powoduje indukcję komórek $T\gamma\delta$ o aktywności supresyjnej (115, 116, 117, 118, 119). Istnieją również doniesienia o udziale komórek $T\gamma\delta$ supresyjnych w regulacji odpowiedzi immunologicznej w modelu doświadczalnym astmy, w reakcji odrzucania przeszczepu allogenicznego, jak również w hamowaniu reakcji zapalnej w ośrodkowym układzie nerwowym (120).

1.4. Wędrowka limfocytów T w ustroju

Na zakres i charakter odpowiedzi immunologicznej ustroju na uraz wpływają nie tylko zmiany funkcjonalne komórek układu odpornościowego, ale także ich właściwa dystrybucja w obrębie tkanek i narządów organizmu.

Powszechnie wiadomo, że limfocyty stale wędrują pomiędzy narządami chłonnymi a krwią. Istotną rolę w migracji limfocytów odgrywają cząsteczki adhezyjne i receptory dla chemokin, znajdujące się na powierzchni limfocytów, oraz odpowiadające im molekuły na powierzchni komórek śródbłonka naczyń. Istnieją różnice zarówno w stopniu ekspresji, jak również rodzaju cząsteczek adhezyjnych występujących na komórkach T naiwnych oraz komórkach T efektorowych. I tak, na powierzchni limfocytów T naiwnych występuje głównie L-selektyna, dla której ligandami są adresyny CD34 oraz GlyCAM-1, obecne na wysokich komórkach śródbłonka wyściełającego postkapilarne naczynia żyłne (HEV) w węzłach chłonnych (121). Tymczasem komórki T efektorowe charakteryzuje niewielka ekspresja L-selektyny, natomiast posiadają one na swojej powierzchni znaczną ilość cząsteczek VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) oraz $\alpha 4\beta 7$, które należą do rodziny integrzyn. Ligandami dla wspomnianych integrzyn są odpowiednio VCAM-1, obecny na komórkach śródbłonka naczyń, oraz MAdCAM-1, zlokalizowany w kępkach Peyera, a także na śródbłonku naczyń błon śluzowych (122). Istotną rolę w migracji limfocytów T, zarówno naiwnych, jak i efektorowych, odgrywają także należące do rodziny integrzyn cząsteczki LFA-1. Ligandem dla integryny LFA-1 są występujące na powierzchni śródbłonka naczyń cząsteczki ICAM-1 należące do nadrodziny immunoglobulin. Uważa się, że integryny LFA-1 oraz VLA-4 odgrywają szczególną rolę w migracji limfocytów T do miejsca toczącej się reakcji zapalnej (122).

W odróżnieniu od limfocytów granulocyty i monocyty nie recyrkulują, natomiast ich wędrowka ma charakter jednokierunkowy, tj. z łożyska naczyniowego do uszkodzonych tkanek lub miejsc objętych zakażeniem. W procesie migracji monocytów i granulocytów, podobnie jak w przypadku limfocytów, istotną rolę odgrywają odpowiednie cząsteczki adhezyjne leukocytów oraz komórek śródbłonka naczyń. Kluczową rolę w uporządkowanej wędrowce leukocytów z krwi do tkanek odgrywają cząsteczki s-Le^x (Sialyl Lewis), występujące na leukocytach fagocytujących. Ligandem dla molekuł s-Le^x (Sialyl Lewis) są E-selektyny występujące na powierzchni komórek śródbłonka naczyń. Dodatkowo w procesie

migracji leukocytów fagocytujących istotną rolę odgrywają występujące na ich powierzchni, a wcześniej już wspomniane, cząsteczki LFA-1, dla których ligandem są molekuly ICAM-1. Oprócz cząsteczek adhezyjnych w procesie cyrkulacji leukocytów istotne znaczenie odgrywa także szereg innych czynników, w tym między innymi cytokiny, takie jak np. TNF- α , a także chemokiny.

W licznych badaniach zaobserwowano, że różnego rodzaju urazy mogą prowadzić do zmian w rozmieszczeniu leukocytów. Wykazano między innymi zmiany w dystrybucji limfocytów, monocytów i granulocytów, będące następstwem oparzeń i zabiegów operacyjnych zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Przyczyny wędrówki komórek układu odpornościowego związanej z przebytych urazem nadal nie są w pełni wyjaśnione, choć wiadomo, że istotną rolę w tym procesie, poza molekułami adhezyjnymi i chemokinami, odgrywają również uwalniane w następstwie stresu glikokortykosteroidy (20, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129).

W niniejszej pracy dokonałem oceny wpływu zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów T $\alpha\beta$ i T $\gamma\delta$ we krwi obwodowej oraz w narządach chłonnych u myszy. Jednocześnie, podjąłem próbę określenia, jakie znaczenie funkcjonalne posiada wędrówka obu populacji limfocytów T.

2. Cel pracy

W mojej pracy podjąłem badania w celu uzyskania odpowiedzi na następujące pytania:

1. Jaki wpływ wywiera zabieg operacyjny u myszy na rozmieszczenie limfocytów $T\ \gamma\delta$ i $T\ \alpha\beta$ we krwi obwodowej oraz w narządach chłonnych?
2. Jakie znaczenie funkcjonalne mogą mieć obserwowane w następstwie zabiegu operacyjnego zmiany w rozmieszczeniu badanych populacji limfocytów T?
3. Jaki jest potencjalny mechanizm zmiany dystrybucji limfocytów $T\ \gamma\delta$ i $T\ \alpha\beta$?
4. Jaka jest rola regulacyjna limfocytów $T\ \gamma\delta$?

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne.

Badania wykonano na populacji samców myszy szczepu CBA/J (H-2^K), pochodzących z hodowli Zakładu Biologii Rozwoju Człowieka oraz Katedry Immunologii CM UJ. Do doświadczeń wykorzystano zwierzęta w wieku 6-8 tygodni, hodowane w warunkach standardowych, karmione autoklawowanym pokarmem granulowanym, który wraz z wodą dostarczano *ad libitum*. Każda grupa zwierząt wykorzystana w przeprowadzonych doświadczeniach składała się średnio z czterech myszy. Wszystkie doświadczenia powtarzano co najmniej trzykrotnie.

Badania przeprowadzono zgodnie z wymogami Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3.2. Odczynniki.

Chlorek pikrylu (PCI, trinitrophenyl [TNP] chloride) (Chemica Alta, Edmonton, Canada); mitomycyna C, Tris, EDTA oraz paraformaldehyd (Sigma, St. Louis, MO); [³H]-tymidina (Lacomed, Rez, CR); RPMI 1640, hepes (1M); pirogronian sodu oraz surowica płodowa cielęca (FCS) (Life Technologies, Grand Island, NY); L-glutamina, penicylina oraz streptomycyna (Gibco, Grand Island, NY); heparyna (Polfa, Warszawa) oraz dextran T-500 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Uppsala, Sweden). W niektórych doświadczeniach wykorzystano immunoglobuliny mysie uzyskane z surowicy myszy szczepu CBA/J, według metody McKinney'a i Parkinson'a, skonjugowane z haptenem TNP (TNP-Ig) zgodnie z przepisem Eisen'a. W testach *in vitro* stosowano TNP-Ig o współczynniku podstawienia TNP₄₀-mIg.

3.3. Przeciwciała monoklonalne i dopełniacz.

Do doświadczeń, w których wykorzystano cytometr przepływowy, użyto następujących przeciwciał monoklonalnych (mAb) skonjugowanych z izotiocjanianem fluoresceiny (FITC) lub fikorerytryną (PE): anty-TCR γ -FITC (klon

GL3, chomicze), anti-TCR β -FITC (klon H57-597, chomicze) oraz anti-CD11a-PE (klon 2D7, szczurze), anti-CD49d-PE (klon 9C10, szczurze), anti-CD54-PE (klon 3E2, chomicze) oraz anti-CD62L-PE (klon MEL-14, szczurze). Jako kontrolę izotypową reakcji wykorzystano przeciwciała anti-IgG2-FITC, IgG2a-PE oraz anti-IgG1-PE. Powyższe przeciwciała monoklonalne pochodziły z firmy PharMingen (San Diego, CA).

W niektórych testach proliferacji wykorzystano następujące przeciwciała monoklonalne oczyszczone na białku A : anti-IL-4 (klon 11B11, anti-mysie), anti-IL-10 (klon SXC1, anti-mysie), anti-TGF- β (klon HB 9849, anti-mysie). Hybrydomy produkujące wspomniane przeciwciała otrzymał dr hab. n. med. Marian Szczepanik od dr Charles'a A. Janeway'a, Jr., z Yale University School of Medicine New Haven, CT. Ponadto do negatywnej selekcji subpopulacji limfocytów T użyto supernatantów z hodowli komórkowych zawierających mAb anti-TCR δ (klon UC7-13 D5, chomicze) otrzymane od Dr J. Bluestone, University of Chicago, Chicago IL oraz anti-TCR β (klon H57-597, chomicze) otrzymane od Dr Ralph'a Kubo, Cytel Inc., La Jolla, CA. Wspomniane supernatanty zawierały średnio 10-15 μ g/ml odpowiedniego mAb.

W celu deplecji w niektórych doświadczeniach użyto liofilizowanego dopełniacza króliczego (RC') (Pel-Freeze Biologicals, Brown Deer, WI).

3.4. Oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych na białku A.

Supernatant produkowany przez odpowiednią, hodowaną *in vitro* hybrydomę oczyszczano na białku A sprzężonym z Sepharose 4 (Fast Flow, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden). Przed rozpoczęciem procesu oczyszczania białko A przepłukiwano buforem startowym (20mM bufor fosforanowy o pH=7,2). Następnie na kolumnę nakładano supernatant zawierający przeciwciała monoklonalne i przepłukiwano kolumnę wielokrotnie buforem fosforanowym. Frakcję IgG wymywano z kolumny przy pomocy 0,1 M CH₃COONa o pH=4. W trakcie elucji zbierano frakcje o objętości 1ml, które natychmiast doprowadzano do pH=7,0 przy pomocy buforu Tris-HCl o pH=9.0. W uzyskanych frakcjach oceniano spektrofotometrycznie, przy długości fali λ =280nm, stężenie białka IgG. Na koniec otrzymane przeciwciała dializowano względem buforu PBS o pH=7,2. Proces oczyszczania przeciwciał prowadzono w temperaturze 4°C.

3.5. Zabieg chirurgiczny: laparotomia, gastrektomia.

Zwierzęta znieczulane były metodą wziewną poprzez podanie przez maskę mieszaniny powietrza i halotanu. Znieczulonym zwierzętom golono skórę brzucha i odkażano ją 70% alkoholem etylowym. Jamę brzuszną otwierano poprzez przeprowadzenie cięcia długości 0,5 – 1cm w lewym nadbrzuszu, równoległe do linii środkowej ciała (laparotomia). Następnie w okolicy dna żołądka zakładano jedwabną podwiązkę i odcinano nożyczkami część żołądka położoną dystalnie od podwiązki (gastrektomia). Krwawiące naczynia koagulowano termicznie. W ten sposób usuwano ok. 1/3 żołądka. Otrzewną, mięśnie i skórę zszywano szwem ciągłym. Zwierzęta kontrolne poddawano jedynie zabiegowi laparotomii.

3.6. Przygotowanie zawiesiny limfocytów z krwi.

Zwierzętom podawano dożylnie 10U heparyny w 0,2 ml PBS, a następnie poprzez nakłucie splotu naczyniowego pozagałkowego pobierano pipetą pasteurowską ok. 100 µl krwi. Uzyskaną próbkę zawieszano w 100 µl 2% roztworu dextranu T-500 w PBS zawierającym 3 mg EDTA/ml i inkubowano w łaźni wodnej w temp. 37°C przez 30 min. Podczas inkubacji większość erytrocytów sedymentowała, pozwalając na zebranie populacji leukocytów z górnych warstw otrzymanej zawiesiny. Uzyskane w ten sposób komórki płukano dwukrotnie zimnym PBS zawierającym 2% FCS i przechowywano w zamkniętych probówkach Eppendorfa na lodzie.

3.7. Izolacja limfocytów z narządów chłonnych.

Węzły chłonne podskórne (pachowe oraz pachwinowe), węzły chłonne krezkowe, kępki Peyera i śledziony pobierano do zimnego (4°C) roztworu RPMI 1640 zawierającego 10% FCS. Następnie zebrane narządy delikatnie przecierano między szkiełkami mikroskopowymi ze szlifem i przesączano przez gazę nylonową Nybolt 110. Uzyskaną w ten sposób zawiesinę komórkową płukano dwukrotnie zimnym PBS zawierającym 2% FCS i przechowywano na lodzie.

3.8. Analiza dystrybucji limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ oraz ekspresji molekuł adhezyjnych przy użyciu cytometrii przepływowej.

Limfocyty z węzłów chłonnych, kępek Peyera, śledziony oraz krwi obwodowej pobierano od zwierząt nieoperowanych (zwierzęta kontrolne) oraz od myszy poddanych zabiegowi gastrektomii lub laparotomii w 1, 3, 7 i 14 dni po zabiegu. Zebrane komórki zawieszano w roztworze PBS zawierającym 2% FCS oraz 0,01% NaN_3 (bufor FACS), uzyskując koncentrację komórek $5 \times 10^6/\text{ml}$. Następnie 100 μl zawiesiny (5×10^5 komórek) inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi w buforze FACS przez 30 min. na lodzie. Grupę kontrolną (kontrola tła fluorescencji) stanowiły komórki inkubowane wraz z przeciwciałami anti-IgG2-FITC, IgG2a-PE oraz anti-IgG1-PE, w buforze FACS. Komórki znakowane były pojedynczo przeciwciałami monoklonalnymi anti-TCR β i anti-TCR δ sprzężonymi z fluoresceiną (FITC) oraz podwójnie, poprzez użycie wspomnianych wyżej przeciwciał wraz z przeciwciałami anti-CD11a, anti-CD49d, anti-CD54, anti-CD62L sprzężonymi z fikoerytryną (PE). Po inkubacji próbki płukano dwukrotnie zimnym buforem FACS, następnie komórki zawieszano w 200 μl 1% roztworu paraformaldehydu w buforze FACS i przechowywano w zamkniętych, zawiniętych w folię aluminiową probówkach Falcon (12x75 mm, Becton-Dickinson) w temperaturze 4 °C. Badany materiał analizowano przy pomocy cytofluorometru przepływowego FACStar Plus firmy Becton Dickinson, poddając każdorazowo ocenie 10^4 komórek w badanej próbce. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzano przy użyciu programu Cell Quest (Becton Dickinson).

3.9. Test zahamowania proliferacji komórek uczulonych *in vitro*.

Myszy poddane zabiegowi gastrektomii lub laparotomii w trzecim dniu po operacji aktywnie immunizowano poprzez malowanie ogolonej skóry brzucha i klatki piersiowej 0,15 ml 5% roztworu PCI w mieszaninie acetonu i alkoholu (w stosunku 1:3). Grupę kontrolną (kontrola pozytywna) stanowiły myszy immunizowane, które nie zostały poddane żadnemu zabiegowi operacyjnemu. Cztery dni po immunizacji od myszy wszystkich grup badanych pobrano jałowo węzły limfatyczne pachowe i pachwinowe. Następnie z wyizolowanych narządów przygotowano zawiesiny komórek, które umieszczono w ilości 3×10^5

komórek/dolek, w triplikatach w okrągłoadennej 96-dolekowej mikroplacie (Falcon, Oxnard, CA). Komórki poddano 48 godzinnej inkubacji z kolejnymi, 3-krotnymi rozcieńczeniami roztworu TNP-Ig, rozpoczynając od koncentracji 300 µg/ml. Hodowlę prowadzono w 37°C w atmosferze 5% CO₂ w podłożu hodowlanym RPMI 1640, zawierającym 100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny, 2 mM L-glutaminy, 25 mM HEPES, pirogronianu sodu, 5x10⁻⁵ M 2-merkaptoetanolu i 10% FCS. Całkowita objętość hodowli wynosiła 200 µl/dolek. Po upływie 48 godzin hodowli do zawiesiny komórek dodawano 0,5 µCi/dolek [³H] –tymidyny i całość hodowano przez kolejne 18 godzin. Następnie przy pomocy licznika scyntylicyjnego Wallac 1409 (Wallac) mierzono stopień inkorporacji [³H] –tymidyny. Wartość tła stanowiła ilość zliczeń uzyskana z komórek bez dodatku antygeny w poszczególnych grupach badanych. Wartość tę następnie odejmowano od wszystkich pomiarów uzyskanych w trakcie hodowli komórek z antygenem. Wyniki pomiarów przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych ($\bar{x} \pm SD$).

3.10. Test proliferacji komórek uczulonych w obecności komórek regulacyjnych.

Myszy uczulano 5% roztworem PCL zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszym paragrafie (3.9). W czwartym dniu po uczuleniu pobierano jałowo węzły pachowe i pachwinowe, a następnie uzyskaną w ten sposób zawiesinę komórek uczulonych (limfocyty Tef) płukano trzykrotnie w RPMI 1640 wzbogaconym 10% FCS. Jednocześnie od myszy, które 3 dni wcześniej poddano operacji gastrektomii lub laparotomii, pobierano jałowo węzły chłonne krezkowe, będące źródłem komórek regulacyjnych. Komórki regulacyjne poddawano dodatkowo inkubacji w roztworze mitomycyny C o stężeniu 30 µg/ml, w temperaturze 37°C przez 30 minut, w celu zahamowania ich proliferacji, a następnie płukano trzykrotnie roztworem RPMI 1640 wzbogaconym 10% FCS. Komórki uczulone (Tef), których koncentracja wynosiła 3x10⁵/dolek, inkubowano następnie z kolejnymi, 3-krotnymi rozcieńczeniami roztworu TNP-Ig, począwszy od koncentracji 300µg/ml, w obecności 6x10⁴ komórek regulacyjnych, zgodnie z warunkami hodowli, które opisano we wcześniejszym paragrafie (3.9). Kontrolę pozytywną stanowiły komórki uczulone hodowane w obecności kolejnych rozcieńczeń antygeny bez dodatku komórek regulacyjnych. Hodowlę prowadzono

przez okres 48 godz. Po zakończeniu inkubacji do zawiesiny komórek dodano 0,5 μCi /dołek [^3H] –tymidyny i prowadzono hodowlę przez kolejne 18 godzin. Następnie przy pomocy aparatu Wallac 1409 (Wallac) mierzono stopień inkorporacji [^3H] –tymidyny. Od uzyskanych pomiarów w próbkach badanych odejmowano wartość tła (ilość zliczeń z hodowli komórek bez dodatku antygeny). Wyniki pomiarów przedstawiono w postaci średnich ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

3.11. Określenie fenotypu komórek regulacyjnych.

W niektórych doświadczeniach używano dwóch populacji komórek regulacyjnych: komórek $\text{T}\alpha\beta^-$ ($\text{TCR } \gamma\delta^+$) oraz $\text{T}\gamma\delta^-$ ($\text{TCR } \alpha\beta^+$). W celu otrzymania wyżej wspomnianych populacji komórek zawieszono komórki węzłów chłonnych krezkowych pochodzących od myszy, które zostały trzy dni wcześniej poddane gastrektomii, inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi anti- $\text{TCR}\beta$ (H57-597) lub anti- $\text{TCR}\delta$ (UC7-135 D5) lub RPMI 1640 z 10% FCS (grupa kontrolna) przez 45 min. na lodzie. Po inkubacji komórki płukano zimnym roztworem PBS, a następnie inkubowano z dopełniaczem króliczym (RC') (rozcieńczenie 1:75) w temperaturze 37°C przez 60 min., stosując 1 ml rozcieńczonego RC' na 10^7 komórek. Otrzymane w ten sposób dwie populacje komórek zawieszano w RPMI 1640 z 10% FCS, po uprzednim 2-krotnym płukaniu tym samym medium. Tak uzyskane populacje komórek regulacyjnych nie zawierające limfocytów $\text{T}\alpha\beta$ ($\text{T}\alpha\beta^-$) względnie limfocytów $\text{T}\gamma\delta$ ($\text{T}\gamma\delta^-$) oraz wyjściowe komórki Tr (komórki węzłów chłonnych krezkowych traktowane samym medium i RC'), po uprzednim traktowaniu mitomycyną C, hodowano wraz z komórkami uczulonymi (Tef) oraz TNP-Ig analogicznie do metodyki opisanej w paragrafie „Test proliferacji komórek uczulonych w obecności komórek regulacyjnych” (3.10). W kontroli pozytywnej hodowano same komórki uczulone w obecności antygeny. Po upływie 48 godz. hodowli do wszystkich dołków na płytce dodawano [^3H] –tymidynę i hodowlę kontynuowano przez kolejne 18 godz.. Po zakończeniu hodowli dokonywano pomiaru inkorporacji [^3H] –tymidyny, a wyniki wyrażano w postaci średnich ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

3.12. Określenie mechanizmu działania komórek Tr.

W celu określenia mechanizmu, poprzez jaki działają komórki Tr indukowane w węzłach chłonnych krezkowych w wyniku zabiegu operacyjnego posłużono się testem zahamowania proliferacji komórek uczulonych hodowanych w obecności przeciwciał neutralizujących wybrane cytokiny. Komórki T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ (tzn. pozbawione limfocytów $\text{T}\alpha\beta$ zgodnie z metodyką opisaną w paragrafie 3.11) pochodzące z węzłów chłonnych krezkowych, uzyskane od myszy poddanych trzy dni wcześniej gastrektomii, traktowano roztworem mitomycyny C, a następnie hodowano z komórkami uczulonymi pochodzącymi z węzłów pachowych i pachwinowych w obecności TNP-Ig. Warunki hodowli były zgodnie z opisem przedstawionym w paragrafie „Test proliferacji komórek uczulonych w obecności komórek regulacyjnych” (3.10). W niektórych grupach badanych, zawierających mieszaninę komórek uczulonych (Tef) i komórek regulacyjnych T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ ($\text{T}\alpha\beta^-$), dodawano 10 $\mu\text{g/ml}$ monoklonalnych przeciwciał neutralizujących dla odpowiednich cytokin: anty-IL-4, anty-IL-10, lub anty-TGF- β . Kontrolę supresji w niniejszym doświadczeniu stanowiły komórki Tr (nie traktowane mAb i RC') hodowane wraz z komórkami uczulonymi w obecności antygeny. Z kolei kontrolą pozytywną były komórki uczulone hodowane z samym antygenem. Po upływie 48 godz. hodowli do wszystkich dołków testowych dodawano [^3H] –tymidynę i inkubowano przez kolejne 18 godz., po czym dokonywano pomiaru inkorporacji [^3H] –tymidyny. Wyniki wyrażano w postaci średnich ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

3.13. Opracowanie wyników.

W celu sprawdzenia powtarzalności uzyskanych wyników każdy eksperyment był wykonywany co najmniej trzykrotnie. Dla każdej grupy badanej obliczano średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe (SD). Znamienność statystyczną otrzymanych wyników określano na podstawie testu t-Studenta.

4. Wyniki

4.1. Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów $T\gamma\delta$ i $T\alpha\beta$ w kępkach Peyera i węzłach chłonnych krezkowych.

W celu sprawdzenia, czy zabieg operacyjny wpływa na dystrybucję limfocytów $T\alpha\beta$ oraz $T\gamma\delta$, przeprowadzono serię doświadczeń, w których dokonano oceny odsetka wspomnianych populacji limfocytów T w narządach chłonnych jamy brzusznej, tj. w węzłach chłonnych krezkowych, oraz w kępkach Peyera myszy poddanych zabiegowi operacyjnemu. W przypadku zwierząt operowanych materiał badany pobierano kolejno w 1, 3, 7 i 14 dniu po operacji. W każdym doświadczeniu badano dwie grupy myszy – myszy poddane zabiegowi częściowej resekcji żołądka (gastrektomia), które były właściwą grupą badaną, oraz myszy poddane zabiegowi nacięcia powłok skórnych (laparotomia), które stanowiły grupę kontrolną. Dodatkowo do badań dołączano grupę zwierząt nieoperowanych, od których pobierano węzły chłonne krezkowe oraz kępki Peyera (oznaczone na rycinach jako dzień '0') i które przyjmowano jako wartość kontrolną. Wyniki przedstawione na Rycinie 1 pokazują stopniowy wzrost odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ w kępkach Peyera oraz w węzłach chłonnych krezkowych, rozpoczynający się już w pierwszym dniu po zabiegu operacyjnym (gastrektomia), z maksimum zmian przypadającym na 3 dzień po operacji. W przypadku komórek pochodzących z kępek Peyera (Grupa A) obserwowano wówczas wzrost odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ z $1,9\% \pm 0,5$ (wartość kontrolna) do $10,5\% \pm 0,3$, tj. 546% wartości kontrolnej. Z kolei dla komórek pobranych z węzłów chłonnych krezkowych (Grupa B) obserwowano wzrost odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ z $2,7\% \pm 0,7$ (wartość kontrolna) do $8,8\% \pm 3,5$ (wartość 3 dnia po operacji) tj. 322% wartości kontrolnej. Odsetek komórek $T\gamma\delta$ w obu badanych narządach powracał do wartości wyjściowych w 7 dniu po zabiegu. Jednocześnie zabieg laparotomii nie wywierał wpływu na zmianę odsetka komórek $T\gamma\delta$ w kępkach Peyera i węzłach chłonnych krezkowych (Grupa C i Grupa D) we wszystkich badanych punktach czasowych.

W przeciwieństwie do obserwowanych zmian odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ analiza poziomu limfocytów $T\alpha\beta$ przedstawiona na Rycinie 2 wykazała istotny spadek odsetka komórek $T\alpha\beta$ w 3 dniu po zabiegu operacyjnym (gastrektomia)

zarówno w kępkach Peyera (Grupa A) z 38,4% \pm 6,8 do 21,2% \pm 6,2, tj. 55% wartości kontrolnej, jak również w węzłach chłonnych krezkowych (Grupa B) z 56,7% \pm 15 do 40,4% \pm 17, tj. 71% wartości kontrolnej. Wartości te powracają do poziomu kontrolnego w 14 dniu po zabiegu, zarówno w kępkach Peyera (Grupa A) jak i w węzłach chłonnych krezkowych (Grupa B). Jednocześnie w grupie zwierząt poddanych laparotomii obserwowano nieznaczny, ale statystycznie znamiennej wzrost odsetka komórek T $\alpha\beta$ w kępkach Peyera (Grupa C) z 38,4% \pm 6,8 do 48,8% \pm 3,8; tj. 127,7% wartości kontrolnej, w 3 dniu po zabiegu. Wzrost ten utrzymywał się aż do 14 dnia od wykonania operacji. W przypadku komórek pochodzących z węzłów chłonnych krezkowych (Grupa D) nie zaobserwowano istotnych zmian ich odsetka w następstwie laparotomii.

4.2. Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów T $\gamma\delta$ i T $\alpha\beta$ we krwi obwodowej.

W kolejnym doświadczeniu podjęto próbę zbadania wpływu zabiegu operacyjnego na dystrybucję komórek T $\alpha\beta$ i T $\gamma\delta$ we krwi obwodowej badanych zwierząt. Otrzymane wyniki przedstawione zostały na Rycinie 3. W niniejszym eksperymencie zaobserwowano znaczny spadek odsetka limfocytów T $\alpha\beta$ (Grupa A) z 18,1% \pm 0,8 do 8,2% \pm 1,7, tj. 45% wartości kontrolnej, oraz T $\gamma\delta$ (Grupa B) z 6,7% \pm 2,8 do 3,9% \pm 2,0, tj. 58% wartości kontrolnej u myszy poddanych zabiegowi gastrektomii. Spadek odsetka obu badanych populacji komórek obserwowano w 1, 3 i 7 dniu po wykonaniu częściowej resekcji żołądka. Wartości te powracają do poziomu wartości kontrolnych w 14 dniu po zabiegu. Natomiast zabieg laparotomii nie wywierał wpływu na dystrybucję limfocytów T $\alpha\beta$ i T $\gamma\delta$ we krwi obwodowej badanych zwierząt (Grupa C i Grupa D). Wartości w grupach badanych odnoszono do pomiarów wykonanych we krwi obwodowej pochodzącej od myszy nieoperowanych (dzień '0')

4.3. Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów $T\gamma\delta$ i $T\alpha\beta$ w węzłach chłonnych obwodowych oraz w śledzionie.

Analiza cytometryczna limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ w kępkach Peyera, węzłach chłonnych krezkowych oraz krwi obwodowej wykazała, że największe zmiany w rozmieszczeniu komórek $T\alpha\beta$ oraz $T\gamma\delta$ mają miejsce w 3 dniu po operacji. W związku z powyższym, w niniejszym eksperymencie, jak również w dalszych doświadczeniach, testy przeprowadzano w 3 dniu po zabiegu. W omawianym doświadczeniu postanowiono sprawdzić, czy uraz jakim jest zabieg chirurgiczny, ma również wpływ na rozmieszczenie wspomnianych populacji limfocytów T w śledzionie i w węzłach chłonnych obwodowych (węzły chłonne pachowe i pachwinowe) w 3 dniu po zabiegu chirurgicznym. Uzyskane wyniki przedstawiono odpowiednio na Rycinie 4A oraz Rycinie 4B. W niniejszym doświadczeniu zaobserwowano statystycznie znamiennej wzrost odsetka komórek $T\gamma\delta$ węzłów chłonnych obwodowych u myszy poddanych zabiegowi gastrektomii (Grupa A) z $4,6\% \pm 1,1$ do $9,0\% \pm 0,8$, tj. 195,7% wartości kontrolnej (Rycina 4A). Jednocześnie nie zaobserwowano istotnych zmian w dystrybucji komórek $T\gamma\delta$ węzłów chłonnych obwodowych w grupie myszy poddanych laparotomii (Grupa C; Rycina 4A). Ponadto wyniki przedstawione na Rycinie 4A pokazują brak istotnych różnic w odsetku limfocytów $T\gamma\delta$ w śledzionie myszy poddanych zarówno gastrektomii, jak również laparotomii, w odniesieniu do grupy kontrolnej (Grupa B oraz Grupa D). Ocena odsetka limfocytów $T\alpha\beta$ w węzłach chłonnych obwodowych i w śledzionie nie wykazywała istotnych zmian w dystrybucji komórek $T\alpha\beta$ w badanych narządach, tak w następstwie gastrektomii (Grupa A i Grupa B; Rycina 4B), jak i laparotomii (Grupa C oraz Grupa D; Rycina 4B).

4.4. Analiza ekspresji molekuł adhezyjnych na komórkach $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$.

Wcześniej przeprowadzone badania odsetka limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ w węzłach chłonnych jamy brzusznej (tj. w kępkach Peyera i w węzłach chłonnych krezkowych) wykazały istotne zmiany w dystrybucji wspomnianych populacji komórek T w wyniku zabiegu chirurgicznego. Ponieważ największe zmiany w dystrybucji limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ obserwowano w 3 dniu od zabiegu, może to

sugerować, iż wahania poziomu poszczególnych populacji komórek T mogą być wynikiem ich migracji, w czym istotną rolę odgrywają molekuły adhezyjne. W związku z tym postanowiono dokonać oceny ekspresji cząsteczek adhezyjnych należących do rodziny selektyn CD62L (L-selektyna), rodziny integryn: CD11a (LFA-1) oraz CD49d (VLA-4 / $\alpha 4\beta 7$), a także nadrodziny immunoglobulin: CD54 (ICAM-1) na powierzchni komórek $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ u myszy w 3 dni po gastrektomii i laparotomii. Wartości grup badanych odnoszono do wartości kontrolnej (poziom ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach T myszy naiwnych, który przyjęto za 100%). Uzyskane wyniki odpowiednio przedstawiono na Rycinie 5A oraz Rycinie 5B. Uzyskane w niniejszym eksperymencie wyniki pokazują, że zarówno zabieg gastrektomii (Rycina 5A), jak również laparotomia (Rycina 5B) prowadzą do zwiększenia ekspresji molekuł adhezyjnych na powierzchni limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$, a wzrost poziomu adhezyn jest proporcjonalny do stopnia urazu.

4.5. Zabieg operacyjny hamuje proliferację komórek uczulonych *in vitro*.

W niniejszym doświadczeniu podjęto próbę oceny wpływu zabiegu operacyjnego na odpowiedź komórkową *in vitro*. W tym celu myszy poddano zabiegowi gastrektomii oraz laparotomii, a po trzech dniach uczulono aktywnie 5% roztworem PCI. Dodatkowo analogicznie uczulono myszy, które nie poddano żadnemu zabiegowi (kontrola pozytywna). Następnie, cztery dni po immunizacji haptenem, od zwierząt badanych pobrano jałowo komórki węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych, zawierających komórki efektorowe (Tef). Otrzymane komórki inkubowano z kolejnymi rozcieńczeniami roztworu TNP-Ig przez 48 godz., a następnie hodowano w obecności [³H]-tymidyny przez kolejne 18 godz. Wyniki przedstawione na Rycinie 6 pokazują, że zarówno zabieg gastrektomii (Grupa B), jak również laparotomia (Grupa C) prowadzą do statystycznie znamiennego zahamowania odpowiedzi proliferacyjnej *in vitro*, co wskazuje na to, że uraz towarzyszący przecięciu powłok skórnych wywiera efekt supresyjny na odpowiedź komórkową badanych zwierząt.

4.6. Komórki z węzłów chłonnych krezkowych myszy poddanych gastrektomii są odpowiedzialne za zahamowanie proliferacji komórek uczulonych.

Wyniki uzyskane w poprzednim doświadczeniu wykazały, że uraz, jakim jest zabieg chirurgiczny, wpływa hamująco na odpowiedź komórkową testowaną *in vitro*. Jednakże użyty model pozwolił jedynie na zbadanie wpływu urazu na mechanizmy obronne w narządach chłonnych na obwodzie (węzły chłonne pachowe i pachwinowe), podczas gdy istotne zmiany w dystrybucji komórek T $\alpha\beta$ i T $\gamma\delta$ obserwowano głównie w narządach chłonnych jamy brzusznej (węzły chłonne krezkowe i kępkę Peyera) oraz we krwi obwodowej. W celu sprawdzenia, czy zabieg operacyjny wpływa na mechanizmy obronne w obrębie tkanki chłonnej drenującej przewód pokarmowy posłużono się następującym modelem doświadczalnym. W niniejszym doświadczeniu hodowano limfocyty uczulone (Tef), pobrane od zwierząt immunizowanych 4 dni wcześniej PCL, w obecności TNP-Ig, wraz z komórkami węzłów chłonnych krezkowych wyizolowanych od myszy poddanych 3 dni wcześniej zabiegowi gastrektomii (Grupa B) lub laparotomii (Grupa C). Przed użyciem komórki węzłów chłonnych krezkowych traktowano mitomycyną C. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki uczulone, hodowane bez komórek węzłów chłonnych krezkowych (grupa A). Komórki wszystkich grup badanych hodowano w roztworze RPMI 1640 zawierającym [³H]-tymidynę i testowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody” (3.10). Wyniki przedstawione na Rycinie 7 wskazują, że silny uraz, jakim jest zabieg gastrektomii, prowadzi do indukcji komórek regulacyjnych w węzłach chłonnych krezkowych, które wywierają działanie supresyjne na odpowiedź komórkową *in vitro* (Grupa B vs. Grupa A). Natomiast komórki węzłów chłonnych krezkowych pochodzące od myszy poddanych laparotomii nie wywierały istotnego wpływu na proliferację komórek uczulonych *in vitro* (Grupa C vs. Grupa A). Dodatkowo w innych doświadczeniach wykazano, że dodanie do komórek uczulonych limfocytów pobranych z węzłów chłonnych krezkowych pochodzących od myszy nieoperowanych nie wpływało na wielkość odpowiedzi immunologicznej (dane nie zostały uwzględnione w niniejszej pracy).

4.7. Komórki odpowiedzialne za supresję proliferacji komórek uczulonych *in vitro* należą do populacji limfocytów $T\gamma\delta^+$.

W kolejnym doświadczeniu podjęto próbę określenia fenotypu komórek regulacyjnych, które odpowiadają za supresję odpowiedzi komórkowej *in vitro*. W tym celu komórki regulacyjne, pochodzące od zwierząt poddanych gastrektomii i otrzymane w sposób analogiczny jak w poprzednim doświadczeniu, inkubowano najpierw z przeciwciałami monoklonalnymi anti-TCR β (H57-597) lub anti-TCR δ (UC7-135 D5), a następnie z dopełniaczem króliczym. W ten sposób otrzymano dwie populacje komórek T: $T\gamma\delta^-$ (TCR $\alpha\beta^+$) (Grupa C) oraz $T\alpha\beta^-$ (TCR $\gamma\delta^+$) (Grupa D), w których obecności hodowano komórki uczulone wraz z antygenem, zgodnie z procedurą opisaną w paragrafie „Materiały i metody” (3.10). Kontrolę supresji stanowiły komórki uczulone inkubowane z komórkami węzłów chłonnych krezkowych myszy operowanych traktowanych przed hodowlą samym medium i RC' (Grupa B), podczas gdy same komórki uczulone (Tef) traktowano jako kontrolę pozytywną (Grupa A). Dla zahamowania proliferacji komórek regulacyjnych komórki węzłów chłonnych krezkowych inkubowano przed hodowlą w obecności mitomycyny C. Wyniki przedstawione na Rycinie 8 wskazują, że komórki T TCR $\gamma\delta^+$ wyizolowane z węzłów chłonnych krezkowych myszy poddanych 3 dni wcześniej zabiegowi gastrektomii posiadają zdolność do hamowania proliferacji komórek uczulonych *in vitro* (Grupa D vs. Grupa A). Ponadto Rycina 8 pokazuje, że populacja komórek T TCR $\alpha\beta^+$ węzłów chłonnych krezkowych myszy operowanych nie posiada zdolności do hamowania proliferacji *in vitro* (Grupa C vs. Grupa A).

4.8. Komórki $T\gamma\delta^+$ pochodzące z węzłów chłonnych krezkowych myszy operowanych hamują odpowiedź komórkową *in vitro* za pośrednictwem TGF- β .

Wcześniej przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że wzrostowi odsetka komórek $T\gamma\delta$ w węzłach chłonnych krezkowych myszy gastrektomizowanych towarzyszy pojawienie się zdolności komórek węzłów chłonnych krezkowych do hamowania odpowiedzi komórkowej *in vitro*. Dokładne fenotypowanie wspomnianej

komórki supresyjnej odpowiedzialnej za wyżej wspomniane zjawisko wykazało, że należy ona do populacji limfocytów $T\gamma\delta$. W niniejszym doświadczeniu podjęto próbę określenia mechanizmu działania komórek supresyjnych $T\gamma\delta^+$ obecnych w węzłach chłonnych krezkowych myszy poddanych zabiegowi gastrektomii.

W celu określenia mechanizmu, poprzez jaki komórki Tr indukowane w węzłach krezkowych w wyniku zabiegu operacyjnego hamują odpowiedź komórkową, posłużono się testem zahamowania proliferacji komórek uczulonych hodowanych z komórkami regulacyjnymi w obecności przeciwciał neutralizujących wybrane cytokiny. Komórki $T\gamma\delta^+$ ($T\alpha\beta^-$) węzłów chłonnych krezkowych myszy poddanych 3 dni wcześniej gastrektomii hodowano, po uprzednim traktowaniu mitomycyną C, z komórkami uczulonymi węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych, w obecności kolejnych rozcieńczeń TNP-Ig. W niektórych grupach badanych zawierających mieszaninę komórek uczulonych i komórek regulacyjnych T $TCR\gamma\delta^+$ ($T\alpha\beta^-$) dodawano mAb neutralizujące odpowiednie cytokiny: IL-4 (Grupa D), IL-10 (Grupa E) lub TGF- β (Grupa F). Jako kontrolę supresji stosowano komórki Tr (traktowane jedynie RC⁺) (Grupa B) oraz komórki T $TCR\gamma\delta^+$ (bez dodatku mAb neutralizujących cytokiny) (Grupa C) hodowane wraz z komórkami uczulonymi w obecności antygeny. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki uczulone hodowane z samym antygenem (Grupa A). Wyniki przedstawione na Rycinie 9 pokazują, że limfocyty $T\gamma\delta^+$ węzłów chłonnych krezkowych myszy poddanych uprzednio gastrektomii wywierają swój efekt supresyjny za pośrednictwem uwalnianego TGF- β (Grupa F), gdyż neutralizacja tej cytokiny przywracała zdolność do proliferacji komórkom uczulonym *in vitro*. Natomiast pozostałe dwie z testowanych cytokin przeciwzapalnych, tj. IL-4 oraz IL-10, wydają się nie odgrywać istotnej roli w powstającej w wyniku masywnego zabiegu operacyjnego supresji odpowiedzi komórkowej.

5. Dyskusja

Wszelkiego rodzaju urazy, takie jak np. oparzenia czy urazy mechaniczne, mogą zaburzać odpowiedź immunologiczną. Planowany zabieg operacyjny stanowi jedynie odmianę urazu. Charakteryzuje się tym, że traumatyzacja tkanek jest możliwie niewielka, a chory przebywa w warunkach dla niego optymalnych. Jednocześnie kontaminacja bakteryjna jest ograniczona do minimum. Sam zabieg wykonywany jest w warunkach sterylnych, z użyciem technik aseptycznych i antyseptycznych, a całość postępowania koncentruje się na zminimalizowaniu stopnia urazu i wyeliminowaniu pooperacyjnego zmniejszenia odporności. Liczne badania kliniczne wskazują jednak na zaburzenia mechanizmów obronnych towarzyszące zabiegowi chirurgicznemu, które mogą prowadzić do zwiększonej wrażliwości pacjentów na infekcje, a w szczególnych przypadkach do rozwoju wstrząsu septycznego i/lub zespołu niewydolności wielonarządowej (MODS) (12, 131). Zaburzenia te związane są z jednej strony z rozwojem zespołu uogólnionej odpowiedzi zapalnej (SIRS), z drugiej zaś z pojawieniem się symptomów kompensacyjnego zespołu odpowiedzi przeciwzapalnej (CARS) (132, 133).

Modelem urazu, którym posłużono się w niniejszej pracy, było częściowe usunięcie żołądka u myszy. Uprzednie badania doświadczalne wykonane w oparciu o ten model zabiegu operacyjnego wykazały zahamowanie odpowiedzi komórkowej oraz zwiększenie pierwotnej odpowiedzi humoralnej u zwierząt poddanych gastrektomii. Największe zmiany w przebiegu obu typów odpowiedzi immunologicznej obserwowano w 2 i 3 dniu po zabiegu, przy czym zmiany te ustępowały w 5 dobie po zabiegu, a powrót wszystkich badanych parametrów do wartości kontrolnych następował w 10 dniu po gastrektomii. Jednocześnie w przypadku zastosowanego modelu urazu nie wykazano wpływu użytego znieczulenia na przebieg odpowiedzi immunologicznej (54, 134).

Wyniki prezentowane w mojej pracy wskazują na wyraźne zmiany rozmieszczenia limfocytów T w następstwie zabiegu operacyjnego. Zaobserwowane zmiany nie miały charakteru trwałego, a maksimum ich natężenia przypadało na 3 dzień po operacji. Wówczas w przypadku limfocytów $T\alpha\beta$ zaobserwowano znaczący spadek odsetka tych komórek w węzłach krezkowych i w kępkach Peyera, a także w krwi obwodowej, który w porównaniu do wartości kontrolnych wynosił odpowiednio 55, 71 i 45% (Rycina 2). Ponieważ jedną

z możliwych przyczyn zmniejszenia się odsetka badanych komórek w wymienionych tkankach mogła być ich ukierunkowana wędrówka do węzłów chłonnych obwodowych lub śledziony, to w kolejnym doświadczeniu podjęto próbę oceny ich liczby we wspomnianych narządach. W efekcie nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w dystrybucji komórek $T\alpha\beta$, ani w węzłach chłonnych obwodowych (pachowych i pachwinowych), ani w śledzionie (Rycina 4B). Możliwe więc, że redystrybucja limfocytów $T\alpha\beta$ była związana z wędrówką tych komórek do tkanek obwodowych. Istnieją bowiem liczne dane wskazujące na udział limfocytów $T\alpha\beta$ w procesie gojenia ran i odbudowy uszkodzonych tkanek (135). Ponadto w szeregu doświadczeń wykazano, że dziewicze limfocyty $T\alpha\beta$ wkrótce po urazie ulegają aktywacji i jako komórki efektorowe migrują do tkanek, w których toczy się reakcja zapalna. W przypadku urazów różnego rodzaju, zatem także w wyniku zabiegu operacyjnego, aktywacja limfocytów $T\alpha\beta$ związana może być z pojawianiem się wskutek urazu antygenów własnych ustroju (np. pochodzących z uszkodzonych lub nekrotycznych komórek) lub superantygenów (bakterie) (136, 137).

Z kolei w przypadku limfocytów $T\gamma\delta$ zmiany w rozmieszczeniu tej populacji komórek miały odmienny charakter. Zarówno w kępkach Peyera, jak i w węzłach chłonnych krezkowych, a także w węzłach chłonnych obwodowych (pachowych i pachwinowych) zaobserwowano znaczący wzrost odsetka komórek $T\gamma\delta$, przy czym, podobnie jak w przypadku limfocytów $T\alpha\beta$, maksimum zmian stwierdzono w 3 dniu po zabiegu. Wzrostowi odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ w narządach limfatycznych towarzyszył wyraźny spadek ich odsetka w krwi obwodowej, który obserwowano od 1 do 7 dnia po resekcji żołądka (Rycina 3). Prawdopodobne przyczyny oraz możliwe znaczenie funkcjonalne obserwowanych zmian w rozmieszczeniu limfocytów $T\gamma\delta$ zostaną omówione w dalszej części dyskusji.

W przypadku obu badanych populacji komórek zmiany w ich rozmieszczeniu nie miały charakteru trwałego, a powrót do wartości wyjściowych następował od 7 dnia po operacji. Charakter obserwowanych zmian w recyrkulacji obu populacji limfocytów T, a także stopień ich nasilenia wyraźnie korelował z siłą i charakterem przebytego urazu. Tezę tę potwierdza fakt, że w przeciwieństwie do gastrektomii zabieg kontrolny (laparotomia) nie wywierał wpływu na rozmieszczenie limfocytów $T\gamma\delta$ oraz $T\alpha\beta$, ani w badanych narządach limfatycznych, ani we krwi obwodowej we wszystkich badanych punktach czasowych. Jedynym wyjątkiem był

niewielki wzrost odsetka limfocytów $T\alpha\beta$, który zaobserwowano w kępkach Peyera w 3 dniu po laparotomii.

Właściwa recyrkulacja komórek układu odpornościowego, a w efekcie ich prawidłowa dystrybucja w obrębie różnych tkanek organizmu, ma kluczowe znaczenie dla efektywnego funkcjonowania całego układu immunologicznego. Zgodnie z powszechnie przyjętym modelem opisującym krążenie komórek układu immunologicznego istotne znaczenie w regulacji tego procesu odgrywają molekuly adhezyjne obecne na powierzchni wędrujących komórek (receptory zasiedlania) oraz ich ligandy na powierzchni śródbłonnków naczyń krwionośnych (adresyny naczyniowe) (138, 121). Ekspresja i zanikanie molekuł adhezyjnych na powierzchni limfocytów T dziewiczych, limfocytów T efektorowych oraz limfocytów T pamięci pozwoliły na zdefiniowanie modelu migracji wspomnianych subpopulacji komórek, który jako pierwszy zaproponował Charles Mackay (139, 140). Zgodnie z tym modelem recyrkulacja limfocytów T dziewiczych ograniczona jest do układu krwionośnego oraz do narządów limfatycznych. Komórki te pozbawione są zatem zdolności do 'patrowania' tkanek obwodowych. Natomiast limfocyty T efektorowe/ T pamięci, które uległy aktywacji w narządach limfatycznych, po opuszczeniu tych narządów wracają do krążenia i uzyskują zdolność migracji także do obwodowych tkanek nielimfatycznych (takich jak np. skóra, przełyk, płuca) również wtedy, gdy w tkance obwodowej nie toczy się proces zapalny (138). Warto jednak nadmienić, że istnieje szereg doniesień opartych na badaniach migracji komórek układu immunologicznego *in vivo*, które wskazują na odstępstwa od opisanego modelu (141, 142). Jednym z przykładów złamania 'zasad' recyrkulacji obowiązujących limfocyty T dziewicze może być stwierdzenie u szczurów obecności tych komórek w takich narządach, jak wątroba czy płuca (143). Co istotne, w przytoczonym przykładzie wykazano także, że kinetyka zasiedlania wspomnianych tkanek, a także ilość penetrujących je komórek dziewiczych, zbliżona była do wartości, które obserwowano w przypadku limfocytów T pamięci (143).

Wykazane przeze mnie zmiany w rozmieszczeniu limfocytów T w następstwie urazu mogą być efektem migracji badanych komórek. W kolejnych doświadczeniach podjęto zatem próbę określenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ pochodzących z węzłów chłonnych krezkowych. Materiał badany pobierano od myszy w 3 dniu po zabiegu operacyjnym, a więc w tym punkcie czasowym, w którym obserwowane zmiany w rozmieszczeniu komórek były największe. Wyniki uzyskane dla wszystkich

czterech wybranych cząsteczek adhezyjnych, tj. dla CD62L (L selektyna), CD49d (VLA-4 / $\alpha 4\beta 7$), CD11a (LFA-1) oraz CD54 (ICAM-1), wskazują na zwiększoną ekspresję tych molekuł na powierzchni limfocytów $T\alpha\beta$ oraz $T\gamma\delta$, zarówno w następstwie zabiegu gastrektomii, jak i w wyniku przeprowadzenia zabiegu kontrolnego (Rycina 5A i 5B). Nasilenie ekspresji wszystkich badanych molekuł adhezyjnych na powierzchni obu populacji komórek było proporcjonalne do charakteru, lokalizacji i siły urazu. Ocena ekspresji cząsteczek adhezyjnych pozwoliła także na stwierdzenie, że pośród drenujących węzły krezkowe limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ były nie tylko komórki dziewicze, które na swojej powierzchni posiadają L-selektynę, ale także limfocyty T, które uległy aktywacji. Świadczy o tym pojawienie się na powierzchni obu badanych populacji komórek cząsteczek CD49d (VLA-4 / $\alpha 4\beta 7$), CD11a (LFA-1) oraz CD54 (ICAM-1).

Jak wspomniano uprzednio, uważa się, że szlaki wędrówki limfocytów T dziewiczych oraz T efektorowych w organizmie charakteryzuje odmienny przebieg, a istotą tej różnicy jest zdolność tych ostatnich do „patrolowania” tkanek obwodowych. Przyjmuje się, że migracja komórek efektorowych jest procesem ukierunkowanym. Aktywowane w określonym węzle limfatycznym limfocyty T migrują po powrocie do recyrkulacji poprzez tkanki drenowane przez chłonkę należącą do tej części układu limfatycznego, w której nastąpiła ich aktywacja. Akumulacja komórek immunologicznych w obrębie poszczególnych tkanek lub narządów, będąca konsekwencją procesu recyrkulacji tych komórek w organizmie, może mieć kilka przyczyn. W przypadku akumulacji limfocytów w obwodowych węzłach limfatycznych można wskazać na trzy możliwe przyczyny tego zjawiska. Po pierwsze, może być ono wynikiem preferencyjnego zasiedlania tkanek przez określone komórki. W procesie tym nadrzędną rolę odgrywałyby odpowiednie cząsteczki adhezyjne, a także inne czynniki o działaniu chemotaktycznym (np. chemokiny). Po drugie, może być skutkiem zwiększonego tempa proliferacji komórek w węzle i/lub zmniejszonego tempa apoptozy komórek. I wreszcie może być spowodowane wystąpieniem obu wymienionych wcześniej czynników równocześnie.

Na podstawie wyników licznych badań doświadczalnych związanych z mechanizmem recyrkulacji limfocytów T *in vivo* wydaje się, że można obecnie stwierdzić, iż główną przyczyną akumulacji limfocytów T w narządach limfatycznych nie jest preferencyjne zasiedlanie tych narządów przez wspomniane komórki (144). Istnieje szereg doniesień, które pozwalają sądzić, że zasadnicze znaczenie

w procesie akumulacji komórek w tkankach lub narządach limfatycznych odgrywa proces proliferacji komórek, a także tempo ich apoptozy w danej tkance (145, 146). I tak, u wszystkich dotychczas badanych zwierząt (mysz, szczur, świnia, owca) wykazano, że limfocyty T, które uległy aktywacji w węzłach chłonnych krezkowych, po powrocie do krążenia zasiedlały wprawdzie różne narządy limfatyczne, jednak ostatecznie ich akumulację obserwowano w węzłach krezkowych oraz w innych narządach limfatycznych związanych z układem pokarmowym (kępki Peyera, lamina propria). Przyczyną akumulacji wspomnianych komórek była ich proliferacja w obrębie badanych narządów limfatycznych (147, 148). Na odpowiednią dystrybucję poszczególnych subpopulacji limfocytów T w tkankach istotny wpływ wydaje się zatem wywierać mikrośrodowisko tkanek, które poprzez wzajemne interakcje migrujących komórek oraz obecność komórek regulacyjnych i uwolnionych mediatorów (cytokiny, chemokiny) determinuje także przebieg, charakter, zakres i czas trwania odpowiedzi immunologicznej.

W tym świetle szczególnego znaczenia nabierają uzyskane przeze mnie wyniki wskazujące na istotne zmiany rozmieszczenia limfocytów $T\alpha\beta$, a przede wszystkim limfocytów $T\gamma\delta$ w obrębie narządów limfatycznych jamy brzusznej w następstwie zabiegu operacyjnego. Jak wspomniano wcześniej, obserwowany w 3 dniu po urazie spadek odsetka limfocytów $T\alpha\beta$, zarówno w badanych narządach limfatycznych, jak i we krwi obwodowej, może być związany z aktywacją części tych komórek i związaną z tym ich wędrówką do tkanek obwodowych. Aktywowane limfocyty $T\alpha\beta$ dzięki posiadanym na swojej powierzchni cząsteczkom adhezyjnym oraz uwalnianym cytokinom mogą indukować niespecyficzną proliferację sąsiednich komórek, przyczyniając się do rozwoju reakcji zapalnej (145). Wydaje się więc, że dystrybucja takich potencjalnie groźnych komórek w obrębie ustroju powinna podlegać szczególnym mechanizmom kontrolnym, pośród których procesy regulujące proliferację i apoptozę komórek mają znaczenie pierwszorzędne. Wzrost odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ we wszystkich badanych narządach limfatycznych, zarówno tych związanych z przewodem pokarmowym (węzły limfatyczne krezkowe, kępki Peyera), jak i w tkankach limfatycznych obwodowych (węzły limfatyczne pachowe i pachwinowe), w 3 dniu po zabiegu operacyjnym może być związany z funkcją immunoregulacyjną tych komórek. W celu potwierdzenia tej hipotezy oraz określenia możliwego znaczenia

funkcjonalnego zmian w rozmieszczeniu limfocytów $T\gamma\delta$ w następstwie zabiegu operacyjnego wykonano serię kolejnych doświadczeń.

Jak już wcześniej wspomniano, różnego rodzaju urazy, w tym zabieg operacyjny, związane są ze stanem immunosupresji, którego jednym z objawów jest osłabiony poziom odpowiedzi komórkowej (134). W kolejnym doświadczeniu podjęto próbę oceny wpływu zabiegu operacyjnego na odpowiedź komórkową *in vitro* i wykazano, że zarówno zabieg gastrektomii, jak również laparotomia prowadzą do zahamowania proliferacji komórek uczulonych *in vitro* (Rycina 6). Należy podkreślić, że wykorzystany model doświadczalny pozwolił na określenie wpływu urazu na odpowiedź immunologiczną w obwodowych narządach chłonnych, tj. w węzłach chłonnych pachowych i pachwinowych. Z kolei uzyskane wcześniej wyniki wskazują na istotne zmiany w rozmieszczeniu limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ w następstwie zabiegu operacyjnego przede wszystkim w narządach chłonnych jamy brzusznej, tj. w węzłach chłonnych krezkowych i w kępkach Peyera, oraz we krwi obwodowej.

W dalszym etapie badań podjęto zatem próbę znalezienia odpowiedzi na pytanie, czy zabieg operacyjny wywiera wpływ na mechanizmy obronne w obrębie narządów limfatycznych związanych z przewodem pokarmowym. W tym celu limfocyty efektorowe pochodzące od zwierząt immunizowanych hodowano z komórkami pochodzącymi z węzłów chłonnych krezkowych wyizolowanych od myszy poddanych uprzednio zabiegowi gastrektomii lub laparotomii. Uzyskane w ten sposób wyniki (Rycina 7) pozwalają na stwierdzenie, że u zwierząt poddanych operacji częściowej resekcji żołądka na skutek przeprowadzonego zabiegu doszło do indukcji komórek regulacyjnych w węzłach chłonnych krezkowych. Komórki regulacyjne wywierały działanie supresyjne na odpowiedź komórkową *in vitro*. W przypadku zwierząt poddanych zabiegowi laparotomii nie stwierdzono pojawienia się komórek regulacyjnych w węzłach krezkowych.

W celu określenia fenotypu komórek regulacyjnych indukowanych w następstwie zabiegu operacyjnego wykonano kolejne doświadczenie. Komórki regulacyjne pochodzące z węzłów chłonnych krezkowych od myszy poddanych gastrektomii inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi anti-TCR β (H57-597) lub anti-TCR δ (UC7-135 D5), a następnie z dopełniaczem króliczym. Uzyskane w ten sposób dwie populacje komórek $T\alpha\beta^- (T\gamma\delta^+)$ oraz $T\gamma\delta^- (T\alpha\beta^+)$ hodowano następnie z komórkami efektorowymi pochodzącymi od uczulonych uprzednio

myszy. Otrzymane w ten sposób wyniki (Rycina 8) pozwalają stwierdzić, że komórkami, które posiadają zdolność do hamowania proliferacji komórek uczulonych *in vitro*, była populacja limfocytów $T\gamma\delta^+$ wyizolowana z węzłów chłonnych krezkowych myszy poddanych 3 dni wcześniej zabiegowi gastrektomii. W przypadku drugiej badanej populacji komórek, tj. limfocytów $T\alpha\beta^+$, nie stwierdzono zahamowania proliferacji komórek efektorowych *in vitro*.

Rola komórek immunoregulacyjnych, którą pełnią limfocyty $T\gamma\delta$ w odpowiedzi immunologicznej, była postulowana przez wielu autorów (102). Potwierdzają ją liczne badania doświadczalne wskazujące na zaburzenia odpowiedzi immunologicznej z udziałem limfocytów $T\alpha\beta$ u defektywnych szczepów myszy $T\gamma\delta^{-/-}$ (149, 107, 150). Mechanizm, poprzez który limfocyty $T\gamma\delta$ pełnią funkcję immunoregulacyjną, nie został dotychczas precyzyjnie zdefiniowany (102). Wydaje się jednak, że podobnie jak komórki regulacyjne należące do populacji limfocytów $T\alpha\beta$, także limfocyty $T\gamma\delta$ mogą wpływać na przebieg odpowiedzi immunologicznej poprzez sekrecję cytokin przeciwzapalnych. Potwierdzają to wyniki badań wykorzystujących model reakcji nadwrażliwości kontaktowej *in vivo* oraz *in vitro*, w których indukowane komórki $T\gamma\delta$ o aktywności supresyjnej hamowały aktywność komórek efektorowych nadwrażliwości kontaktowej za pośrednictwem uwalnianej IL-4 (118).

W dalszej części badań podjęto próbę określenia mechanizmu, poprzez jaki limfocyty $T\gamma\delta$ pochodzące z węzłów krezkowych myszy poddanych zabiegowi operacyjnemu hamują odpowiedź komórkową. W tym celu indukowane wskutek urazu komórki regulacyjne (limfocyty $T\gamma\delta$) hodowano z komórkami efektorowymi pochodzącymi od myszy immunizowanych, w obecności mAb neutralizujących IL-4, IL-10 lub TGF- β . Uzyskane wyniki wykazały, że neutralizacja TGF- β znosi supresję wywieraną przez limfocyty $T\gamma\delta$, natomiast neutralizacja pozostałych dwóch cytokin przeciwzapalnych, tj. IL-4 oraz IL-10, nie wywierała żadnego efektu (Rycina 9). TGF- β jest czynnikiem o plejotropowym działaniu, posiadającym zdolność modyfikacji procesów związanych z recyrkulacją limfocytów T (tj. z zasiedlaniem tkanek, adhezją komórek, chemotaksją), a także aktywacją limfocytów T, ich różnicowaniem oraz apoptozą (151, 152). Wyniki licznych badań, w których wykorzystano defektywne szczepy myszy, których limfocyty T pozbawiono funkcjonalnego receptora typu II dla TGF- β , wskazują na szczególną rolę, którą odgrywa ten czynnik w utrzymaniu homeostazy limfocytów T.

We wspomnianych doświadczeniach zmienione genetycznie limfocyty T ulegały spontanicznej aktywacji, w wyniku której dochodziło do wieloogniskowego procesu zapalnego (153). Istnieje także szereg doniesień wskazujących na hamujący wpływ TGF- β na proliferację limfocytów T w warunkach odpowiedzi na uraz (154).

Wyniki wcześniejszych badań klinicznych i doświadczalnych dotyczących pourazowej supresji odpowiedzi komórkowej wskazują na szereg możliwych mechanizmów prowadzących do wystąpienia tego zjawiska. Pierwsze doniesienie wskazujące na zaburzenia odpowiedzi komórkowej u chorych po ciężkich urazach pojawiło się niemal 60 lat temu (155). Obecnie wydaje się, że prawdopodobnie najważniejszą przyczyną zahamowania odpowiedzi komórkowej po urazie jest przesunięcie równowagi Th1/Th2 w kierunku komórek i cytokin typu Th2. Stan immunosupresji pourazowej jest wynikiem wielu wzajemnie na siebie oddziałujących procesów, w które zaangażowane są szczególnie ważne systemy organizmu, takie jak układ immunologiczny oraz neurohormonalny. Obserwowane przeze mnie zmiany w rozmieszczeniu subpopulacji limfocytów T $\gamma\delta$ oraz T $\alpha\beta$ z jednej strony spowodowane są bezpośrednio wystąpieniem urazu, z drugiej zaś stanowią istotną komponentę toczącej się reakcji będącej odpowiedzią na ów uraz. Wydaje się, że ważną rolę immunoregulacyjną w procesie pourazowego zahamowania odpowiedzi komórkowej odgrywają limfocyty T $\gamma\delta$.

Podsumowując, wyniki moich badań pozwalają stwierdzić, że w następstwie zabiegu chirurgicznego zachodzą zmiany w rozmieszczeniu limfocytów T, którym towarzyszy znaczny wzrost odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ w tkance limfatycznej drenującej przewód pokarmowy. Wspomniana populacja komórek T $\gamma\delta$, pojawiająca się w ciągu pierwszych kilku dni od zabiegu operacyjnego, hamuje odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem wydzielanego TGF- β , nie wykazując przy tym swoistości antygenowej. Mechanizm antygenowo nieswoistej supresji mediowanej przez limfocyty T $\gamma\delta$ może odgrywać istotną rolę w hamowaniu odpowiedzi na autoantygeny uwalniane w znacznej ilości w trakcie uszkodzenia tkanek na skutek urazu. Jednocześnie warto podkreślić, że istniejąca supresja jest krótkotrwała i po niedopuszczeniu do wystąpienia odpowiedzi na autoantygeny pozwala w razie potrzeby na indukcję odpowiedzi immunologicznej na antygeny drobnoustrojów wnikających przez wrota zakażenia, jakimi są uszkodzone w trakcie urazu tkanki.

6. Wnioski

- 1) Zabieg gastrektomii prowadzi do zmian w rozmieszczeniu limfocytów $T\gamma\delta$ i $T\alpha\beta$ w badanych narządach chłonnych oraz we krwi obwodowej. Wspomniane zmiany dotyczą wzrostu odsetka limfocytów $T\gamma\delta$ w kępkach Peyera, węzłach chłonnych krezkowych oraz w węzłach chłonnych obwodowych (pachowych i pachwinowych), z maksimum zmian przypadającym na 3 dzień po zabiegu operacyjnym. Z kolei laparotomia nie wywiera istotnych zmian procentowych komórek $T\gamma\delta$ w badanych tkankach. Jednocześnie w 3 dniu po gastrektomii dochodzi do spadku odsetka komórek $T\alpha\beta$, zarówno w węzłach chłonnych krezkowych, jak i w kępkach Peyera, podczas gdy laparotomia wywiera nieznaczny wpływ na poziom komórek $T\alpha\beta$ w badanych narządach. Równocześnie zabieg częściowej resekcji żołądka prowadzi do spadku odsetka limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ we krwi obwodowej.
- 2) Zarówno zabieg gastrektomii, jak i sama laparotomia prowadzą do wzrostu ekspresji następujących molekuł adhezyjnych LFA-1, ICAM-1, L-selektyna oraz VLA-4 / $\alpha 4\beta 7$ na powierzchni limfocytów $T\alpha\beta$ oraz $T\gamma\delta$ węzłów chłonnych krezkowych. Obserwowany wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych związany jest z procesem recyrkulacji limfocytów T i jest proporcjonalny do siły urazu.
- 3) Częściowa resekcja żołądka, jak również laparotomia prowadzą do zahamowania proliferacji komórek węzłów chłonnych obwodowych *in vitro*, co sugeruje, że zabieg operacyjny prowadzi do uogólnionej immunosupresji na obwodzie.
- 4) Badania *in vitro* wykazały, że gastrektomia prowadzi do pojawienia się w węzłach chłonnych krezkowych komórek $T\gamma\delta$ supresyjnych, które nie wykazują swoistości antygenowej. Limfocyty $T\gamma\delta$ supresyjne powstające w wyniku zabiegu częściowej resekcji żołądka hamują odpowiedź komórkową *in vitro* za pośrednictwem uwalnianego TGF- β . Zdolności do hamowania odpowiedzi komórkowej *in vitro* nie posiadają natomiast limfocyty pochodzące z węzłów chłonnych krezkowych myszy poddanych laparotomii.

7. Ryciny

Rycina 1.

Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów $T\gamma\delta$ w kępkach Peyera i węzłach chłonnych krezkowych.

100 μ l zawiesiny komórek (5×10^5 komórek) pochodzących z węzłów chłonnych krezkowych oraz kępek Peyera, pobranych przed wykonaniem zabiegu operacyjnego (grupa kontrolna) oraz 1, 3, 7 i 14 dni po zabiegu operacyjnym, inkubowano przez 30 min. na lodzie z mAb anti-TCR δ znakowanymi fluoresceiną (FITC), zgodnie z procedurą opisana w rozdziale „Materiały i metody” (3.8). Następnie dokonano pomiaru przy pomocy cytometru przepływowego. Analizę dystrybucji komórek $T\gamma\delta$ przeprowadzono w kępkach Peyera [PP] (Grupa A) oraz węzłach chłonnych krezkowych [MLN] (Grupa B) u myszy poddanych zabiegowi gastrektomii, jak również w kępkach Peyera [PP] (Grupa C) oraz węzłach chłonnych krezkowych [MLN] (Grupa D) u myszy poddanych laparotomii. U wszystkich grup badanych kontrolę tła fluorescencji stanowiły komórki inkubowane jedynie w obecności buforu FACS. Wartość kontroli tła była każdorazowo odejmowana od otrzymanej wartości badanej. Wyniki przedstawiono jako wartości procentowe wartości kontrolnej, przyjmując zasadę, że otrzymana ilość pozytywnych komórek u myszy niepoddanych zabiegowi (dzień 0) równa jest 100%. W przypadku danych przedstawionych na Rycinie 1 100% odpowiada 1,9% komórek $T\gamma\delta+$ w kępkach Peyera oraz 2,7% komórek $T\gamma\delta+$ w węzłach chłonnych krezkowych. Znamienność statystyczna dla pomiaru w 1 dniu po zabiegu: Grupa B vs wartość kontrolna, $p < 0,05$; Grupa C vs wartość kontrolna, $p < 0,02$; dla pomiaru w 3 dni po zabiegu operacyjnym: Grupa A vs wartość kontrolna $p < 0,001$; Grupa B vs wartość kontrolna $p < 0,05$, Grupa A vs Grupa C, $p < 0,001$, Grupa B vs Grupa D, $p < 0,05$. W pozostałych punktach pomiarowych, tj. w 1, 7 i 14 dniu po zabiegu dla Grupy A vs wartość kontrolna oraz Grupa A vs Grupa C i Grupa B vs Grupa D, w 7 i 14 dniu dla Grupy B vs wartość kontrolna, a także w 3, 7 i 14 dniu dla Grupy C vs wartość kontrolna, jak również dla wszystkich punktów pomiarowych w przypadku Grupy D vs wartość kontrolna, brak znamienności statystycznej.

Rycina 2.**Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów $T\alpha\beta$ w kępkach Peyera i węzłach chłonnych krezkowych.**

Komórki węzłów chłonnych krezkowych oraz kępek Peyera, pobranych przed wykonaniem zabiegu operacyjnego (grupa kontrolna) oraz 1, 3, 7 i 14 dni po zabiegu operacyjnym, inkubowano przez 30 min. na lodzie z mAb anti-TCR β znakowanymi fluoresceiną (FITC), zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody” (3.8). Analizę badanego materiału prowadzono przy użyciu cytometru przepływowego. Ocenę dystrybucji komórek $T\alpha\beta$ przeprowadzono w kępkach Peyera (Grupa A) oraz węzłach chłonnych krezkowych (Grupa B) u myszy poddanych zabiegowi gastrektomii oraz w kępkach Peyera (Grupa C) oraz węzłach chłonnych krezkowych (Grupa D) u zwierząt poddanych laparotomii. Wyniki przedstawiono jako wartości procentowe wartości kontrolnej, przyjmując zasadę, że otrzymana ilość pozytywnych komórek u myszy niepoddanych zabiegowi (dzień 0) równa jest 100%. 100% wartości kontrolnej odpowiada na rycinie 38,4% komórek $T\alpha\beta+$ w kępkach Peyera oraz 56,7% komórek $T\alpha\beta+$ w węzłach chłonnych krezkowych. Znamienność statystyczna dla pomiarów wykonanych w 3 dniu po zabiegu operacyjnym wynosiła: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,05$, Grupa A vs Grupa C, $p < 0,001$; dla pomiarów w 7 dniu po zabiegu: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,05$; dla pomiarów w 1 i 14 dniu po zabiegu dla Grupy A vs wartość kontrolna, a także dla pomiarów w 7 i 14 dniu dla Grupa A vs Grupa C, oraz dla pomiarów wykonanych we wszystkich punktach pomiarowych dla Grupy B, C oraz D vs wartość kontrolna oraz Grupa B vs Grupa D brak znamienności statystycznej.

Rycina 3.**Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ we krwi obwodowej zwierząt operowanych.**

Od zwierząt poddanych zabiegowi gastrektomii (Grupy A i B), bądź laparotomii (Grupy C i D) pobrano krew obwodową w 1, 3, 7 oraz 14 dniu po zabiegu. Kontrolę stanowiła krew pobrana od zwierząt nieoperowanych. Limfocyty

krwi obwodowej otrzymano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale „Materiały i metody” (3.6). Komórki znakowano mAb anti-TCR β (Grupy A i C) oraz anti-TCR δ (Grupy B i D) i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody” (3.8). Wyniki przedstawiono jako wartości procentowe wartości kontrolnej (dzień 0), przyjmując zasadę, że otrzymana ilość pozytywnych komórek u myszy niepoddanych zabiegowi równa jest 100%. 100% wartości kontrolnej odpowiada 18,1% komórek T $\alpha\beta$ ⁺ oraz 6,7% komórek T $\gamma\delta$ ⁺. Znamienność statystyczna dla pomiarów wykonanych w 3 dniu po zabiegu: Grupa A vs Grupa C, $p < 0,01$; dla pomiaru w 7 dniu po zabiegu: Grupa A vs Grupa C, $p < 0,05$, Grupa B vs Grupa D, $p < 0,05$. Znamienność statystyczna dla pomiarów wykonanych w pozostałych punktach czasowych, tj. w 1 i 14 dniu dla: Grupa A vs Grupa C, oraz w 1,3 i 14 dniu dla: Grupa B vs Grupa D, a także dla pomiarów we wszystkich badanych punktach czasowych dla: Grupa A, B, C i D vs wartość kontrolna, brak znamienności statystycznej.

Rycina 4A.

Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów T $\gamma\delta$ w węzłach chłonnych obwodowych i śledzionie zwierząt operowanych.

W 3 dniu po zabiegu gastrektomii pobrano od myszy węzły chłonne pachowe i pachwinowe (Grupa A) oraz śledziony (Grupa B). Również w grupie myszy poddanych laparotomii izolowano węzły obwodowe (Grupa C) oraz śledziony (Grupa D) 3 dni po zabiegu. Zawiesinę komórek z węzłów chłonnych obwodowych oraz śledziony otrzymano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody” (3.7). Komórki znakowano mAb anti-TCR δ zgodnie z opisem do Ryciny 1. Grupę kontrolną stanowiły myszy nieoperowane. Otrzymane wyniki przedstawiono jako procent wartości kontrolnej, przy założeniu, że otrzymana wartość dla myszy nieoperowanych równa jest 100%. W przypadku danych przedstawionych na Ryc. 4 A 100% odpowiada 4,6% T $\gamma\delta$ ⁺ komórek w węzłach obwodowych oraz 4,7% T $\gamma\delta$ ⁺ komórek w śledzionie. Znamienność statystyczna: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,001$; Grupa C vs. Grupa A, $p < 0,001$, natomiast Grupa B, C i D vs wartość kontrolna oraz Grupa D vs. Grupa B – brak znamienności statystycznej.

Rycina 4B.**Wpływ zabiegu operacyjnego na dystrybucję limfocytów $T\alpha\beta$ w węzłach chłonnych obwodowych i śledzionie zwierząt operowanych.**

Komórki pochodzące z węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych oraz ze śledzion myszy gastrektomizowanych (Grupy A i B), bądź poddanych laparotomii (Grupy C i D), znakowano mAb anti-TCR β zgodnie z opisem zawartym w rozdziale „Materiały i metody” (3.8). Grupę kontrolną stanowiły myszy nieoperowane. Otrzymane wyniki przedstawiono jako procent wartości kontrolnej, przy założeniu, że otrzymana wartość dla myszy nieoperowanych równa jest 100%. W przypadku danych przedstawionych na Rycinie 4B 100% odpowiada 83,8% komórek $T\alpha\beta+$ w węzłach chłonnych obwodowych oraz 39,1% komórek $T\alpha\beta+$ w śledzionie. W niniejszym eksperymencie nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy grupami badanymi oraz wartością kontrolną, a także w obrębie grup badanych, odpowiednio Grupa A, B, C i D vs wartość kontrolna, oraz Grupa C vs Grupa A, a także Grupa D vs Grupa B – brak znamienności statystycznej.

Rycina 5A.**Analiza ekspresji molekuł adhezyjnych na komórkach $T\alpha\beta+$ pochodzących z węzłów chłonnych krezkowych.**

W trzecim dniu po wykonaniu zabiegu od myszy poddanych gastrektomii (grupa A) oraz laparotomii (grupa B) pobrano węzły chłonne krezkowe i przygotowano zawiesiny komórek tak, jak opisano w rozdziale „Materiały i metody” (3.7). 5×10^5 komórek inkubowano jednocześnie z dwoma przeciwciałami monoklonalnymi (znakowanie podwójne), z których jedno sprzężone było z fluoresceiną (FITC), a drugie z fikoerytryną (PE). Rycina 5A przedstawia ekspresję molekuł adhezyjnych: CD62L, CD49d, ICAM-1 i LFA-1 na powierzchni komórek $T\alpha\beta+$. Otrzymane wyniki przedstawiono jako procent wartości kontrolnej, przy założeniu, że otrzymana wartość dla myszy nieoperowanych równa jest 100%. Znamienność statystyczną dla cząsteczki CD62L: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,02$; Grupa B vs wartość kontrolna, brak znamienności; Grupa A vs Grupa B,

$p < 0,05$; dla cząsteczki CD49d: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,001$; Grupa B vs wartość kontrolna, $p < 0,001$; Grupa A vs Grupa B, brak znamienności; dla cząsteczki ICAM-1: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,01$; Grupa B vs wartość kontrolna, $p < 0,05$; Grupa A vs Grupa B, brak znamienności; dla cząsteczki LFA-1: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,001$; Grupa B vs wartość kontrolna, $p < 0,001$; Grupa A vs Grupa B, brak znamienności.

Rycina 5B.

Analiza ekspresji molekuł adhezyjnych na komórkach $T\gamma\delta^+$ pochodzących z węzłów chłonnych krezkowych.

W trzecim dniu po wykonaniu zabiegu od myszy poddanych gastrektomii (grupa A) oraz laparotomii (grupa B) pobrano węzły chłonne krezkowe i przygotowano zawiesiny komórek, zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale „Materiały i metody” (3.7). 5×10^5 komórek inkubowano jednocześnie z dwoma przeciwciałami monoklonalnymi (znakowanie podwójne), z których jedno sprzężone było z fluoresceiną (FITC), a drugie z fikoerytryną (PE). Rycina 5B przedstawia ekspresję cząsteczek adhezyjnych CD62L, CD49d, ICAM-1 i LFA-1 na powierzchni komórek $T\gamma\delta^+$. Otrzymane wyniki przedstawiono jako procent wartości kontrolnej, przy założeniu, że otrzymana wartość dla myszy nieoperowanych równa jest 100%. Znamienność statystyczną dla cząsteczki CD62L: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,001$; Grupa B vs wartość kontrolna, $p < 0,001$; Grupa A vs Grupa B, $p < 0,01$; dla cząsteczki CD49d: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,01$; Grupa B vs wartość kontrolna, $p < 0,01$; Grupa A vs Grupa B, brak znamienności; dla cząsteczki ICAM-1: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,01$; Grupa B vs wartość kontrolna, brak znamienności; Grupa A vs Grupa B, $p < 0,01$; dla cząsteczki LFA-1: Grupa A vs wartość kontrolna, $p < 0,01$; Grupa B vs wartość kontrolna, $p < 0,01$; Grupa A vs Grupa B, brak znamienności.

Rycina 6.**Wpływ zabiegu operacyjnego na proliferację komórek uczulonych *in vitro*.**

Myszy poddane gastrektomii (Grupa B) lub laparotomii (Grupa C) uczulono 5% roztworem PCL w mieszaninie acetonu i etanolu (w stosunku 1:3) w trzecim dniu po zabiegu. W analogiczny sposób uczulono myszy, które nie poddano żadnemu zabiegowi [kontrola pozytywna (Grupa A)]. Cztery dni później pobrano jałowo węzły chłonne pachowe i pachwinowe badanych myszy. 3×10^5 komórek węzłów chłonnych inkubowano z kolejnymi 3-krotnymi rozcieńczeniami roztworu TNP-Ig, poczynając od stężenia 300 $\mu\text{g/ml}$, a następnie hodowano w obecności [^3H]- tymidyny tak jak opisano w rozdziale „Materiały i metody” (3.9). Pomiaru dokonywano przy użyciu β -licznika Wallac. Znamienność statystyczna dla pomiaru przy stężeniu Ag 300 $\mu\text{g/ml}$: Grupa B vs. A, $p < 0,025$, Grupa C vs. A, $p < 0,025$; dla stężenia Ag 100 $\mu\text{g/ml}$: Grupa B vs A, $p < 0,025$, Grupa C vs. A, $p < 0,025$; dla stężenia Ag 30 $\mu\text{g/ml}$: Grupa B vs. A, $p < 0,025$, Grupa C vs. A, $p < 0,025$; dla stężenia Ag 10 $\mu\text{g/ml}$, Grupa B vs. A, $p < 0,025$, Grupa C vs. A, $p < 0,05$, dla stężenia Ag 3 $\mu\text{g/ml}$: Grupa B vs. A, Grupa C vs. A -brak znamienności statystycznej oraz dla stężenia Ag 1 $\mu\text{g/ml}$: Grupy B i C vs. A - brak znamienności statystycznej.

Rycina 7.**Komórki węzłów chłonnych krezkowych pochodzące od myszy poddanych gastrektomii hamują proliferację komórek uczulonych *in vitro*.**

3×10^5 komórek uczulonych od myszy immunizowanej 4 dni wcześniej 5% PCL hodowano z 6×10^4 komórek węzłów chłonnych krezkowych w obecności TNP-Ig jako antygeny, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody” (3.9). Komórki węzłów chłonnych krezkowych (Tr) pochodziły od myszy poddanych 3 dni wcześniej gastrektomii (Grupa B) lub laparotomii (Grupa C). Komórki uczulone (Tef) hodowane bez komórek regulatorowych stanowiły kontrolę pozytywną (Grupa A). Po 48 godz. hodowli do komórek dodawano [^3H]-tymidyny i inkubację kontynuowano przez kolejne 18 godz., po czym dokonywano pomiaru

przy pomocy licznika scyntylicyjnego. Znamienność statystyczna dla pomiaru przy stężeniu Ag: 300 µg/ml : Grupa B vs. A, $p < 0,05$, dla stężenia Ag 100 µg/ml: Grupa B vs. A, $p < 0,025$, dla stężenia Ag 30 µg/ml, Grupa B vs. A, $p < 0,025$, dla stężenia Ag 10 µg/ml: Grupa B vs. A $p < 0,05$ oraz dla stężenia Ag 3 µg/ml: Dla stężeń Ag: 300 µg/ml, 30 µg/ml oraz 3 µg/ml: Grupa B vs. A – brak znamienności statystycznej. Dla Grupa C vs. A – brak znamienności statystycznej w całym zakresie stężeń antygeny.

Rycina 8.

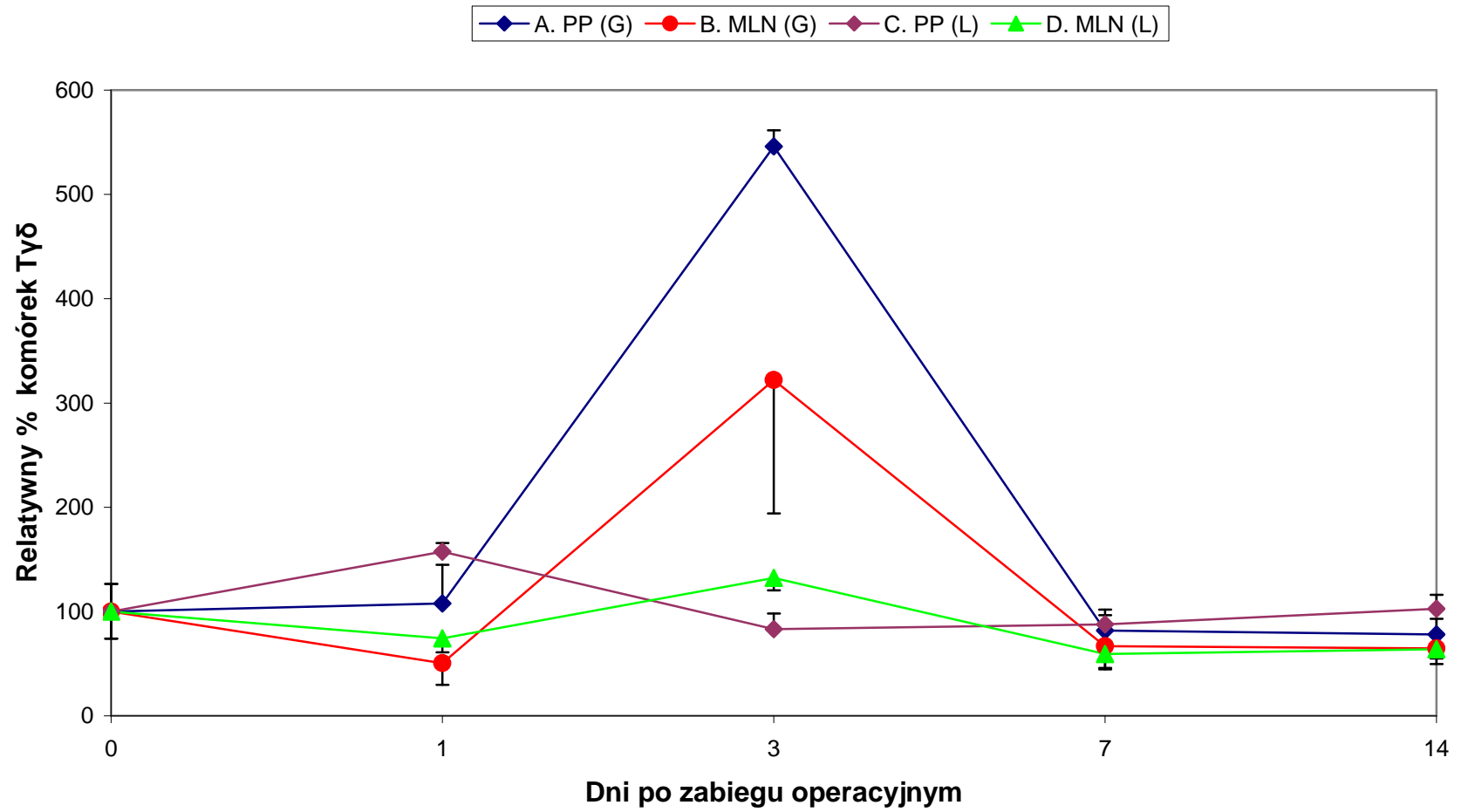
Komórki $T\gamma\delta^+$ ($T\alpha\beta^-$) węzłów chłonnych krezkowych hamują proliferację komórek uczulonych *in vitro*.

Komórki regulacyjne, pobrane od myszy poddanych gastrektomii w 3 dni od zabiegu, inkubowano z mAb anti-TCR β (H57-597) lub anti-TCR γ (UC7-135 D5), a następnie z dopełniaczem króliczym (RC'), tak jak opisano w rozdziale „Materiały i metody” (3.11). Uzyskane w ten sposób dwie populacje komórek $T\alpha\beta^-$ (TCR $\gamma\delta^+$) (Grupa D) oraz $T\gamma\delta^-$ (TCR $\alpha\beta^+$) (Grupa C) użyto w teście zahamowania proliferacji zgodnie z opisem do Ryciny 7. Kontrolę supresji stanowiły komórki uczulone (Tef), hodowane z komórkami węzłów chłonnych krezkowych (Tr pełne) myszy operowanych, poddanych uprzednio działaniu samego medium i RC' (Grupa B). W kontroli pozytywnej hodowano same komórki uczulone w obecności TNP-Ig (Grupa A). Po 48 godz. hodowli do komórek dodawano [3 H]-tymidynę, a następnie dokonywano pomiaru zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody” (3.9). Znamienność statystyczna dla pomiaru przy stężeniu Ag 300 µg/ml: Grupa B vs A, $p < 0,02$, Grupa C vs A, $p < 0,02$, Grupa C vs A, $p < 0,05$; dla stężenia Ag 100 µg/ml: Grupa B vs A, $p < 0,01$, Grupa D vs A, $p < 0,02$, Grupa C vs A brak znamienności; dla stężenia 30 µg/ml: Grupa C vs A, $p < 0,001$, Grupa B vs A oraz Grupa D vs A brak znamienności; dla stężenia 10 µg/ml : Grupa B vs A, Grupa C vs A oraz Grupa D vs A, brak znamienności; dla stężenia Ag 3 µg/ml : Grupa C vs A, $p < 0,001$, Grupa B vs A oraz Grupa D vs A, brak znamienności; dla stężenia Ag 1 µg/ml : brak znamienności statystycznej dla wszystkich badanych grup.

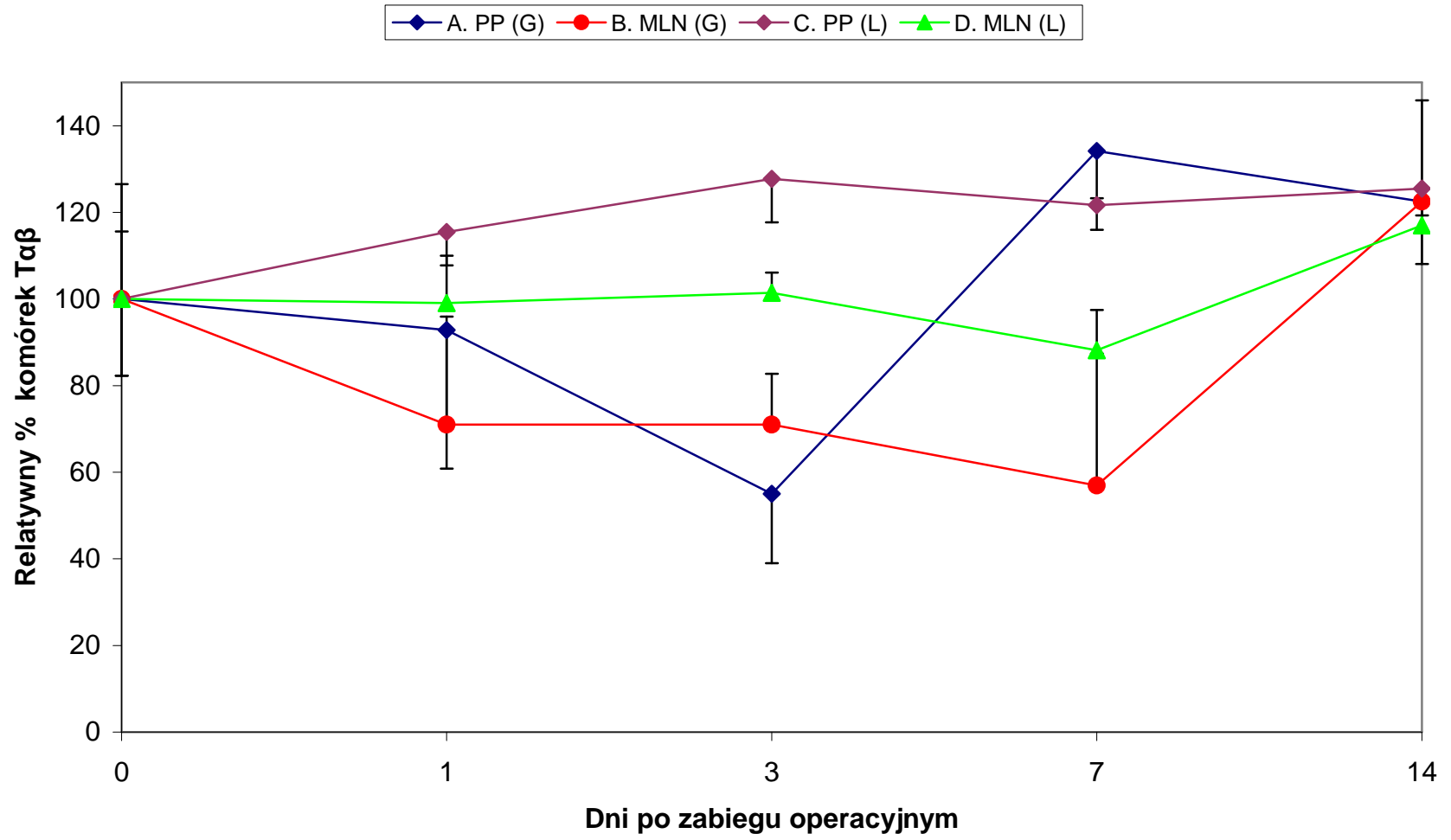
Rycina 9.**Limfocyty $T\gamma\delta$ hamują proliferację komórek *in vitro* za pośrednictwem uwalnianego TGF- β .**

Komórki regulacyjne $T\gamma\delta^+$, pochodzące z węzłów chłonnych krezkowych myszy poddanych gastrektomii, hodowano z komórkami uczulonymi w obecności TNP-Ig oraz mAb neutralizujących odpowiednie cytokiny: anty-IL-4 (Grupa D), anty-IL-10 (Grupa E), anty-TGF- β (Grupa F) lub bez przeciwciał (Grupa C). Dodatkową kontrolę supresji stanowiły nieseparowane komórki węzłów chłonnych krezkowych hodowane z komórkami uczulonymi (Grupa B). Kontrolę pozytywną stanowiły same komórki uczulone (Grupa A). Komórki wszystkich grup testowano w teście „zahamowania proliferacji *in vitro*” zgodnie z procedurą zawartą w rozdziale „Materiały i metody” (3.9). Znamienność statystyczna dla pomiaru przy stężeniu Ag 300 $\mu\text{g/ml}$: Grupa B vs A, $p < 0,02$, Grupa C vs A, $p < 0,05$, Grupa D vs A, $p < 0,02$, Grupa E vs A, $p < 0,01$, Grupa F vs A, brak znamienności statystycznej; dla stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$: Grupa B vs A, $p < 0,01$, Grupa C vs A, $p < 0,02$, Grupa E vs A, $p < 0,05$, Grupa D oraz F vs A, brak znamienności; dla stężenia 30 $\mu\text{g/ml}$: Grupa D vs A, $p < 0,01$, Grupy B, C, E oraz F vs A, brak znamienności; dla stężenia 10 oraz 3 $\mu\text{g/ml}$: Grupy D oraz E vs A, $p < 0,05$, Grupy B, C i F vs A, brak znamienności; dla stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$: Grupa E vs A, $p < 0,05$, Grupy B, C, D oraz F vs A, brak znamienności statystycznej.

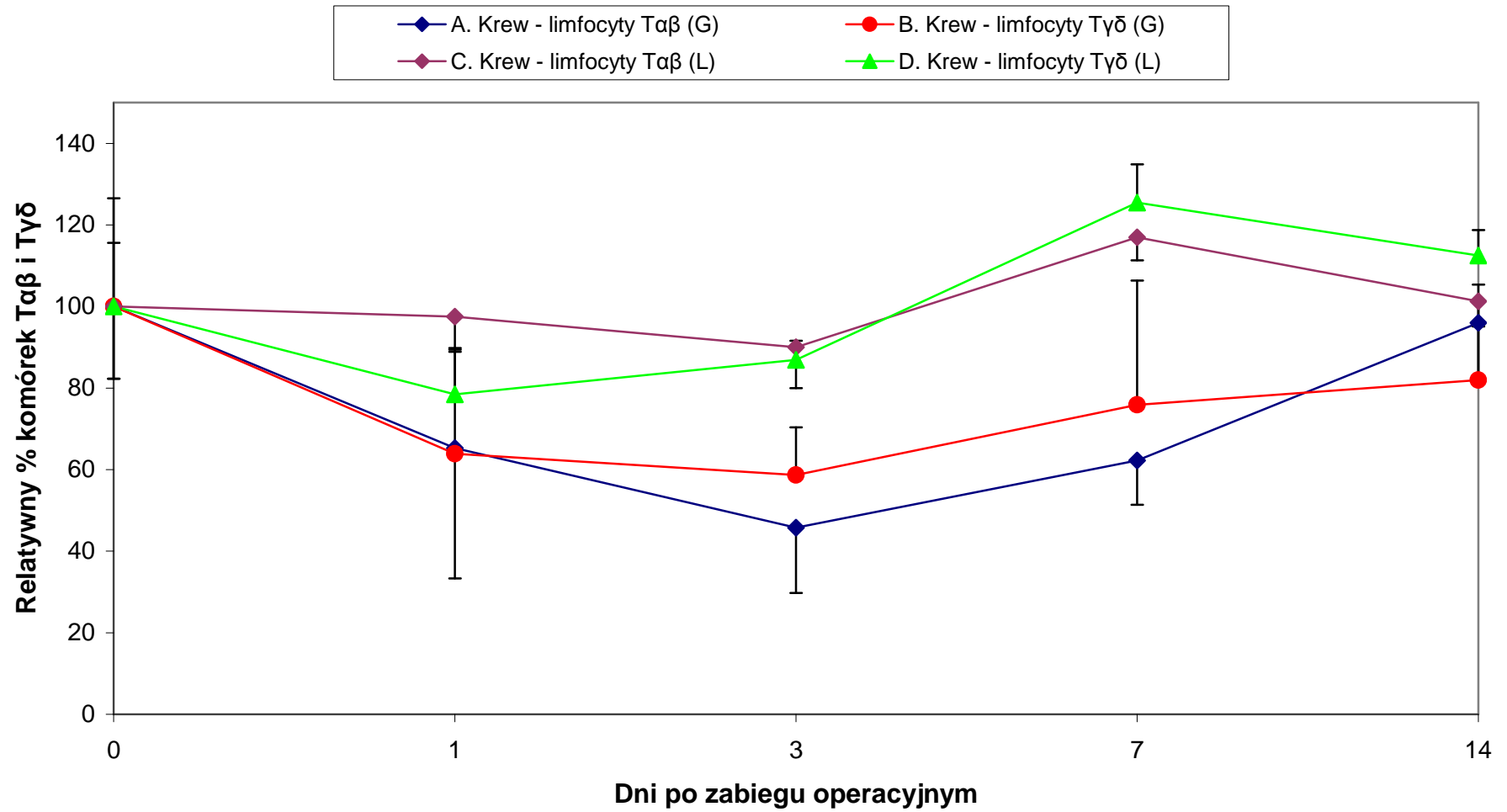
Rycina 1



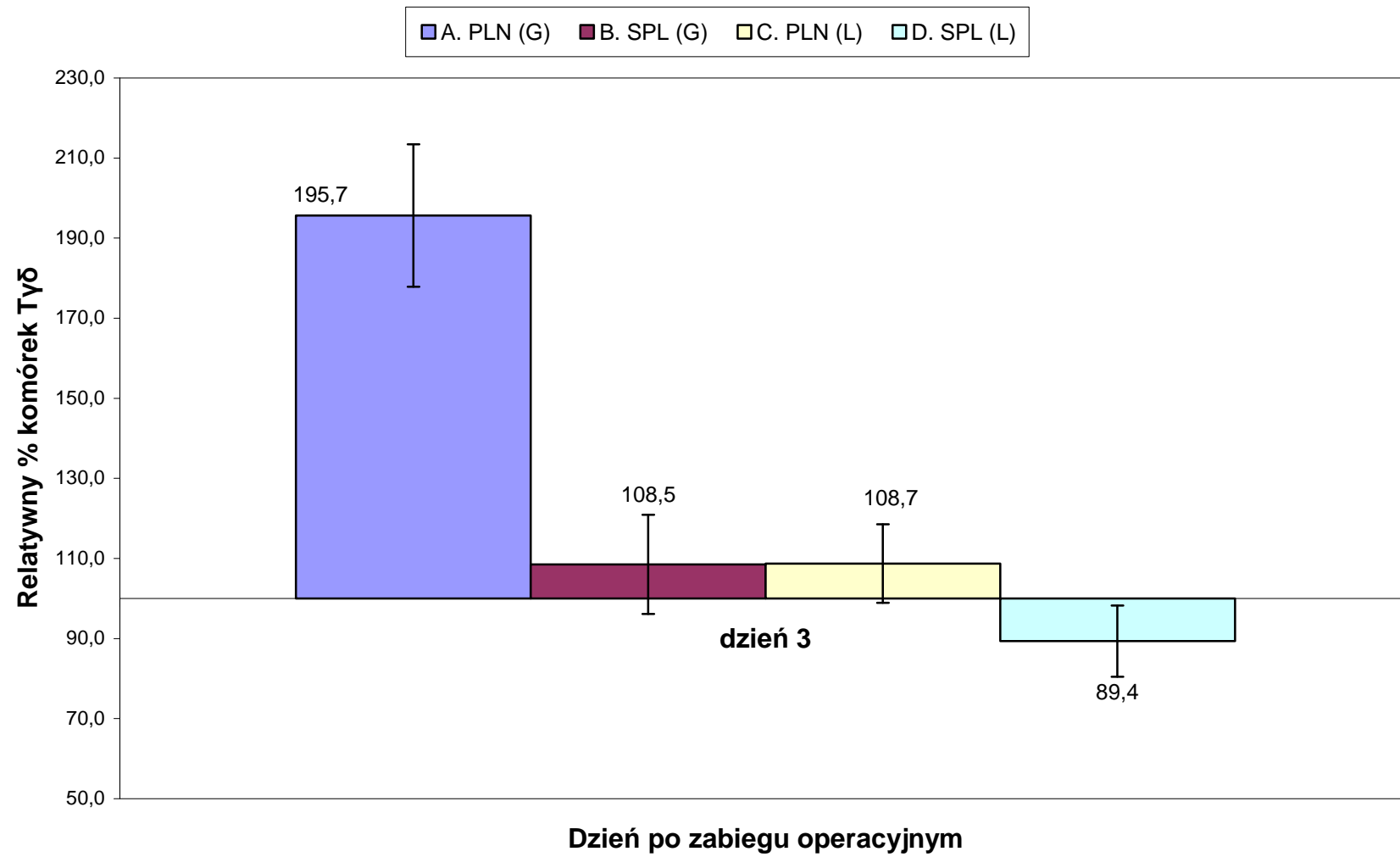
Rycina 2



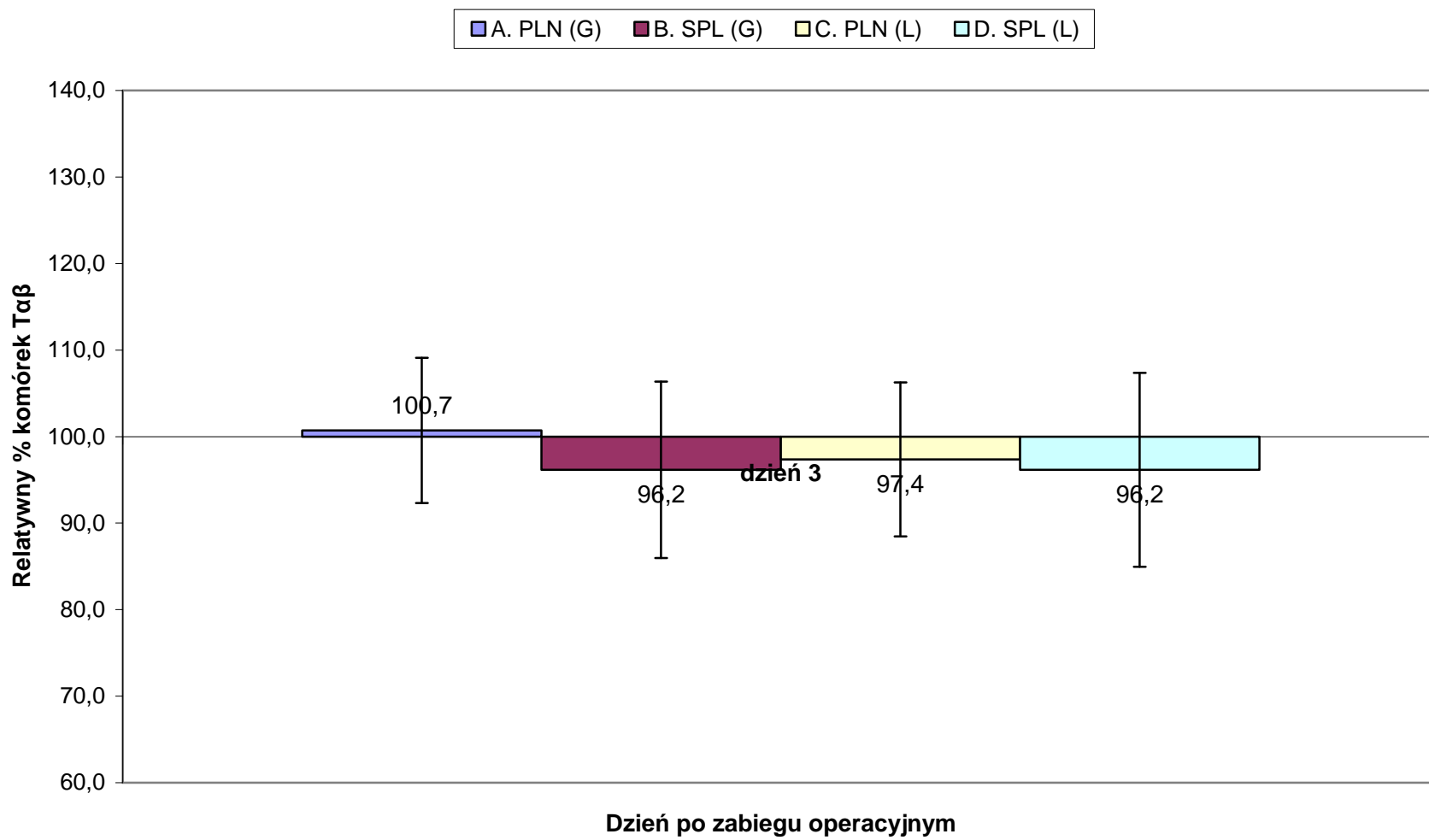
Rycina 3



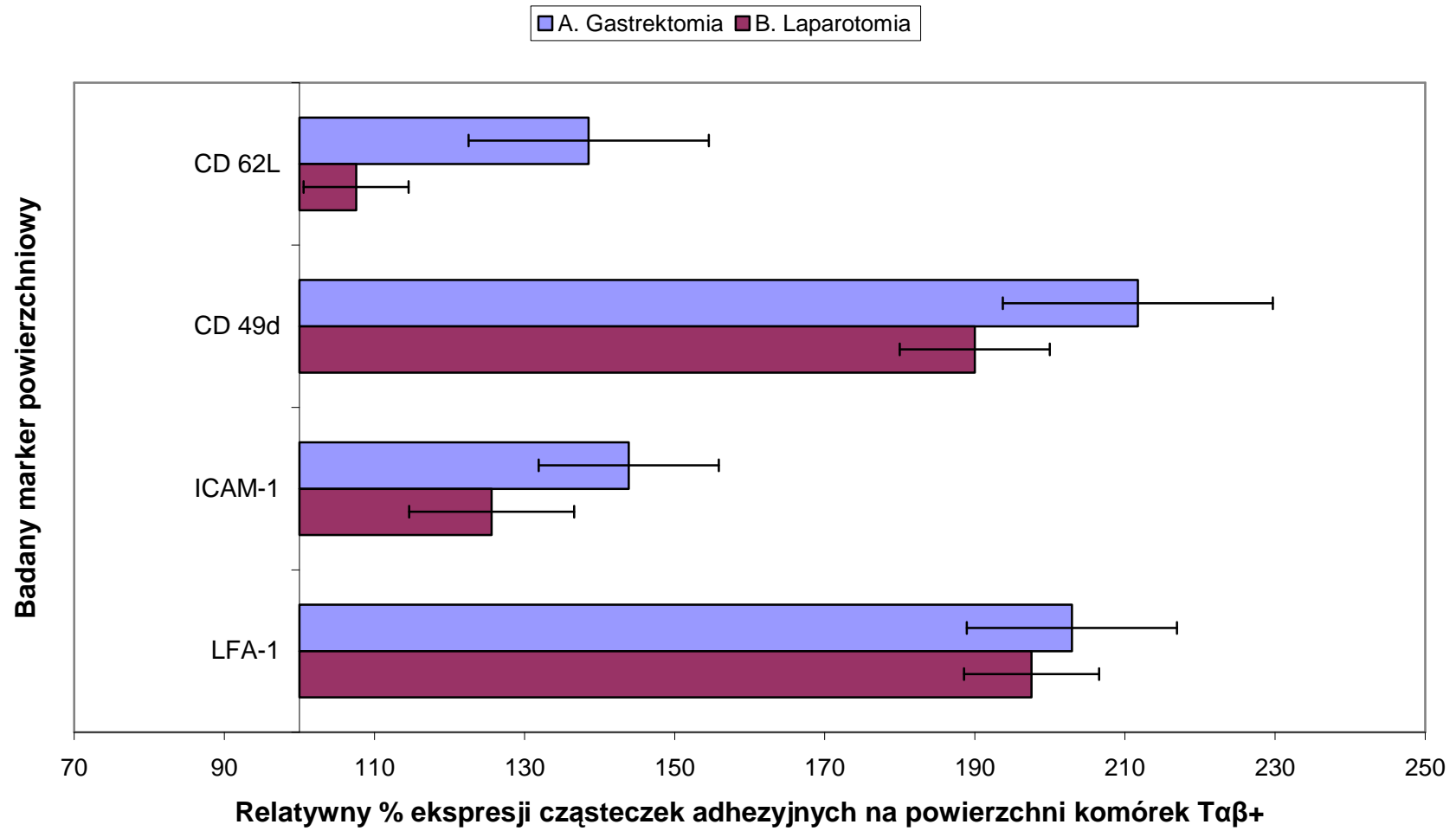
Rycina 4A



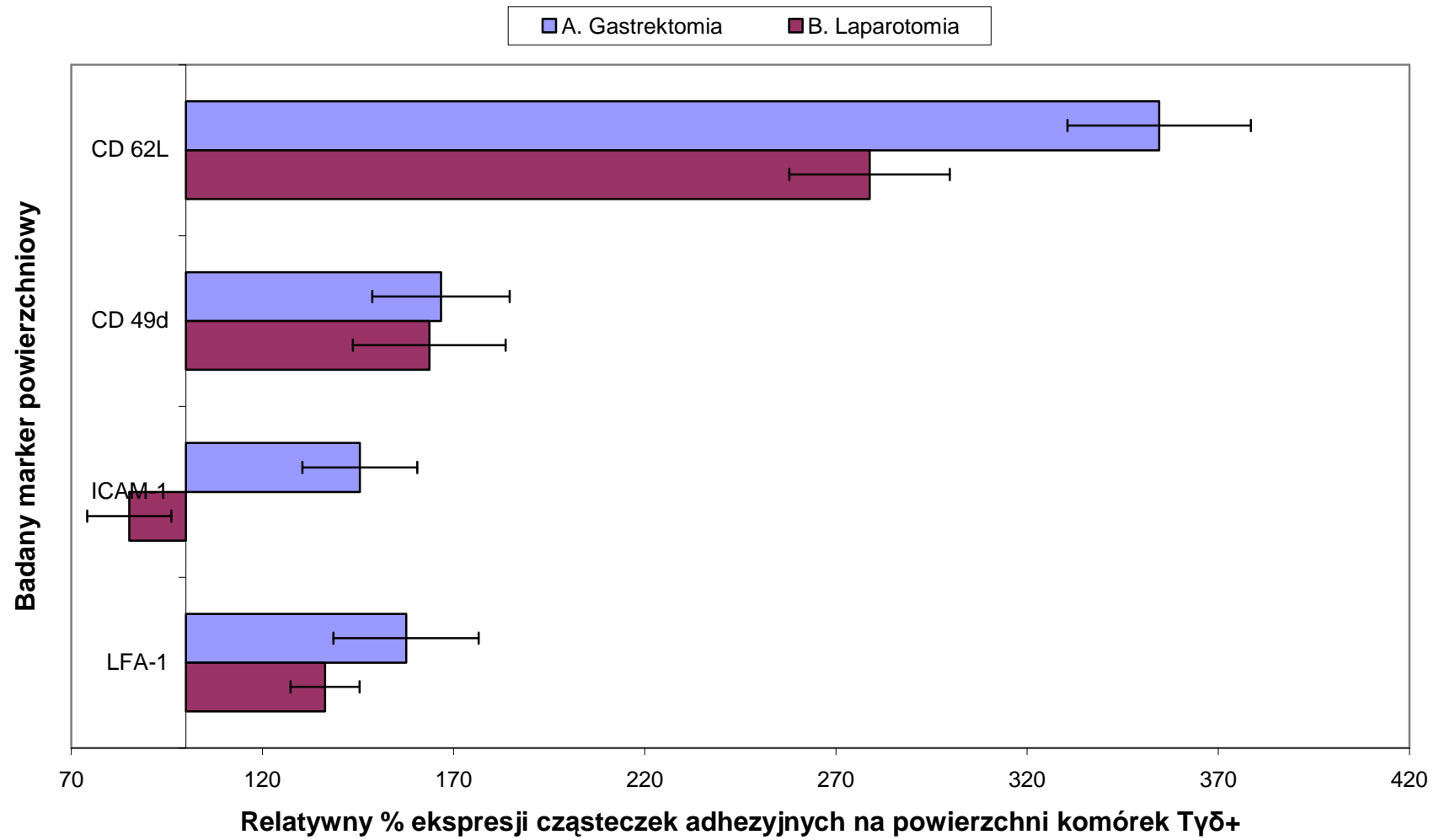
Rycina 4B



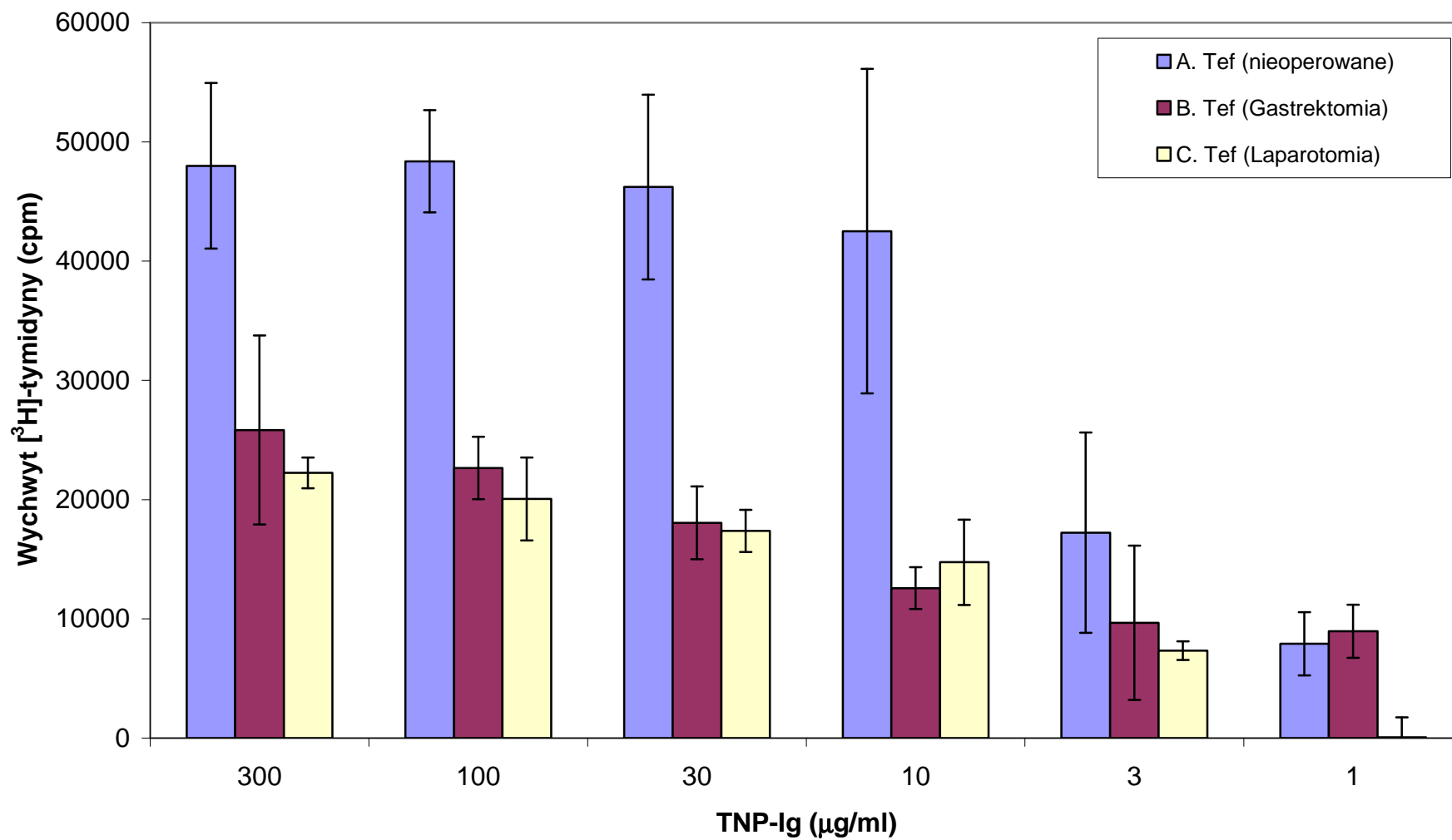
Rycina 5A



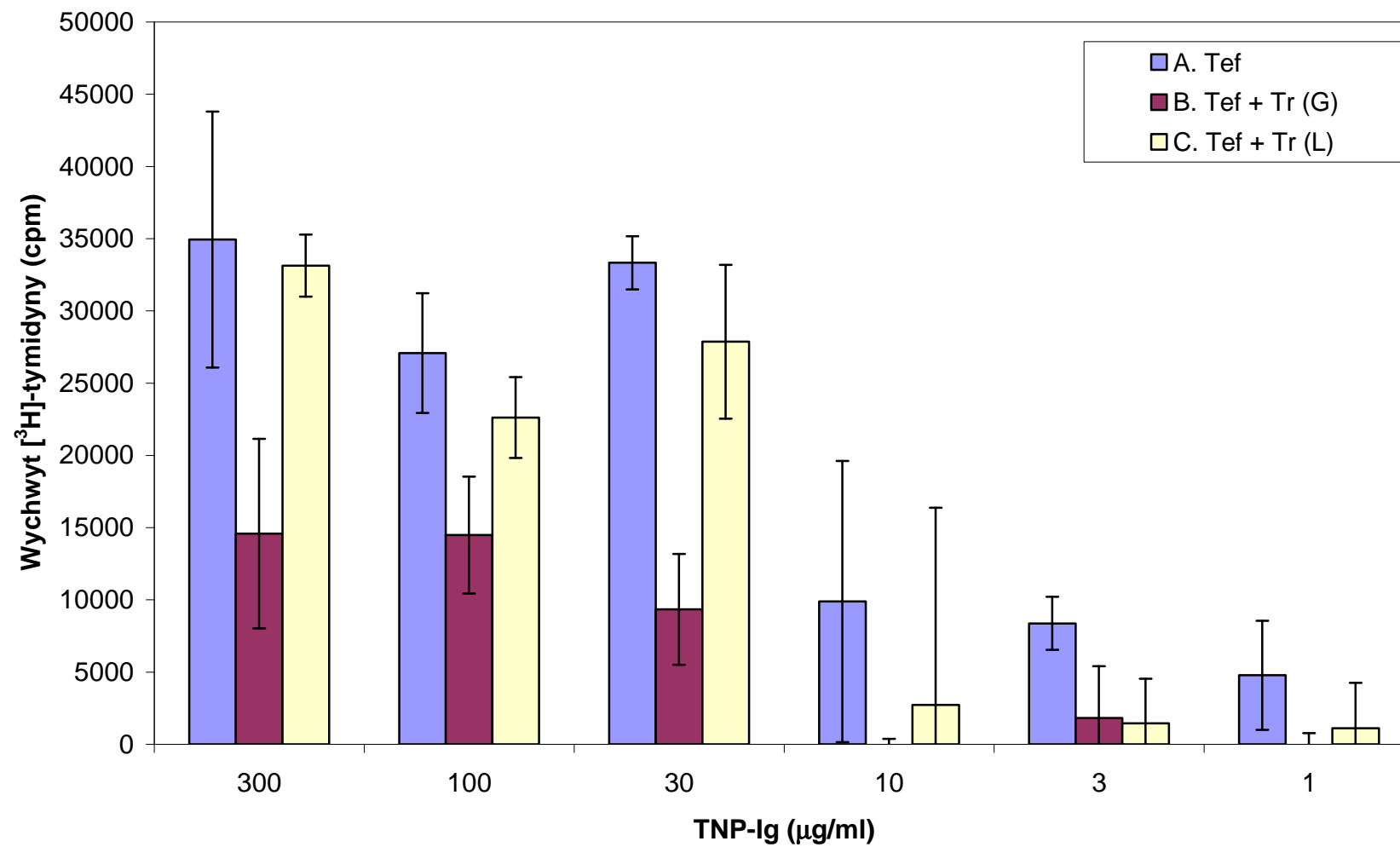
Rycina 5B



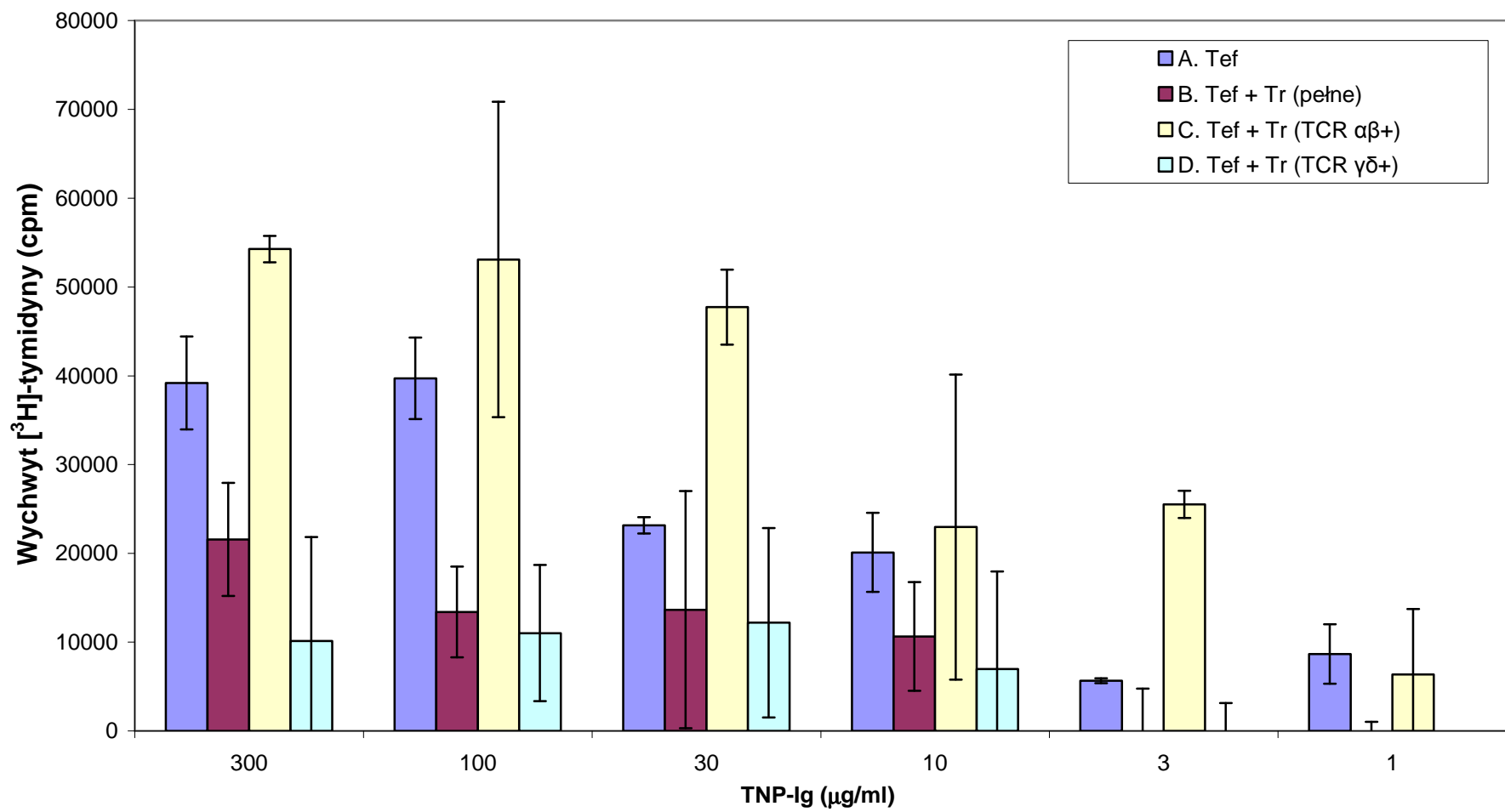
Rycina 6



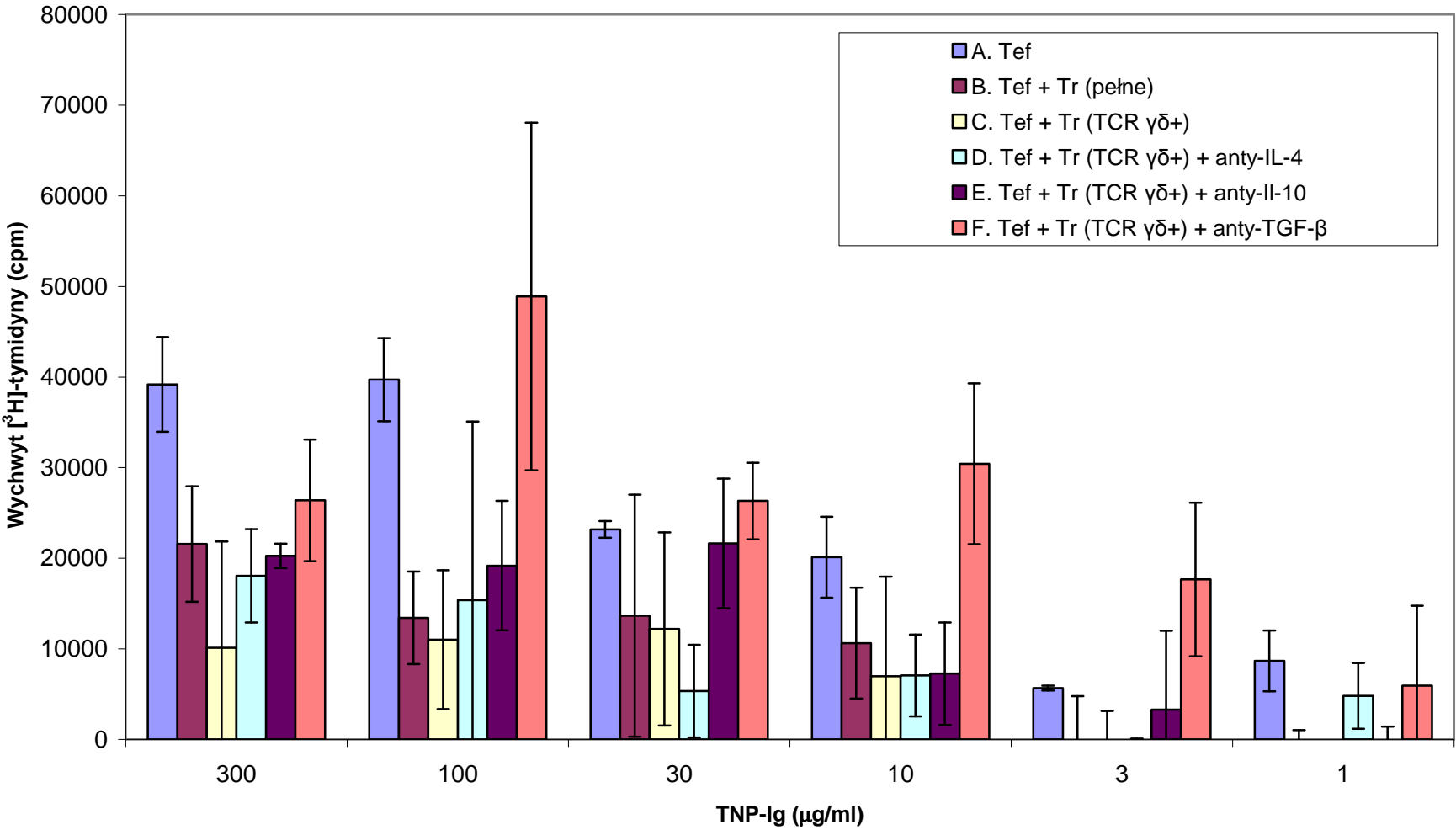
Rycina 7



Rycina 8



Rycina 9



8. Piśmiennictwo

1. Kehlet H. Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation. *Br J Anaesth* 1997; 78: 606-17.
2. Allen JE, Maizels RM. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today* 1997; 18: 387-92.
3. Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR. Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am J Surg* 1999; 177: 55-60.
4. Sietses C, Beelen RH, Meijer S, Cuesta MA. Immunological consequences of laparoscopic surgery, speculations on the cause and clinical implications. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384: 250-8.
5. Esposito S. Immune system and surgical site infection. *J Chemother* 2001; 13 Spec No 1: 12-6.
6. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 457-69.
7. [No authors listed] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-74.
8. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84: 920-35.
9. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000; 127: 117-26.
10. Dehne MG, Sablotzki A, Hoffmann A, Muhling J, Dietrich FE, Hempelmann G. Alterations of acute phase reaction and cytokine production in patients following severe burn injury. *Burns* 2002; 28: 535-42
11. Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85: 109-17.
12. Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 1994; 271: 226-33.

13. Galley HF, Webster NR. The immuno-inflammatory cascade. *Br J Anaesth* 1996; 77: 11-6.
14. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 106-13.
15. Hill AG, Siegel J, Rounds J, Wilmore DW. Metabolic responses to interleukin-1: centrally and peripherally mediated. *Ann Surg* 1997; 225: 246-51.
16. Hisano S, Sakamoto K, Ishiko T, Kamohara H, Ogawa M. IL-6 and soluble IL-6 receptor levels change differently after surgery both in the blood and in the operative field. *Cytokine* 1997; 9: 447-52.
17. Svoboda P, Kantorova I, Ochmann J. Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J Trauma* 1994; 36: 336-40.
18. Mulligan MS, Smith CW, Anderson DC, Todd RF 3rd, Miyasaka M, Tamatani T, Issekutz TB, Ward PA. Role of leukocyte adhesion molecules in complement-induced lung injury. *J Immunol* 1993; 150: 2401-6.
19. Adams DH, Nash GB. Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. *Br J Anaesth* 1996; 77: 17-31.
20. Fassbender K, Kaptur S, Becker P, Groschl J, Hennerici M. Adhesion molecules in tissue injury: kinetics of expression and shedding and association with cytokine release in humans. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 89: 54-60.
21. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-91.
22. Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S715-20.
23. Black PH. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun* 2002; 16: 622-53.
24. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 851: 311-35.
25. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 64-102.

26. Anand KJ. The stress response to surgical trauma: from physiological basis to therapeutic implications. *Prog Food Nutr Sci* 1986; 10: 67-132.
27. Hill AG, Hill GL. Metabolic response to severe injury. *Br J Surg* 1998; 85: 884-90.
28. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, *et al.* Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 2000; 6: 164-70.
29. Vermes I, Beishuizen A. The hypothalamic-pituitary-adrenal response to critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001; 15: 495-511.
30. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003; 9: 517-24.
31. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. *Baillieres. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13: 583-95.
32. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 359-368.
33. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 290-303.
34. Rook GA. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13: 567-81.
35. Wissink S, van Heerde EC, vand der Burg B, van der Saag PT. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 355-63.
36. Van der Poll T, Lowry SF. Epinephrine inhibits endotoxin-induced IL-1 beta production: roles of tumor necrosis factor-alpha and IL-10. *Am J Physiol* 1997; 273: R 1885-90
37. Bone RC. Why sepsis trials fail. *JAMA* 1996; 276: 565-6.
38. Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Docke WD, Kox SN, Wauer H, Egerer K, Querner S, Asadullah K, von Baehr R, Volk HD. Interferon gamma-1b in the

treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med* 1997; 157: 389-93.

39. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125: 680-7.
40. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112: 235-43.
41. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112: 321S-329S
42. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996; 64: 4733-8.
43. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-8.
44. Lennard TW, Shenton BK, Borzotta A, Donnelly PK, White M, Gerrie LM, Proud G, Taylor RM. The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br J Surg* 1985; 72: 771-6.
45. Slade MS, Simmons RL, Yunis E, Greenberg LJ. Immunodepression after major surgery in normal patients. *Surgery* 1975; 78: 363-72.
46. Gelfand JA, Donelan M, Burke JF. Preferential activation and depletion of the alternative complement pathway by burn injury. *Ann Surg* 1983; 198: 58-62.
47. Moore FD Jr, Davis C, Rodrick M, Mannick JA, Fearon DT. Neutrophil activation in thermal injury as assessed by increased expression of complement receptors. *N Engl J Med* 1986; 314: 948-53.
48. Roumen RM, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W, Hendriks T, Goris RJ. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit Care Med* 1995; 23: 474-80.
49. Loegering DJ. Humoral factor depletion and reticuloendothelial depression during hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1977; 232: H283-7.

50. Gadd MA, Hansbrough JF. The effect of injury on murine neutrophil oxidative metabolism. In E. Faist, J. Ninnemann, and D. Green (Eds.), *Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin/New York: Springer-Verlag. 1989: 185-189.
51. Gemmel CG, Gardner J, Wilson Y, Burns HG. Opsonophagocytosis in patients undergoing abdominal surgery. In E. Faist, J. Ninnemann, and D. Green (Eds.), *Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin/New York: Springer-Verlag. 1989: 191-194.
52. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock* 1996; 5: 79-90.
53. Pollock RE, Babcock GF, Romsdahl MM, Nishioka K. Surgical stress-mediated suppression of murine natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 1984; 44: 3888-91.
54. Gryglewski A, Marcinkiewicz J, Popiela T, Ptak W. Effect of surgical trauma (gastrectomy) on cell-mediated and humoral responses in mice. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 50-4.
55. Allendorf JD, Bessler M, Whelan RL, Trokel M, Laird DA, Terry MB, Treat MR. Postoperative immune function varies inversely with the degree of surgical trauma in a murine model. *Surg Endosc* 1997; 11: 427-30.
56. Allendorf JD, Bessler M, Whelan RL, Trokel M, Laird DA, Terry MB, Treat MR. Better preservation of immune function after laparoscopic-assisted vs. open bowel resection in a murine model. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: S67-72
57. Whelan RL, Franklin M, Holubar SD, *et al.* Postoperative cell mediated immune response is better preserved after laparoscopic vs open colorectal resection in humans. *Surg Endosc* 2003; 17: 972-8.
58. Ogawa K, Hirai M, Katsube T, *et al.* Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery*. 2000; 127: 329-36. Erratum in: *Surgery* 2000; 127: 613.
59. Gennari R, Dominiononi L, Imperatori A, Bianchi V, Maroni P, Dionigi R. Alterations in lymphocyte subsets as prognosticators of postoperative infections. *Eur J Surg* 1995; 161: 493-9.

60. Markewitz A, Faist E, Lang S, Hultner L, Weinhold C, Reichart B. An imbalance in T-helper cell subsets alters immune response after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1996; 10: 61-7.
61. Markewitz A, Lante W, Franke A, Marohl K, Kuhlmann WD, Weinhold C. Alterations of cell-mediated immunity following cardiac operations: clinical implications and open questions. *Shock* 2001; 16: 10-5.
62. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-46.
63. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-51.
64. Kell MR, Kavanaugh EG, Goebel A, Soberg CC, Lederer JA. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock*. 1999; 12(2): 139-44.
65. Kavanaugh EG, Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Burn injury primes naive CD4+ T cells for an augmented T-helper 1 response. *Surgery* 1998; 124: 269-76.
66. Dhabhar FS, McEwen BS. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol* 1996; 156: 2608-15.
67. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 1995; 222: 482-90.
68. Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* 1996; 119: 316-25.
69. Lyons A, Goebel A, Mannick JA, Lederer JA. Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. *Arch Surg* 1999; 134: 1317-23

70. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* 1993; 14: 335-8.
71. Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Anti-interleukin-10 antibody restores burn-induced defects in T-cell function. *Surgery* 1997; 122: 146-52.
72. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 595-638.
73. Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA, Fleisher TA, Chrousos GP, Wilder RL. Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J Immunol* 1998; 161: 2586-93.
74. Klava A, Windsor AC, Farmery SM, *et al.* Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression. *Arch Surg* 1997; 132: 425-9.
75. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-8.
76. van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181: 775-9.
77. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response *Immunol Today* 1991; 12: 349-52.
78. Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol* 1998; 161: 2723-30.
79. Fong TA, Mosmann TR. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol* 1990; 144: 1744-52.
80. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; 2: 271-9.

81. Zedler S, Faist E, Ostermeier B, von Donnersmarck GH, Schildberg FW. Postburn constitutional changes in T-cell reactivity occur in CD8+ rather than in CD4+ cells. *J Trauma* 1997; 42: 872-80;
82. Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27: 66-72.
83. Krangel MS, Yssel H, Brocklehurst C, Spits H. A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *J Exp Med* 1990; 172: 847-59.
84. Heyborne K, Fu YX, Kalataradi H, Reardon C, Roark C, Eyster C, Vollmer M, Born W, O'Brien R. Evidence that murine V gamma 5 and V gamma 6 gamma delta-TCR+ lymphocytes are derived from a common distinct lineage. *J Immunol* 1993; 151: 4523-7.
85. Goldman JP, Spencer DM, Raulet DH. Ordered rearrangement of variable region genes of the T cell receptor gamma locus correlates with transcription of the unrearranged genes. *J Exp Med* 1993; 177: 729-39.
86. Appasamy PM, Kenniston TW Jr, Weng Y, Holt EC, Kost J, Chambers WH. Interleukin 7-induced expression of specific T cell receptor gamma variable region genes in murine fetal liver cultures. *J Exp Med* 1993; 178: 2201-6.
87. Lauzurica P, Krangel MS. Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor delta transgene. *J Exp Med* 1994; 179: 43-55.
88. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 679-705.
89. Hayday AC. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 975 -1026.
90. Sim GK. Intraepithelial lymphocytes and the immune system. *Adv Immunol* 1995; 58: 297-343.

91. Huber H, Descosy P, van Brandwijk R, Knop J. Activation of murine epidermal TCR-gamma delta+ T cells by keratinocytes treated with contact sensitizers. *J Immunol* 1995; 155: 2888-94.
92. Havran WL, Chien YH, Allison JP. Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Science* 1991; 252: 1430-2.
93. Workalemahu G, Foerster M, Kroegel C, Braun RK. Human gamma delta-T lymphocytes express and synthesize connective tissue growth factor: effect of IL-15 and TGF-beta 1 and comparison with alpha beta-T lymphocytes. *J Immunol* 2003; 170: 153-7.
94. Jameson J, Ugarte K, Chen N, *et al.* A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 2002; 296: 747-9.
95. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8175-9.
96. Kronenberg M. Antigens recognized by gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 64-71.
97. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 1995; 375: 155-8.
98. Ptak W, Szczepanik M, Ramabhadran R, Askenase PW. Immune or normal gamma delta T cells that assist alpha beta T cells in elicitation of contact sensitivity preferentially use V gamma 5 and V delta 4 variable region gene segments. *J Immunol* 1996; 156: 976-86.
99. Girardi M, Lewis J, Glusac E, Filler RB, Geng L, Hayday AC, Tigelaar RE. Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J Exp Med* 2002; 195: 855-67.
100. Egan PJ, Carding SR. Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J Exp Med* 2000; 191: 2145-58.

101. Hayday AC, Roberts S, Ramsburg E. Gamma delta cells and the regulation of mucosal immune responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: S161-3
102. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 233-42.
103. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001; 294: 605-9.
104. Nakajima H, Tomiyama H, Takiguchi M. Inhibition of gamma delta T cell recognition by receptors for MHC class I molecules. *J Immunol* 1995; 155: 4139-42.
105. Odyniec A, Szczepanik M, Mycko MP, Stasiolek M, Raine CS, Selmaj KW. Gammadelta T cells enhance the expression of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting antigen presentation and IL-12 production. *J Immunol* 2004; 173: 682-94.
106. Ladel CH, Blum C, Kaufmann SH. Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by gamma/delta T lymphocytes. *Infect Immun* 1996; 64: 1744-9.
107. Fu YX, Roark CE, Kelly K, *et al.* Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. *J Immunol* 1994; 153: 3101-15.
108. Hsieh B, Schrenzel MD, Mulvania T, Lepper HD, DiMolfetto-Landon L, Ferrick DA. In vivo cytokine production in murine listeriosis. Evidence for immunoregulation by gamma delta+ T cells. *J Immunol* 1996; 156: 232-7.
109. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995; 373: 255-7.
110. Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC, Havran WL. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 1996; 157: 985-92.

111. Askenase PW, Szczepanik M, Ptak M, Paliwal V, Ptak W. Gamma delta T cells in normal spleen assist immunized alpha beta T cells in the adoptive cell transfer of contact sensitivity. Effect of Bordetella pertussis, cyclophosphamide, and antibodies to determinants on suppressor cells. *J Immunol* 1995; 154: 3644-53.
112. Ptak W, Szczepanik M, Ramabhadran R, Askenase PW. Immune or normal gamma delta T cells that assist alpha beta T cells in elicitation of contact sensitivity preferentially use V gamma 5 and V delta 4 variable region gene segments. *J Immunol* 1996; 156: 976-86.
113. Szczepanik M, Lewis J, Geba GP, Ptak W, Askenase PW. Positive regulatory gamma delta T cells in contact sensitivity: augmented responses by in vivo treatment with anti-gamma delta monoclonal antibody, or anti-V gamma 5 or V delta 4. *Immunol Invest* 1998; 27: 1-15.
114. Szczepanik M, Nowak B, Askenase PW, Ptak W. Cross-talk between gammadelta T lymphocytes and immune cells in humoral response. *Immunology* 1998; 95: 612-7.
115. Szczepanik M, Anderson LR, Ushio H, Ptak W, Owen MJ, Hayday AC, Askenase PW. Gamma delta T cells from tolerized alpha beta T cell receptor (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells in vivo, and their interferon-gamma production in vitro. *J Exp Med* 1996; 184: 2129-39.
116. Szczepanik M, Anderson LR, Ushio H, Ptak W, Owen MJ, Hayday AC, Askenase PW. Gamma/delta T cells from tolerized alpha/beta-TCR-deficient mice antigen specifically inhibit contact sensitivity in vivo and IFN-gamma production in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 373-5.
117. Szczepanik M. Negative regulation of contact sensitivity reaction by T $\gamma\delta$ cells. *Folia Medica Cracoviensia* 1998; 39: 1-33,
118. Szczepanik M, Ptak W, Askenase PW. Role of interleukin-4 in down-regulation of contact sensitivity by gammadelta T cells from tolerized T-cell receptor alpha-/- mice. *Immunology* 1999; 98: 63-70.
119. Szczepanik M, Askenase PW. IL-12 reverses established tolerance mediated by TCRalpha β but not by TCRgammadelta β suppressor T cells. *Immunol Invest* 2000; 29: 243-56.

120. Ponomarev ED, Novikova M, Yassai M, Szczepanik M, Gorski J, Dittel BN. Gamma delta T cell regulation of IFN-gamma production by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells: correlation with recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; 173: 1587-95.
121. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14
122. Kulidjian AA, Inman R, Issekutz TB. Rodent models of lymphocyte migration. *Semin Immunol* 1999; 11: 85-93.
123. Goebel MU, Mills PJ. Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom Med* 2000; 62: 664-70.
124. Bauer ME, Perks P, Lightman SL, Shanks N. Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? *Life Sci* 2001; 69: 1167-79.
125. Tarcic N, Levitan G, Ben-Yosef D, Prous D, Ovadia H, Weiss DW. Restraint stress-induced changes in lymphocyte subsets and the expression of adhesion molecules. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 249-57.
126. Miller AH, Spencer RL, Hassett J, Kim C, Rhee R, Ciurea D, Dhabhar F, McEwen B, Stein M. Effects of selective type I and II adrenal steroid agonists on immune cell distribution. *Endocrinology* 1994; 135: 1934-44.
127. Dhabhar FS, Miller AH, Stein M, McEwen BS, Spencer RL. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain Behav Immun* 1994; 8: 66-79.
128. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol* 1995; 154: 5511-27.
129. Dhabhar FS. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 359-72.
130. Little JR, Eisen HN. Preparation and characterization of antibodies specific for the 2, 4, 6-trinitro group. *Biochemistry* 1966; 5: 3385-95.

131. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, *et al.* Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 1993; 218: 769-76.
132. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 237-44.
133. Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma* 1983; 23: 775-87.
134. Gryglewski A, Marcinkiewicz J. Influence of anatomic localization and extent of surgical trauma on immune responses in mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1985; 33: 489-92.
135. Schaffer M, Barbul A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 1998; 85: 444-60.
136. Kavanagh EG, Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Burn injury primes naive CD4+ T cells for an augmented T-helper 1 response. *Surgery* 1998; 124: 269-76.
137. Kell MR, Kavanaugh EG, Goebel A, Soberg CC, Lederer JA. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock* 1999; 12: 139-44.
138. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033-6.
139. Mackay CR, Marston WL, Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 1990; 171: 801-17.
140. Mackay CR. T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol Today* 1991; 12: 189-92.
141. Westermann J, Pabst R. How organ-specific is the migration of 'naive' and 'memory' T cells? *Immunol Today* 1996; 17: 278-82.
142. Bode U, Duda C, Weidner F, *et al.* Activated T cells enter rat lymph nodes and Peyer's patches via high endothelial venules: survival by tissue-specific proliferation and preferential exit of CD8+ T cell progeny. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1487-95.

143. Luettig B, Pape L, Bode U, Bell EB, Sparshott SM, Wagner S, Westermann J. Naive and memory T lymphocytes migrate in comparable numbers through normal rat liver: activated T cells accumulate in the periportal field. *J Immunol* 1999; 163: 4300-7.
144. Westermann J, Engelhardt B, Hoffmann JC. Migration of T cells in vivo: molecular mechanisms and clinical implications. *Ann Intern Med* 2001; 135: 279-95.
145. Westermann J, Bode U. Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol Today* 1999; 20: 302-6.
146. Bode U, Sparmann G, Westermann J. Gut-derived effector T cells circulating in the blood of the rat: preferential re-distribution by TGFbeta-1 and IL-4 maintained proliferation. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2116-25.
147. Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P. The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. *Eur J Immunol* 1974; 4: 435-43.
148. Binns RM, Licence ST, Pabst R. Homing of blood, splenic, and lung emigrant lymphoblasts: comparison with the behaviour of lymphocytes from these sources. *Int Immunol* 1992; 4: 1011-9.
149. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SH. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 1993; 365: 53-6.
150. D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997; 158: 1217-21.
151. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-61.
152. Luethviksson BR, Gunnlaugsdottir B. Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol* 2003; 58: 129-38.
153. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 46-53.

- 154.** Ahmad S, Choudhry MA, Shankar R, Sayeed MM. Transforming growth factor-beta negatively modulates T-cell responses in sepsis. *FEBS Lett* 1997; 402: 213-8.
- 155.** Branch CD, Wilkins GF, Ross FP. The coagulum contact method (SANO) of skin grafting in the treatment of burns and wounds. *Surgery* 1946; 19: 460-6.

9. Streszczenie

W wyniku urazu dochodzi do przerywania barier ochronnych organizmu i związanej z tym destrukcji tkanek i komórek gospodarza. W odpowiedzi na uraz organizm reaguje szeregiem zmian, których celem jest przywrócenie homeostazy, pobudzenie odbudowy zniszczonych tkanek i zapobieżenie infekcji.

Stopień nasilenia odpowiedzi na uraz uzależniony jest od ogólnego stanu ustroju oraz od siły i charakteru przebytego urazu. W przypadku niewielkich obrażeń reakcja obronna ustroju ma charakter lokalny, z kolei urazy ciężkie prowadzą do odpowiedzi organizmu o charakterze uogólnionym. W każdym jednak przypadku reakcja organizmu na uraz ma charakter kompleksowy i związana jest z pobudzeniem szeregu życiowo ważnych systemów organizmu, takich jak układ immunologiczny, układ nerwowy oraz układ hormonalny.

Wpływ urazów, w tym urazów operacyjnych, na odpowiedź immunologiczną był przedmiotem licznych prac badawczych od wielu lat. Wielu autorów wykazało zaburzenia zarówno odpowiedzi nieswoistej, jak i odpowiedzi nabytej, będące konsekwencją oparzeń, obrażeń mechanicznych czy wreszcie zabiegu chirurgicznego. Powszechnie uważa się, że konsekwencją obrażeń ciężkich, w tym także rozległych operacji chirurgicznych, jest trwający od kilku do kilkunastu dni po urazie stan immunosupresji, który charakteryzuje się m. in. osłabieniem odpowiedzi typu komórkowego. Wyniki badań klinicznych i eksperymentalnych ostatnich lat pozwalają na stwierdzenie, że jedną z głównych przyczyn obserwowanego w następstwie urazu zahamowania odpowiedzi komórkowej wydaje się być przesunięcie równowagi TH1 / TH2 w kierunku komórek i cytokin typu TH2.

Na zakres i charakter odpowiedzi ustroju na uraz wpływają nie tylko zmiany funkcjonalne komórek układu odpornościowego, ale także ich właściwa dystrybucja w obrębie tkanek i narządów organizmu.

W niniejszej pracy podjęto próbę określenia zmian w rozmieszczeniu i aktywności funkcjonalnej limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ pod wpływem zabiegu chirurgicznego (gastrektomia). Uzyskane wyniki badań wskazują na wyraźne zmiany w rozmieszczeniu limfocytów T obu badanych populacji w następstwie gastrektomii. W przypadku limfocytów $T\alpha\beta$ zaobserwowano znaczący spadek odsetka tych komórek w węzłach chłonnych krezkowych ($56,7\% \pm 15$ do $40,4\% \pm 17$), kępkach Peyera ($38,4\% \pm 6,8$ do $21,2\% \pm 6,2$) oraz we krwi obwodowej ($18,1\%$

$\pm 0,8$ do $8,2\% \pm 1,7$) w 3 dniu po gastrektomii. Jednocześnie nie odnotowano istotnych zmian w rozmieszczeniu tych komórek w węzłach limfatycznych obwodowych i w śledzionie. Z kolei w przypadku limfocytów $T\gamma\delta$, w 3 dniu po zabiegu operacyjnym, zaobserwowano wyraźny wzrost ich odsetka w węzłach chłonnych krezkowych ($2,7\% \pm 0,7$ do $8,8\% \pm 3,5$), kępkach Peyera ($1,9\% \pm 0,5$ do $10,5\% \pm 0,3$) oraz w węzłach chłonnych obwodowych ($4,6\% \pm 1,1$ do $9,0\% \pm 0,8$). Wzrost liczby komórek $T\gamma\delta$ we wspomnianych narządach chłonnych korelował ze spadkiem ich odsetka we krwi obwodowej ($6,7\% \pm 2,8$ do $3,9\% \pm 2,0$) oraz z brakiem zmian ilościowych w śledzionie. W przypadku obu badanych populacji komórek natężenie obserwowanych zmian osiągało wartość maksymalną w 3 dniu po zabiegu, a badane parametry powracały do wartości wyjściowych zazwyczaj już w 7 dniu po operacji. Stopień nasilenia zmian był związany z siłą przebytego urazu, o czym świadczy fakt, że zabieg laparotomii nie wywierał wpływu na rozmieszczenie obu populacji limfocytów T w badanych tkankach.

Obserwowane w następstwie gastrektomii zmiany w składzie procentowym limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ w narządach chłonnych jamy brzusznej oraz we krwi obwodowej mogą być wynikiem wędrówki badanych komórek w odpowiedzi na stres pooperacyjny. W związku z powyższym dokonano oceny ekspresji następujących molekuł adhezyjnych: LFA-1, ICAM-1, VLA-4 / $\alpha 4\beta 7$ oraz L-selektyny na powierzchni limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ węzłów chłonnych krezkowych. Niniejszy eksperyment wykazał, że zabieg chirurgiczny prowadzi do wzrostu ekspresji molekuł adhezyjnych na komórkach $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$, a zmiany ekspresji testowanych markerów są proporcjonalne do siły urazu.

W kolejnych eksperymentach dokonano oceny wpływu zabiegu operacyjnego na aktywność biologiczną limfocytów $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$. Ponieważ największe zmiany w dystrybucji komórek T pod wpływem zabiegu operacyjnego obserwowano w narządach chłonnych jamy brzusznej, to w kolejnych eksperymentach dokonano oceny zmian funkcjonalnych limfocytów T wyizolowanych z węzłów chłonnych krezkowych. Przeprowadzone doświadczenia, w których poddano hodowli *in vitro* komórki efektorowe pochodzące od myszy uprzednio immunizowanych haptenem, wraz z limfocytami T węzłów chłonnych krezkowych pochodzących od zwierząt poddanych gastrektomii lub laparotomii, pozwoliły na stwierdzenie, że zabieg gastrektomii prowadzi do indukcji komórek supresyjnych o fenotypie $T\gamma\delta$. Komórki te hamowały odpowiedź proliferacyjną *in vitro* za pośrednictwem wydzielanego

TGF- β , nie wykazując przy tym swoistości antygenowej. Zjawiska supresji odpowiedzi komórkowej *in vitro* nie obserwowano w przypadku komórek węzłów chłonnych krezkowych, pochodzących od myszy poddanych laparotomii.

Summary

Injury breaks anatomical barriers of the body and leads to cell and tissue destruction. In response to trauma a repair and defence mechanisms, involved in tissue repair, wound healing and prevention of infection, are induced.

The magnitude of trauma-induced response depends on the overall patient's condition and the severity of injury. Minor injury usually elicits local reaction, while severe trauma is associated with systemic host response. In any case the character of the response is very complex and involves activation of crucial systems (immunological, neural and endocrine).

The influence of different types of injury on immune response has been of interest to scientists for many years. Several studies have shown disturbance of innate and adaptive immune response as a consequence of burns, accidental trauma and surgical operation. It is well accepted that major surgery often leads to severe immunosuppression, which usually lasts for several days after injury, and is characterized by impaired cell-mediated immune response. Both clinical and experimental studies have demonstrated that one of the main causes of surgery-induced suppression of cellular immunity might be the shift in the T helper 1 (Th1) / Th2 patterns and type 1/ type 2 cytokine secretion towards TH2 response.

The type and extent of body's immune response to injury depends not only on functional changes of immune cells. Additionally, appropriate distribution of immune cells between different tissues and organs of the body is required for proper function of the immune system.

The aim of the present study was to characterize surgery-induced changes in distribution and immune function of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells. Presented data shows distinct changes in distribution pattern of both T cell populations after partial gastrectomy. There was significant decrease in percentage of $\alpha\beta$ T cells in mesenteric lymph nodes ($56,7\% \pm 15$ to $40,4\% \pm 17$), Peyer's patches ($38,4\% \pm 6,8$ to $21,2\% \pm 6,2$) and peripheral blood ($18,1\% \pm 0,8$ to $8,2\% \pm 1,7$) on the third day after partial gastrectomy. At the same time there were no significant changes in distribution of $\alpha\beta$ T cells in peripheral lymph nodes and in the spleen. In contrast the percentage of $\gamma\delta$ T cells in mesenteric lymph nodes ($2,7\% \pm 0,7$ to $8,8\% \pm 3,5$), Peyer's patches ($1,9\% \pm 0,5$ to $10,5\% \pm 0,3$) and peripheral lymph nodes ($4,6\% \pm 1,1$ to $9,0\% \pm 0,8$) was significantly increased on day 3. Simultaneously the percentage

of $\gamma\delta$ T cells in peripheral blood was decreased ($6,7\% \pm 2,8$ to $3,9\% \pm 2,0$), whereas no changes were observed in the spleen. The gastrectomy-induced changes in distribution of both T cells populations were most pronounced at day 3 after the surgery, whereas they disappeared almost completely on day 7. Laparotomy alone (sham operation) had no or a little effect on T cell numbers in all tested lymph organs. Hence the severity of the trauma may be of great importance.

The surgery-induced changes in distribution of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T lymphocytes in lymphoid tissue associated with gastrointestinal tract (mesenteric lymph nodes and Peyer's patches) and in peripheral blood may be a result of migration of tested cells in response to the injury. Hence the expression of following adhesion molecules on $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells of gastrectomized versus sham-operated mice was tested: LFA-1 (CD11a), VLA-4 / $\alpha 4\beta 7$ (CD49d), L-selectin (CD62L) and ICAM-1 (CD54). All adhesion molecules showed increased expression on both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and the magnitude of expression of tested markers was directly proportional to severity of the injury.

The next experiments showed the influence of surgery-induced trauma on biological activity of T cells. Since the most significant changes in distribution of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ cells were reported in lymph nodes associated with gastrointestinal tract, the changes in immune function of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes isolated from mesenteric lymph nodes of gastrectomized and sham-operated mice were tested. The data obtained from *in vitro* experiments showed suppressor activity of $\gamma\delta$ T lymphocytes isolated from MLN of gastrectomized mice. The gastrectomy-induced regulatory $\gamma\delta$ T cells suppressed proliferation of T effector lymphocytes *in vitro* via released TGF- β . The regulatory T cells were not induced in mesenteric lymph nodes of sham-operated mice.