

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

**LIGONIŲ, KURIEMS ATLIKTA ŠIRDIES PERSODINIMO OPERACIJA, KRAUJO T
(CD3⁺) LIMFOCITŲ MEMBRANOS ŽYMENU CD16/56, CD103, CD134 EKSPRESIJOS
POKYČIAI**

Magistrantė: JURGA BUMBLAUSKAITĖ

Darbo vadovas:

Dr. L. Jurgauskienė

VU MF dekanė

hab.dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

2008 06 02

SANTRUMPOS

Ag – antigenas

Ak – antikūnas

mAk – monokloninis antikūnas

APL – antigeną pateikianti ląstelė

CD (angl. cluster of differentiation) – leukocitų diferenciacijos antigenai

CTL – citotoksinis T efektorinis limfocitas

DN – dvigubai neigiamas

Fc (angl. fragment crystallizable) – antikūno molekulės dalis

FcR – receptorius antikūno Fc fragmentui

FITC – fluoresceino izotiocianatas

FKN – fraktalkinas

ICAM (angl. intercellular adhesion molecule) – viduląstelinė adhezijos molekulė

IFN – interferonas

Ig – imunoglobulinas

IL – interleukinas

KIR (angl. killer inhibitory receptor) – kilerius inhibuojantis receptorius

LAK – limfocitų aktyvuoti kileriai

LFA (angl. lymphocyte function – associated antigen) – su limfocitų funkcija susijęs antigenas

MCP (angl. monocyte chemoattractant protein) – monocitų chemoatraktantinis baltymas

MHC (angl. major histocompatibility complex) – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas

PE – fikoeritrinas

PMN - polimorfonuklearai

TCR (angl. T cell receptor) – antigenui specifinis T limfocitų receptorius

TGFβ (angl. transforming growth factor-β) – transformuojantis augimo faktorius-β

TNF (angl. tumor necrosis factor) – navikų nekrozės faktorius

VCAM (angl. vascular cell adhesion molecule) – kraujagyslių endotelio adhezijos molekulė

ŽLA – žmogaus leukocitų antigenai

TURINYS

SANTRUMPOS.....	2
1. ĮVADAS	5
2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	7
3. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
3.1. Širdies transplantacija	8
3.1.1. Širdies transplantatų atmetimas	8
3.1.2. Alotransplantato atmetimo reakcija.....	9
3.1.3. Širdies vainikinių kraujagyslių pažeidimai	11
3.1.4. Ląstelinis imuninis atsakas į transplantato vainikinių kraujagyslių pažeidimus	12
3.1.5. Humoralinis imuninis atsakas į transplantato vainikinių kraujagyslių pažeidimus.....	12
3.1.6. Transplantato tolerancija	13
3.2. Ląstelės ir molekulės dalyvaujančios imuniniame atsake prieš transplantatą.....	14
3.2.1. Natūralūs kileriai	14
3.2.2. Natūralių kilerių T limfocitai.....	15
3.2.3. CD4 ⁺ T limfocitai	17
3.2.4. CD8 ⁺ T limfocitai	17
3.2.5. CD103 molekulė.....	18
3.2.6. CD134 molekulė.....	18
3.2.7. Fraktalkinas	19
4. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI.....	21
4.1. Tiriamieji.....	21
4.2. Metodai.....	21
4.3. Medžiagos	24
4.4. Darbo eiga	25
5. REZULTATAI.....	27
6. REZULTATŲ APTARIMAS	32
7. IŠVADOS	34

LITERATŪROS SĀRAŠAS	35
SANTRAUKA.....	43

1. ĮVADAS

Po pirmosios širdies transplantacijos 1967 metais, ši operacija iš eksperimentinio gydymo tapo šiuolaikiniu, pažangiu sunkių širdies ligų gydymo būdu. Širdis šiuo metu yra trečias pagal dažnumą transplantuojamas organas JAV. UNOS (angl. *United Network for Organs Sharing*) duomenimis JAV kasmet atliekama 2700 širdies transplantacijos operacijų. Tyrimai rodo, kad pirmuosius metus po operacijos išgyvena apie 85% pacientų, pirmus trejus metus – 75% pacientų. ISHLT (angl. *International Society for Heart and Lung Transplantation*) registravimo duomenys rodo, kad šiuo metu pasaulyje gyvena apie 50 000 žmonių, turinčių širdies transplantatą [20].

Nepakankamas donorų skaičius skatina mokslininkus ieškoti alternatyvių širdies ligomis sergančių pacientų gydymo būdų. Šiuo metu daug dėmesio skiriama kamieninių ląstelių tyrimams ir galimam jų pritaikymui įvairiom ligom gydyti. Su eksperimentiniais pelių modeliais parodyta, kad kamieninės ląstelės, implantuotos į širdies raumenį, geba diferencijuotis į kardiomiocitus ir kraujagyslių endotelio ląsteles ir atkurti pažeistą raumenį. Tačiau publikuota ir nemažai nesėkmių, susijusių su kamieninių ląstelių terapija, pvz.: neprigyjimas implantuotoje vietoje, nepilna diferencijacija [59]. Žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių auginimas užtrunka, o gydymo dažnai prireikia tuoj pat [50]. Šios ir daug kitų problemų reikalauja daugybės tyrimų ir eksperimentų, todėl transplantacija kol kas išlieka pagrindiniu gydymo būdu, prailginančiu pacientų, sergančių širdies ligomis, gyvenimą.

Lietuvoje pirmoji širdies transplantacijos operacija atlikta 1987 m. Vilniaus universiteto Širdies chirurgijos klinikoje. 1987 – 2007 metais persodinti 56 širdies transplantatai. Lietuvoje gyvena 21 žmogus su širdies transplantatu (VUL SK LDC registras).

Šiuo metu endomiokardo biopsija išlieka pagrindiniu būdu vertinant širdies transplantato atmetimą ir parenkant adekvačią imunoterapiją. Tačiau biopsija yra invazyvi ir pavojinga paciento sveikatai procedūra [9], todėl šio darbo tikslas yra įvertinti galimus alternatyvius transplantato atmetimo nustatymo būdus vertinant tam tikrų limfocitų paviršiaus žymenų ekspresijos pokytį lignoniu po širdies transplantacijos kraujyje.

Gerai yra žinomas ir apibūdintas T ir B limfocitų vaidmuo sąlygojantis transplantatų atmetimą, tačiau klinikiniai duomenys ir eksperimentai su pelėmis nurodo, kad nors ir esant šių

limfocitų deficitui imunosupresijos fone, atmetimo reakcijos nevisada galima išvengti. Tai paskatino tyrėjus atlikti nuodugnesnius tyrimus, kurių metu buvo nustatytos įvairios imuninės ląstelės infiltruojančios transplantatą. Kai kurių ląstelių, tokių kaip T limfocitų, membranose ekspresuojančių CD16/CD56, CD103 ir CD134 molekules, vaidmuo atmetimo reakcijose nėra galutinai išaiškintas. Klinikiniai duomenys rodo šių limfocitų buvimą ligonių po širdies transplantacijos kraujyje, todėl yra rekomenduojama sekti šių ląstelių subpopuliacijų kitimą pooperaciniu laikotarpiu ir įvertinti jų pokytį esant transplantato atmetimui [41].

Pagrindinis šio darbo tikslas yra įvertinti T limfocitų ($CD3^+$), membranose ekspresuojančių CD16/56, CD103 ir CD134 molekules, pokytį ligonių, po širdies persodinimo operacijos, kraujyje.

2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Įvertinti ligonių, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija, kraujo T limfocitų membranos žymenų CD103, CD134, CD16/56 (NKT limfocitų) ekspresijos pokytį ir kiek šis pokytis gali perspėti apie gresiantį širdies transplantato atmetimą.

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Tėkmės citometrijos metodu nustatyti T limfocitų membranos paviršiaus žymenų CD16/CD56 ekspresiją ligonių po širdies transplantacijos kraujyje 10 dienų prieš transplantato atmetimą ir atmetimo dieną.
2. Tėkmės citometro pagalba nustatyti T limfocitų membranos paviršiaus žymens CD103 ekspresiją ligonių po širdies transplantacijos kraujyje 10 dienų prieš transplantato atmetimą ir atmetimo dieną.
3. Tėkmės citometro pagalba įvertinti T limfocitų CD134 membranos žymens ekspresiją ligonių po širdies transplantacijos kraujyje 10 dienų prieš transplantato atmetimą ir atmetimo dieną.
4. Tėkmės citometro pagalba įvertinti išvardytų T limfocitų paviršiaus žymenų ekspresiją sveikų žmonių periferiniame kraujyje. Gautus duomenis palyginti su transplantato atmetimo metu gautais tiriamų T limfocitų duomenimis.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. ŠIRDIES TRANSPLANTACIJA

Pirmoji širdies transplantacija atlikta 1967 metais, Lietuvoje – 1987 metais. ISHLT (angl. *International Society for Heart and Lung Transplantation*) registravimo duomenys rodo, kad šiuo metu pasaulyje gyvena apie 50 000 žmonių, turinčių širdies transplantatą [20], Lietuvoje – 21 (VUL SK LDC registras).

Priklausomai nuo donoro ir recipiento audinių antigeninių skirtumų, galimos kelios transplantacijos formos:

- autologinė: donoras ir recipientas yra tas pats asmuo;
- izogeninė (singeninė): donoras ir recipientas yra genetiškai identiški;
- alogeninė: donoras ir recipientas yra tos pačios rūšies individai;
- ksenogeninė: donoras ir recipientas yra skirtingų rūšių [1].

3.1.1. Širdies transplantatų atmetimas

Ar šeimininko imuninė sistema atpažins donoro organą kaip savą, priklauso nuo žmogaus leukocitų antigenų - ŽLA komplekso. ŽLA molekulės yra pagrindiniai transplantato aloantigenai, į kuriuos reaguoja T limfocitai, sąlygodami imuninį atsaką. Imuninės ląstelės atpažįsta net visai nedidelius skirtumus tarp svetimų peptidų junginio su nuosavomis ŽLA molekulėmis ir savų peptidų junginio su jomis [1].

Nors išgyvenamumas po persodinimo operacijų ir gerėja, bet pagrindiniai išgyvenamumą limituojantys veiksniai išlieka. Pati aktualiausia yra ankstyvo organo atmetimo problema. Šios problemos aktualumas priklauso nuo parinkto donoro suderinamumo recipientui. CTRD (angl. *Cardiac Transplant Research Database*) išanalizavo ir pateikė duomenis apie pagrindinius rizikos faktorius, įtakojančius ankstyvą donoro širdies transplantato atmetimą. Buvo išanalizuota 7283 atvejų iš 42 gydymo įstaigų per 10 metų ir nustatytas 241 pacientas su ankstyvu širdies transplantato atmetimu per pirmąsias 30 dienų po operacijos. Siekiant pagerinti pacientų išgyvenamumą po operacijų, buvo nustatyti šie pagrindiniai rizikos faktoriai parenkant donorą:

vyresnis donoro amžius, ilgesnis išemijos laikas iki organo persodinimo, netinkami donoro elektrokardiogramos duomenys, svorio skirtumas tarp donoro ir recipiento. Taip pat yra atsižvelgiama ir į daugelį kitų kriterijų, tokių kaip: bendrą donoro sveikatos būklę prieš transplantaciją ir kt. [22].

Recipientai taip pat turi atitikti keletą kriterijų prieš atliekant širdies transplantaciją:

- Amžiaus ribos: 12 – 65 metai. Stengiamasi neoperuoti jaunesnių nei 18m ir vyresnių nei 55m amžiaus pacientų dėl komplikuočiau po transplantacinės būklės ir trumpesnio išgyvenamumo [23], tačiau jei yra tinkamas donoras, persodinimai atliekami ir naujagymiams.
- VO_2 (angl. *oxygen consumption index*) > 14ml/kg kūno svoriui. Šis indeksas nurodo recipiento kraujotakos pajėgumą aprūpinti organizmo audinius deguonimi.
- Normalus plaučių arterijos spaudimas. Plautinė hipertenzija – vienas iš didžiausių rizikos faktorių, galintis sąlygoti dešiniojo širdies skilvelio nepakankamumą ir ankstyvą transplantato atmetimą.
- Bendra paciento sveikatos būklė. Esant virusiniams susirgimams (CMV, EB) ar augliams transplantacija nevykdoma dėl po transplantacijos taikomų imunosupresantų, kurie gali žymiai pabloginti paciento būklę [23].

Keli kiti rizikos faktoriai, ribojantys recipientų tinkamumą širdies transplantacijos operacijai: cukrinis diabetas, kepenų, inkstų ligos, tabako ir alkoholio vartojimas.

Yra aprašytos keturios pagrindinės mirties priežastys po širdies transplantacijos:

1. Ūmus širdies transplantato atmetimas dėl sukkelto imuninio atsako.
2. Citomegalo viruso (CMV) infekcija.
3. Širdies kraujagyslių ligos.
4. Limfomos, kiti piktybiniai navikai [20].

3.1.2. Alotransplantato atmetimo reakcija

Imuninių ląstelių taikiniai alotransplantate yra jo kraujagyslių endotelio ir parenchimos ląstelės. Transplantato atmetimą skirtingais mechanizmais sukelia:

- Recipiento $CD8^+$ T limfocitai, tiesiogiai lizuodami transplantato ląsteles.

- Recipientų $CD4^+$ T limfocitai telkiasi transplantate ir aktyvina makrofagus.
- Aloantikūnai jungiasi prie endotelio ląstelių ir aktyvina komplementą sukeldami kraujagyslių pažeidimus [1].

Skiriami trys transplantato atmetimo tipai: žaibiškas, ūminis ir lėtinis.

Žaibiškas (hiperūmus) atmetimas.

Išsivysto labai greitai, per pirmąsias 24 valandas. Recipientų kraujyje cirkuliuojantys antikūnai reaguoja su transplantato kraujagyslių endotelio aloantigenais. Susidarę imuniniai kompleksai aktyvina komplemento sistemą. Endotelis netenka savo antikoaguliacinių savybių ir pradeda gausiai sekretuoti Von Willebrando faktorių, kuris sukelia trombocitų adheziją ir agregaciją. Dėl krešėjimo faktorių aktyvinimo įvyksta transplantato kraujagyslių trombozė, sąlygojanti žaibišką transplantuoto organo atmetimą [1, 51]. Šis atmetimo tipas autorių duomenimis yra gana retas. Hanoverio medicinos universiteto duomenimis iš 524 atliktų širdies transplantacijos operacijų, tik 2 pacientams įvyko žaibiška organo atmetimo reakcija [29].

Ūminis atmetimas.

Tai imuninė organizmo reakcija į persodinto audinio/organo antigenus. Ūminis atmetimas dažniausiai pasireiškia visuose transplantatuose tik skirtingu laipsniu. Dėl didelio ŽLA molekulių polimorfiškumo yra beveik neįmanoma (išskyrus monozigotinių dvynių atvejus) parinkti donorą, kurio audinių paviršiaus antigenai visiškai atitiktų recipientų audinių paviršiaus antigenus. Šiuos skirtumus atpažinę T limfocitai diferencijuojasi ir migruoja į transplantatą. T limfocitai tiesiogiai sukelia endotelio lyžę arba išskiria citokinus, indukuojančius uždegimą, dėl kurio vystosi endotelio nekrozė [38, 43].

Lėtinis atmetimas.

Lėtinis transplantuoto organo atmetimas yra pagrindinė vėlyvo transplantato netekimo priežastis [30]. Jį sukelia audinio fibrozė, ko pasekoje prarandama normali persodinto organo struktūra. Lėtinis atmetimas gali pasireikšti po kelių mėnesių ar kelerių metų. Fibrozės procesą sąlygoja aktyvuoti makrofagai, t. y., jų sintetinas lygiųjų raumenų ląstelių augimo faktorius.

Šis faktorius skatina kraujagyslių intimos lygiųjų raumenų proliferaciją ir sukelia kraujagyslių okliuziją, ko pasekoja formuojasi išemijos židiniai [1, 28].

Po organų transplantacijos gali pasireikšti dar vienas tipas imuninių reakcijų, sukeliančių nepageidaujamą poveikį recipientui, tai transplantato prieš šeimininką liga (GVHD; angl. *graft-versus-host disease*). Dažniausiai pasitaiko po kaulų čiulpų transplantacijos [33]. Ši reakcija gali pasireikšti gydant recipientą imunosupresantais. Tokiu atveju šeimininko imuninė sistema nepajėgia atmesti donoro ląstelių. Proceso metu donoro T limfocitai reaguoja į mažuosius audinių suderinamumo antigenus. Skiriamos:

- Ūminė GVHD. Jos metu sukeliami epitelio nekrozė odoje, tulžies latakėliuose ir virškinamajame trakte.
- Lėtinė GVHD. Organai - taikiniai yra tie patys kaip ir ūmios GVHD atveju, tik vystosi šių organų fibrozė ir atrofija [46]. Lėtinė GVHD yra viena dažniausių vėlyvo mirtingumo priežasčių po transplantacijos operacijų [33].

GVHD yra inicijuojama donoro T_H limfocitų. Aktyvuoti jie pradeda sintetinti IL-2, kuris aktyvina NK ląsteles, CD8⁺ T limfocitus ir makrofagus. Pirmosios dvi tiesiogiai pažeidžia šeimininko kraujagyslių endotelį sukeldamos ląstelių lyzę [1]. Ne ką mažiau svarbus yra navikų nekrozės faktorius - TNF. Sąveikaudamas su TNF receptoriumi jis gali sukelti šeimininko ląstelių apoptozę, taip pat jis sustiprina IL-2 sintezę T_H limfocituose. TNF gali sintetinti NK ląstelės, CD8⁺T limfocitai ir makrofagai [17].

3.1.3. Širdies vainikinių kraujagyslių pažeidimai

Viena didžiausių problemų, sąlygojanti net 2/3 visų širdies transplantato atmetimų pirmaisiais metais po transplantacijos, yra vainikinių kraujagyslių pažeidimai (VKP) (angl. *CAV-Cardiac Allograft Vasculopathy*). Apie 50% pacientų, išgyvenusių penkerius ar daugiau metų, taip pat aptinkama VKP [7]. Širdies kraujagyslių patogeniniai pakitimai yra daugiapakopis procesas, kurį sąlygoja daugybiniai imuniniai ir neimuniniai veiksniai. Pagal pažeidimo pobūdį yra skiriami 3 pažeidimo tipai:

- A tipas, kuriam būdingi pavieniai pažeidimai. Daugiau nei pusės pacientų koronarai po transplantacijos yra pažeisti ateromų.
- B tipas. Būdingas kraujagyslių intimos sustorėjimas.
- C tipas. Būdingi difuziniai koronarų susiaurėjimai [54].

Vainikinių kraujagyslių endotelio vaidmuo transplantato atmetime

Donoro kraujagyslių endotelio ląstelės pirmos susiduria su recipiento imunine sistema. Endotelio ląstelės gali būti aktyvuojamos įvairių faktorių: operacijos metu sukulto kraujagyslių pažeidimo, išemijos, citomegalo viruso infekcijos, ciklosporino toksinio poveikio. Aktyvuotos endotelio ląstelės ekspresuoja adhezijos molekules (VCAM-1, ICAM-1, E-selektinus), citokinus (VEGF, MCP-1, IL-8), T ir B limfocitus aktyvuojančias molekules [37]. Tuo tarpu aktyvuoti CD4⁺ ir CD8⁺ T limfocitai skatina atitinkamai ŽLA II ir ŽLA I klasės molekulių ekspresiją donoro kraujagyslių endotelio ląstelių paviršiuje. Visa tai didina transplantato atmetimo tikimybę [54].

3.1.4. Ląstelinis imuninis atsakas į transplantato vainikinių kraujagyslių pažeidimą

Atliekant eksperimentus su graužikais, pažeistų transplantato kraujagyslių vietoje buvo identifikuotos CD4⁺, CD8⁺, NK, dendritinės ląstelės ir makrofagai. Tame pačiame eksperimentiniame modelyje buvo parodyta, kad CD4⁺ ląstelių deficitas sumažindavo koronarų pažeidimus, bet visiškai nepašalindavo transplantato atmetimo problemos [53, 54].

3.1.5. Humoralinis imuninis atsakas į transplantato vainikinių kraujagyslių pažeidimą

Humoralinį imuninį atsaką sąlygoja antikūnų sintezė ir jų sukeltas antigeno sunaikinimas. Ak sintetina subrendę ir aktyvuoti B limfocitai. Signalą B limfocitų proliferacijai teikia ir Ag, ir T efektoriniai helperiai. Žaibiškame transplantato atmetime dalyvauja IgM klasės Ak, o ūmiame IgG klasės Ak [1]. Eksperimentais su pelėmis buvo įrodyta, kad eksperimentiniai gyvūnėliai su B limfocitų deficitu išvengė greito transplantato atmetimo [54].

3.1.6. Transplantato tolerancija

Nors operacinė technika ir imunosupresinis gydymas nuo pirmos transplantacijos operacijos žymiai patobulėjo, tačiau pagrindinė imunotolerancijos problema vis dar riboja ilgesnį potransplantacinį išgyvenamumą. Taikoma imunoterapija dažnai padidina infekcinių ar piktybinių susirgimų riziką, todėl daug dėmesio skiriama ieškant specifiškesnių imunosupresijos būdų į transplantato antigenus [14]. Šiam tikslui buvo kūrimai gyvūnų modeliai ir šiai dienai jau yra žinoma, kad natūrali organizmo imunotolerancija galima bent trimis būdais:

1. Klonų delecija. Vyksta užkrūčio liaukoje.
2. Klonų anergija. Vyksta limfiniuose, audiniuose.
3. Imunosupresija reguliacinių limfocitų pagalba (periferiniuose imuninės sistemos orgauose) [26].

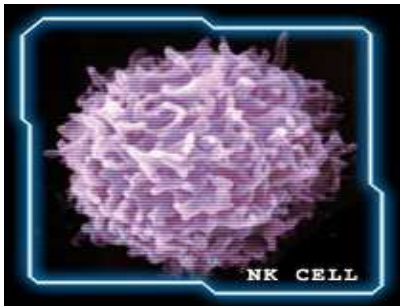
Daugiausiai dėmesio mokslininkai skyrė trečiajam imunotolerancijos būdai. Jau 1995 metais buvo parodyta, kad egzistuoja $CD4^+$ T limfocitai savo membranoje turintys IL-2 receptoriaus α grandinę ($CD25^+$ molekulę) ir galintys reguliuoti autoreaktyvius T limfocitus *in vivo* [47]. Šių ląstelių reguliacinis poveikis pasireiškia per citokinų IL-10, TGF- β , IL-4, IL-5 ir IFN- γ gamybą [58].

Pradėta tirti reguliacinių T limfocitų įtaka potransplantaciniam išgyvenamumui. Pastebėta, kad atlikus transplantaciją, kraujyje jie aptinkami jau po trijų mėnesių ir geba išlikti cirkuliacijoje ilgą laiką, net ir imunosupresinių vaistų poveikyje [2]. Be $CD4^+ CD25^+$ limfocitų, dar išaiškinti ir $CD4^+ CD25^-$, $CD8^+ CD28^-$, NK, NKT, dendritinės ląstelės, DN T limfocitai pasižymintis reguliaciniu poveikiu ir imuninio atsako slopinimu po organų persodinimo operacijų [26, 62].

Didžiausias vaidmuo imunotolerancijoje tenka citokinui IL-10. T_h2 ir NKT limfocitai sekretuodami šį citokiną slopiną kai kurių kostimuliuojančių molekulių gamybą dendritinėse ląstelėse. Pastarosios taip pat pradeda sintetinti didesnius IL-10 kiekius ir aktyvuoja $CD4^+ CD25^+$ reguliacinius limfocitus [62]. Šios ląstelės, manoma, slopina aktyvuotus T limfocitus sekretuodamos didelius IL-10 ir TGF- β kiekius arba tiesiogiai “ląstelė-ląstelė” kontakto dėka slopindamos IL-2 gamybą ir taip stabdydamos tolesnę T limfocitų aktyvaciją [52, 55].

3.2. LAŠTELĖS IR MOLEKULĖS DALYVAUJANČIOS IMUNINIAME ATSAKE PRIEŠ TRANSPLANTATĄ

3.2.1. Natūralūs kileriai



Pav.1 Skanuojančiu elektroniniu mikroskopu daryta NK ląstelės nuotrauka [57].

Natūralieji kileriai (NK) – imuninių ląstelių subpopuliacija kraujyje ir limfiniame audinyje (Pav.1). Subręsta kaulų čiulpuose. NK ląstelės sudaro apie 10% cirkuliuojančių limfocitų populiacijos. Jos neturi T ir B limfocitams būdingų žymenų (CD3, CD19, CD20).

NK ląstelių paviršiuje yra adhezijos molekulių (CD2, CD56, LFA-1) ir receptoriai (NKR-P1, KIR, CD16 (FcγRIII)), kurie sąveikauja su ligandais ląstelių - taikinių paviršiuje. NK ląstelės taip pat ekspresuoja IL-2Rβ subvienetą, IL-15Rα subvienetą, citokinų INFα, INFβ, INFγ ir IL-12 receptorių [1].

NK ląstelės gauna signalus iš dviejų receptorių. Pirmasis - NKR-P1 - lektinas sąveikaudamas su ligandu (įvairiais oligosacharidais ląstelių paviršiaus membranose) sukelia NK ląstelių granulių egzocitozę, antrasis – KIR, sąveikauja su MHC I klasės molekulėmis susijungusiomis su ląstelės nuosavais peptidais. NK ląstelės gali aktyvinti ir IgG1 ar IgG3 poklasių antikūnai savo Fc fragmentu jungdamiesi prie FcγRIII receptoriaus. Jie sukelia NK ląstelių degranuliaciją. Ši reakcija vadinama nuo antikūnų priklausomu ląstelių citotoksiškumu.

NK ląstelių citoplazmoje yra granulės, kuriose randama dviejų rūšių citotoksinai: perforinai ir granzimai. Perforinas polimerizuojasi ląstelės taikinio paviršiaus membranoje ir sukelia osmosinę ląstelės žūtį. Veikiant granzimams indukuojama ląstelės apoptozė [1].

Pagrindiniai NK ląstelių taikiniai yra virusų infekuotos ir auglių ląstelės [15]. Taip pat jos dalyvauja imuniniame atsake prieš transplantatą [44]. Remiantis eksperimentų rezultatais, buvo parodyta, kad NK ląstelės transplantato atmetime dalyvauja tiesiogiai, tam tikrų chemokinių (fraktalkino, CC) pagalba pažeisdamos donorinio organo endotelio ląsteles [21, 36], ir netiesiogiai, stimuliuodamos T limfocitų imuninį atsaką esant CD28-/- deficitui [48, 61].

Išskirdamos citokinus, jos skatina T limfocitų proliferaciją [19], taip pat stimuliuoja dendritinių ląstelių (DL) subrendimą sąveikaudamos su jų paviršiuje ekspresuojamomis MHC I klasės molekulėmis. DL, kaip APL, sukelia T limfocitų atsaką [39].

NK ląstelių aktyvumui didelės įtakos turi citokinai. Virusai, patekę į ląsteles, sukelia $INF\alpha$ ir $INF\beta$ sintezę, jų veikiami makrofagai išskiria IL-12 ir IL-15, kurie aktyvina natūralių kiliarių ląsteles. T helperių išskiriamas IL-2 taip pat stimuliuoja NK ląstelių augimą ir citolizinių aktyvumą, jų virtimą limfocinų aktyvintais kileriais - LAK [1].

3.2.2. Natūralių kiliarių T limfocitai

Natūralių kiliarių T limfocitų (NKT) populiacija buvo aptikta kaip neįprasti limfocitai ekspresuojantys ar neekspresuojantys CD4 ir CD8 paviršiaus žymenys [3, 5], produkuojantys didelius IL-4, IL-10, IL-13 ir $INF-\gamma$ kiekius, galintys palaikyti imunoglobulinų gamybą ir inhibuoti kai kuriuos citokinus dalyvaujančius uždegime. NKT limfocitai paprastai atpažįstami pagal NK ląstelių NKR-P1 (NK1.1 pelėse) žymenį ir pagal TCR, savo sudėtyje turintį CD3 molekulę, arba $TCR\alpha$ grandinę ($V\alpha 24-J\alpha Q$ žmogaus organizme ir $V\alpha 14-J\alpha 281$ pelių ir žiurkių organizmuose) [11, 31].

Šiuo metu pelėse jau išskirti du NKT ląstelių tipai:

- I NKT limfocitai sintetina nekintamą $V\alpha 14-J\alpha 281$ grandinę. Šiam tipui priskiriamos dvi NKT populiacijos: CD4 žymenį turinčios ir dvigubai neigiamos ($CD4^-CD8^-$) NKT ląstelės. Pirmosios ląstelės sekretuoja T_H2 limfocitams būdingus citokinus, o antrosios - T_H1 būdingus citokinus [35]. Abi populiacijos CD1d molekulės pagalba atpažįsta sintetinį glikolipidą α -galaktozilceramidą (α -Gal-Cer) ir taip gali būti aktyvuojamos.
- II NKT taip pat yra CD1d apribotos, bet jos neatpažįsta α -Gal-Cer [32].

NKT ląstelėms priskiriami ir CD3, CD16/56 paviršiaus žymenis ekspresuojantys limfocitai. Šios ląstelės yra CD1d apribotos, tačiau, skirtingai negu kitos NKT subpopuliacijos, manoma, kad šios ląstelės gali veikti organizmą žalingai. Tyrimai su vienos Afrikos genties žmonėmis, sergančiais *Salmonella* infekcija, parodė, kad mirusiųjų periferiniame kraujyje buvo aptiktas didesnis NKT limfocitų kiekis negu sirgusių, bet pasveikusių, pacientų kraujyje. Todėl

buvo padaryta išvada, kad šis NKT limfocitų poklasis gali turėti ir neigiamą poveikį žmogaus organizmui [27].

NKT ląstelės pradeda bręsti užkrūčio liaukoje. Eksperimentinių pelių modelių pagalba parodyta, kad šiame organe jos pereina teigiamą ir neigiamą selekciją bei įgauna TCR α paviršiaus žymenį. Galutinai NKT limfocitai subręsta periferijoje ir pradeda ekspresuoti IL-7R, CD24, DX5, Ly49 molekules [42].

Šiuo metu aprašytos keturios NKT ląstelių funkcijos:

1. Geriausiai yra ištirtas jų vaidmuo dalyvaujant imuniniame atsake prieš mikobakterijų lipidinius, glikolipidinius antigenus. Antigeną, sujungtą su CD1d molekule, atpažįsta V α 24-J α Q receptorius [32]. Pelių NKT ląstelės sukelia atsaką į mikobakterijas didindamos INF γ sintezę (uždegiminis citokinas) [10].
2. NKT ląstelės atlieka svarbų vaidmenį sąlygodamos imuninį atsaką prieš navikines ląsteles. Šiam atsakui svarbūs IL-12 ir INF γ [42].
3. NKT limfocitai svarbūs išvengiant autoimuninių ligų, nes ekspresuoja IL-10.
4. Ne mažiau svarbi reguliacinė funkcija. NKT ląstelės per CD1d molekulę gali sąveikauti su dendritinėmis ląstelėmis ir taip reguliuoti jų imuninį atsaką į tam tikrus antigenus [42].

Visai neseniai susidomėta NKT ląstelių vaidmeniu dalyvaujant imuniniame atsake prieš transplantatą. Eksperimentais su pelių modeliais parodyta, kad NKT limfocitai į širdies transplantatą yra pritraukiamos sąveikaujant jų ekspresuojamam chemokinui CXCR6 su endotelio ląstelių sekretuojamu ligandu CXCL16. Po aktyvacijos per V α 14 grandinę ar IL-12 ir IL-18 citokinus, NKT ląstelės pradeda gausiai sekretuoti IL-10. Šis citokinas veikia dendritines ląsteles mažindamas kostimuliuojančių molekulių ekspresiją jose ir didindamos IL-10 sintezę. Galiausiai tokiu būdu yra aktyvuojami reguliatoriniai T limfocitai, kurie slopina imuninį atsaką į transplantatą [62].

3.2.3. CD4⁺ T limfocitai



Pav.2 Skanuojančiu elektroniniu mikroskopu daryta CD4⁺ T limfocito nuotrauka [16].

CD4⁺ T limfocitai (2 pav.) subręsta čiobrialiaukėje. Čia jie savo paviršiuje įgauna TCR, CD3, CD28 ir CD4 molekules ir yra vadinami naiviaisiais CD4⁺ T limfocitais. Jų aktyvavimas vyksta periferiniuose imuniniuose organuose - limfiniuose mazguose. Proliferacijai ir diferencijacijai yra reikalingi du aktyvinimo signalai: pirmasis signalas yra TCR sąveika su Ag sujungtu su ŽLA II klasės molekulėmis esančiomis antigeną pateikiančių ląstelių paviršiuje, o antrasis signalas yra CD28 molekulės, esančios CD4⁺ T limfocitų membranoje, sąveika su B7 molekule esančia APL paviršiuje. Pastarasis signalas yra būtinas IL-2 ir IL-2R sintezei. Šie citokinai yra atsakingi už T limfocitų proliferaciją ir diferencijaciją [6].

CD4⁺ T limfocitų diferencijacija vyksta dviem kryptimis. INF γ ir IL-12 pakreipia diferencijaciją T_H1 linkme. Šių citokinų šaltinis yra aktyvuoti makrofagai ir NK ląstelės. IL-4 sąlygoja diferencijaciją T_H2 kryptimi. Manoma, kad IL-4 šaltinis gali būti NKT ląstelės. T_H1 turi įtakos makrofagų, CD8⁺ T limfocitų, NK ląstelių funkcijai, gali aktyvinti neutrofilus, endotelio ląsteles. T_H2 taikynys – B limfocitai, T_H2 svarbūs jų proliferacijai ir diferencijacijai į plazmines ir B atminties ląsteles [1].

Akcentuojamas svarbus CD4⁺ T limfocitų vaidmuo ir transplantato ūmiame atmetime. CD4⁺ T limfocitai gali sąveikauti su donoro aktyvuotų dendritinių ląstelių paviršiuje esančiomis arba donoro endotelio ląstelių paviršiuje ekspresuojamomis MHC II [12] klasės molekulėmis ir sukelti imuninį atsaką prieš transplantatą [49].

3.2.4. CD8⁺ T limfocitai

CD8⁺ T limfocitai, kaip ir CD4⁺ T limfocitai, subręsta čiobrialiaukėje, o aktyvinami limfiniuose mazguose. Aktyvinimo metu pirmas signalas gaunamas naiviųjų CD8⁺ T limfocitų TCR sąveikaujant su Ag sujungtu ŽLA I klasės molekulėmis APL paviršiuje. Antras signalas

gaunamas CD28 ir B7 molekulių sąveikos metu. Po aktyvavimo signalo gavimo, CD8⁺ T limfocitai pradeda sekretuoti IL-2, kuris, taip pat kaip ir CD4⁺ T limfocituose, veikia autokriniškai ir inicijuoja CD8⁺ T limfocitų proliferaciją ir diferencijaciją į citotoksinius T limfocitus [1].

CD8⁺ T efektoriai atpažįsta ir sunaikina virusų infekuotas ir naviko ląsteles [1]. Eksperimentais įrodytas jų vaidmuo imuniniame atsake prieš transplantatą. CD8⁺ T limfocitai atpažįsta donoro ląstelių paviršiuje esančias MHC I klasės molekules ir diferencijuojasi į CTL. Pastarieji gali sukelti transplantato endotelio lyzę [40] arba sekretuodami INF γ – PMN infiltraciją į transplantatą [49].

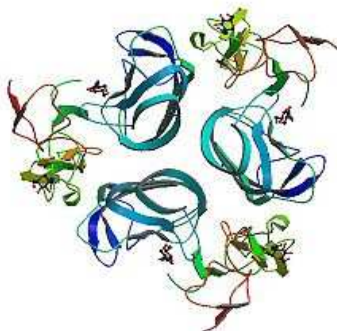
Pagrindiniai ląstelių pažeidimo mediatoriai yra CTL granulėse. Tai baltymas perforinas, kuris geba įsiterpti ir polimerizuotis ląstelės taikinio membranoje ir sukelti osmosinę ląstelės lyzę, bei serininės proteazės – granzimai. Manoma, kad jie aktyvina endogeninį apoptozės kelią, kurio metu sukeliama DNR fragmentacija [1].

3.2.5. CD103 paviršiaus žymuo

CD103 yra CD8⁺ T efektorinių limfocitų ekspresuojamas integrinas, kurio specifinis ligandas yra epitelio ląstelių sintetinė E-kaderino molekulė. Sąveikaudami per šį ligandą CD103⁺CD8⁺ T limfocitai dalyvauja transplantato epitelinių ląstelių destruktijoje [25]. CD103 ekspresijai CTL paviršiuje turi įtakos citokinas TGF- β [18]. Nemažai eksperimentų atlikta su inkstų transplantatais. Šiame organe gausu epitelinių ląstelių. Buvo įrodyta, kad CD103 ekspresija prasideda tik po to, kai recipiento CTL patenka į donorinį inkstą ir čia vietiškai yra veikiami TGF- β molekulių [13]. Duomenų apie CD103⁺CD8⁺ T limfocitus, infiltruojančius širdies audinius, kol kas nėra.

3.2.6. CD134 paviršiaus žymuo

CD134 (OX40) yra receptorių priklausantis tumoro nekrozės faktorių receptorių superšeimai (3 pav.). CD134 sąveikauja su ligandu CD134L, ekspresuojamu aktyvuotų APL paviršiuje. CD134 yra ekspresuojamas aktyvuotų CD4⁺ T limfocitų, B limfocitų, dendritinių



3 pav. TNF šeimos receptoriai [24].

ląstelių ir aktyvuoto kraujagyslių endotelio paviršiuje. T limfocitų paviršiuje šis glikoproteinas pradeda sintetinti 24 – 72 valandų bėgyje po $CD4^+$ T limfocitų sąveikos su antigenais [24] ir yra svarbus šių ląstelių proliferacijai, aktyvumui ir išgyvenamumui [63]. $CD134/CD134L$ sąveikos dėka yra inicijuojama antiapoptozinių genų transkripcija ir baltymų (Bcl-xL, Bcl-2) sintezė T limfocituose. $CD3^+CD134^+$ limfocitų vaidmuo autoimuninėse ligose yra pakankamai gerai

išstudijuotas, bet jų vaidmuo transplantato atmetime nėra galutinai išaiškintas [4]. Eksperimentiniuose modeliuose su pelėmis parodyta, kad užblokavus monokloniniais antikūnais $CD134L$ ir B7 molekules, galima prailginti pelių, kurioms atlikta širdies transplantacija, išgyvenamumą [63].

3.2.7. Fraktalkinas

Plačiai yra ištirtas žmogaus chemokinas – fraktalkinas (FKN). Jam būdinga hibridinė chemokininė/mucininė transmembraninė struktūra (chemokino domenas + mucino stiebas). FKN išskiria aktyvuotos kraujagyslių endotelio ląstelės. Jis skatina leukocitų aktyvaciją bei jų adheziją prie endotelio. FKN sąveikauja su jam homologiniu CX_3CR1 receptoriumi ir sąlygoja monocitų, $CD8^+$ T limfocitų bei aktyvuotų NK ląstelių adheziją prie endotelio [45].

Tiriant padidėjusią FKN ekspresiją aktyvuoto endotelio paviršiuje, buvo pasitelktos eksperimentinės pelės su širdies transplantatu.

Tyrimais buvo įrodyta, kad:

1. Tik nežymus FKN kiekis buvo aptiktas tame organizme kur transplantato atmetimas nevyko ir didesnė ekspresija užfiksuota progresuojant atmetimo procesui.
2. FKN ekspresija padidėja kai kraujagyslių endotelio ląstelės yra aktyvuojamos $TNF\alpha$ molekulėmis. Pastarojo daug sintetinama transplantato atmetimo metu.
3. Gydant peles antikūnais prieš CX_3CR1 receptorių, žymiai padidėjo recipientų išgyvenamumas po transplantacijos [36].

Eksperimentų rezultatai parodė, kad, nors ir esant visiškam MHC nesuderinamumui tarp donoro ir recipiento, taikant anti-CX₃CR1 antikūnų terapiją galima buvo sumažinti širdies ar kitų transplantatų atmetimo riziką [36].

4. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI

4.1. Tiriamieji

Tiriamoji medžiaga buvo surinkta 2006-2008 metais VšĮ Vilniaus Universiteto ligoninės "Santariškių klinikos" Širdies chirurgijos klinikoje. Tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto ligoninės "Santariškių klinikos" Laboratorinės diagnostikos centro (VUL SK LDC) Klinikinės imunologijos laboratorijoje. Tirta 21 ligonių, kuriems buvo atlikta širdies persodinimo operacija. Tarp jų buvo 4 moterys ir 17 vyrų nuo 8 iki 54 metų amžiaus ($40,6 \pm 13,9$). Siekiant įvertinti kraujo T limfocitų CD16/56, CD103, CD134 paviršiaus žymenų ekspresijos pokyčius, buvo atrinkti 9 asmenys, kuriems buvo patvirtintas ūmus atmetimas. Šiems pacientams tėkmės citometro pagalba įvertinta tiriamų limfocitų paviršiaus molekulių ekspresija 10 dienų prieš atmetimą ir atmetimo dieną. Taip pat ištirta 29 sveikų asmenų grupė. Kontrolinės asmenų grupės (kraujo donorų) tiriamoji medžiaga surinkta VUL SK Kraujo centre. Ją sudarė 8 moterys ir 21 vyras, kurių amžius buvo nuo 19 iki 43 metų ($26,7 \pm 6,3$). Demografiniai tiriamųjų duomenys pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Demografiniai tiriamųjų duomenys.

Tiriamųjų grupė	Lytis	n	Amžius
Kontrolinė, sveikų asmenų, grupė	Moterys	8	$28,6 \pm 5,1$
	Vyrai	21	$26,0 \pm 6,7$
Pacientai, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija	Moterys	4	$32,0 \pm 17,5$
	Vyrai	17	$42,1 \pm 13,2$
Pacientai, kuriems įvyko transplantato atmetimas	Moterys	1	14
	Vyrai	8	$32,5 \pm 17,6$

4.2. Metodai

Tėkmės citometrijos metodas

Citometrija pagrįsta keliais principais:

1. Hidrodinaminiu ląstelių, tekančių nešančiojo skysčio srovėje, fokusavimu, dėl kurio ląstelės išsirikiuoja viena paskui kitą prieš kirsdomos lazerio spindulį. Šį principą užtikrina tėkmės citometro slėgio ir skysčių sistemos.
2. Monochrominės lazerio šviesos sklaida, kurios pagalba įvertinamas ląstelės dydis (pagal priekinę spindulio sklaidą) ir grūdėtumas (pagal šoninę spindulio sklaidą).
3. Fluorochromų sužadiniu ir skirtingų bangos ilgių šviesos emisija. Monochrominė lazerio šviesa gali vienu metu sužadinti skirtingus fluorochromus ir suteikia informaciją apie kelis ląstelių požymius.

Keliaudamos per citometro tėkmės kamerą, ląstelės kerta argono jonų lazerio šviesą ir ją išsklaido. Fiksuojamas išsklaidymas 90° ir 180° kampu, o kartu sužadunami ant ląstelės prikibę fluorochromai, kurie išspinduliuoja skirtingo bangos ilgio šviesą. Ją fiksuoja detektorius ir paverčia signalą kompiuteriui suprantamu, kad galėtų vykti analizė. Lazerio spindulio kryptimi į priekį matuojama priekinė šviesos sklaida, o 90° kampu matuojama šoninė šviesos sklaida. Priekinės šviesos sklaidos signalas pirmiausia priklauso nuo dalelių ar ląstelių dydžio, o šoninės šviesos sklaidos signalas rodo vidinę struktūrą, citoplazmos grūdėtumą, branduolio tankį.

Išspinduliuota fluorescentinė šviesa optiškai surenkama 90° kampu ir priklausomai nuo išspinduliuotos šviesos bangos ilgio, šviesa dikrotinių veidrodžių suskaldoma į 2 ar 3 spindulius.

Tėkmės citometrijoje naudojama monochrominė šviesa patogi tirti fluorochromais žymėtas struktūras. Tyrimo specifiškumas nustatant dominančias struktūras pasiekiamas monokloniniais antikūnais, kurių Fc fragmentas sujungtas su fluorochromais. Dauguma tėkmės citometrų vienu metu gali nustatyti tris, keturis ir daugiau fluorochromų. Dažniausiai naudojami: FITC, PE, cianinas, peridinochlorofilo proteinas (PerCP).

Laužta ar fluorescentinė šviesa matuojama šviesos nustatymo prietaisais – fotodiodais ar fotodaugintuvais, kurie paverčia šviesą elektriniu signalu. Elektrinio signalo dydis yra proporcingas nustatytos šviesos kiekiui, kuris fluorescentinės šviesos atveju susijęs su švytinčių molekulių skaičiumi. Kiekvienos ląstelės ar dalelės signalas, išmatuotas skirtingais šviesos nustatymo įrenginiais, perdirbamas ir siunčiamas į kompiuterį. Tėkmės citometrija leidžia greitai

gauti informaciją apie didelį ląstelių skaičių (250 – 4000 ląst./s). Matavimo metu gaunama daug informacijos, todėl reikia specialios programinės įrangos [8] (4 pav.).



4 pav. Tėkmės citometro įranga [58].

Paprastai įvertinama 5-10 tūkstančių ląstelių ir gaunami 5-6 skirtingi kiekvienos ląstelės parametrai. Parametrų rezultatai gali būti pateikiami ir analizuojami naudojant histogramas arba nubrėžiant dviejų skirtingų parametrų diagramas vieną priešais kitą, pavyzdžiui, brėžinyje pažymint taškus ar kontūrus. Lizuoto kraujo ląstelių taškinės diagramos leidžia atskirti limfocitus, monocitus ir granulocitus. Galima analizuoti visas ląsteles arba tik dominančią populiaciją. Pastaruoju atveju ląstelės atrenkamos apibrėžiant regioną (angl. *gate*) apie tiriamas ląsteles histogramoje ar taškinėje diagramoje. Priekinės šviesos sklaidos ir šoninės šviesos sklaidos taškinėse diagramose ląstelių populiacijos atskiriamos pagal šviesos sklaidos pobūdį ir naudojamos ląstelėms fenotipuoti. Atrinktos į regioną ląstelės toliau gali būti tiriamos siekiant nustatyti kitus parametrus. Specialiomis programomis tėkmės citometru objektyviai apskaičiuojamas fluorescencijos intensyvumas.

4.3. Medžiagos

Reagentai ir priemonės:

1. Vienkartiniai polipropileno Falcon 12 x 75 mm citometrijos mėgintuvėliai.
2. Sukūrinė purtyklė *Vortex*.
3. Mikropipetė su vienkartiniais antgaliais.
4. Dejonizuotas vanduo.
5. Laboratorinių skysčių talpos.
6. Centrifūga.
7. Darbinis lizuojantis tirpalas (FASC lysing solution).
8. Plaunantis buferis (PBS)
9. Paraformaldehido tirpalas ląstelių membranų fiksavimui.
10. Monokloniniai antikūnai, žymėti dviem skirtingais fluorochromais: FITC ir PE (Becton Dickinson, JAV) (2 lentelė).

2 lentelė. Monokloninių antikūnų charakteristika

mAk pagal CD klasifikaciją	Konjūguotas fluorochromas	Specifiškumas
CD3	FITC	T limfocitų žymuo
CD4	PE	T helperių žymuo, silpniau ekspresuojamas ir monocitų/makrofagų
CD8	PE	CTL žymuo, silpniau ekspresuojamas ir dalies natūralių kilių
CD25	PE	IL-2 receptoriaus α grandį ekspresuojantys limfocitai
CD16/56	PE	Natūralių kilių žymuo, ekspresuoja ir NKT limfocitai
CD103	PE	CTL efektorių žymuo
CD134	PE	T helperių efektorių žymuo, taip pat ekspresuoja aktyvuoti B limfocitai, dendritinės ląstelės
ŽLA-DR	PE	B limfocitų, monocitų/makrofagų, NK, aktyvintų T limfocitų žymuo
CD14	PE	Monocitų/makrofagų žymuo
CD45	FITC	Bendras leukocitų žymuo
α_1 (IgG ₁)	FITC	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės
α_{2a} (IgG _{2a})	PE	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės

4.4. Darbo eiga

Tiriamosios medžiagos surinkimas

Periferinis kraujas buvo imamas į sterilius vakuuminius mėgintuvėlius žaliu kamšteliu su ličio heparinu.

Limfocitų žymėjimas monokloniniais antikūnais

1. 25µl gerai sumaišyto nesukrešėjusio kraujo mėginiai pažymėtuose (Falcon 12 x 75 mm) mėgintuvėliuose inkubuojami su 5µl atitinkamu mAk kambario temperatūroje 15min. tamsoje.
2. Po inkubavimo į mėgintuvėlius pridedama po 1ml paruošto FACS lizavimo tirpalo. Mėginius sumaišome purtykle *Vortex* 3s. Inkubuojame 5-7min. kambario temperatūroje, tamsoje.
3. Po inkubacijos mėgintuvėlis centrifuguojamas (1500 apsisukimų/min. greičiu) 7min. Supernatantas nupilamas.
4. Į mėgintuvėlį pilama 1ml PBS, sumašoma (*Vortex*) ir centrifuguojama (1500 apsisukimų/min. greičiu) 7min.
5. Supernatantas nupilamas paliekant apie 50µl nuosėdų dugne.
6. Užpilama 300µl 1% paraformaldehido tirpalo.
7. Mėginys paruoštas citometrinei analizei.
8. Fiksuotos ląstelės stabilios 24val. Iki vertinimo uždengit mėgintuvėliai laikomi 2-8 °C temperatūroje tamsoje.
9. Prieš tiriant bandinį iš naujo maišoma purtykle *Vortex* 3s.

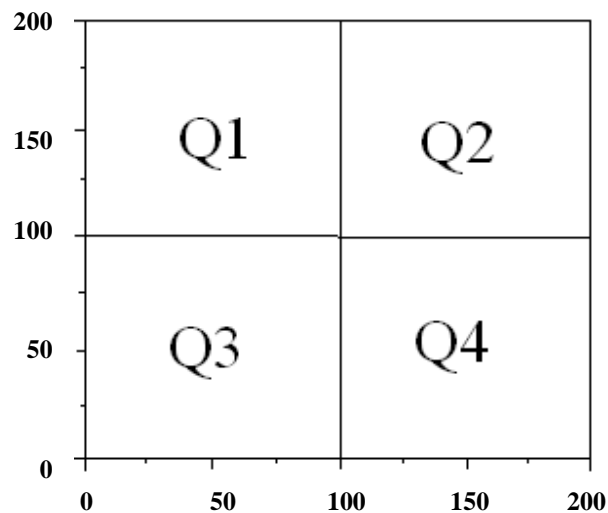
Duomenų analizė

Duomenis rinkti ir analizuoti naudojome *FACSCalibur* (BD, JAV) tėkmės citometrą, turintį kalibravimo, duomenų rinkimo ir analizės programas. Detektorių jautrumas nustatomas ir fluorescencijos spektrų persidengimo kompensacija vykdoma naudojant programinę įrangą *FACSComp* bei *CaliBrite* spalvotus fluorescuojančius rutuliukus.

Duomenis analizavome *Simul SET* programine įranga dvispalvei analizei. Analizuota po 10 000 tūkstančių ląstelių kiekviename mėginyje, po keturis ląstelės parametrus (ląstelės dydis, grūdėtumas, dvi žymėtos monokloniniais antikūnais paviršiaus struktūros).

Prieš tiriant bandinį visada buvo atliekama neigiama nespecifinės fluorescencijos kontrolė izotipiniais reagentais prieš šmogaus organizme neesančias struktūras. Naudodami izotopinį neigiamos kontrolės reagentą patikrinome, ar nėra nespecifinio antikūnų jungimosi prie tiriamųjų ląstelių populiacijos. Jei nespecifinis švytėjimas didesnis kaip 5%, bandinys ruošiamas tyrimui iš naujo.

5 paveiksle pateikta duomenų analizė taškinėse diagramose, kur Q1 – FITC (-) PE (+), Q2 – FITC (+) PE (+), Q3 – FITC (-) PE (-), Q4 – FITC (+) PE (-).



5 pav. Taškinių diagramų duomenų analizės schema.

Statistinė duomenų analizė

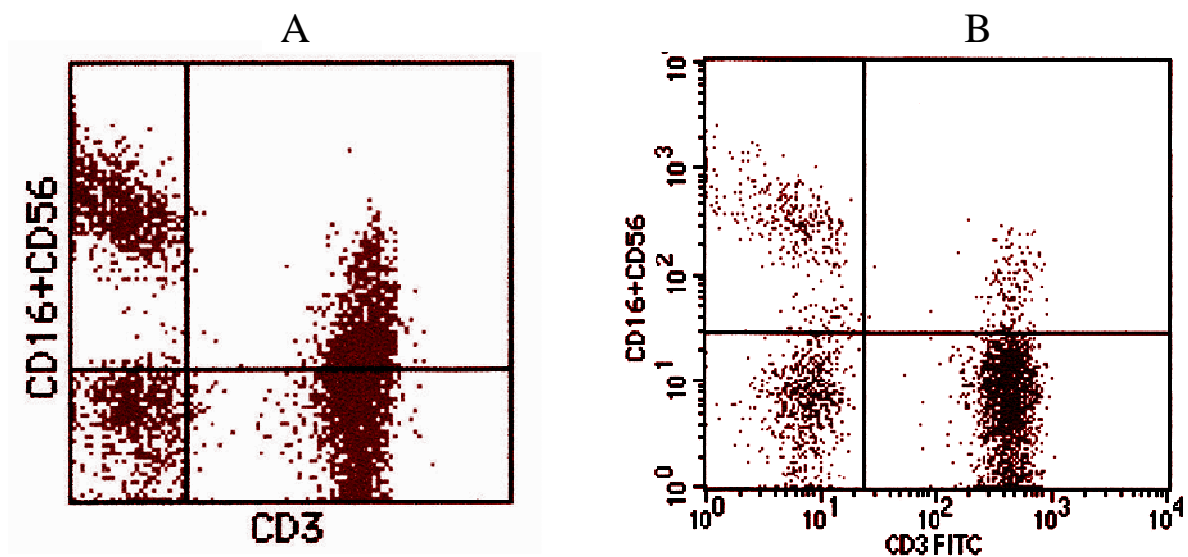
Tyrimų rezultatai statistiškai apdoroti personaliniu kompiuteriu, naudojant programų paketus *SPSS 13.0 for Windows* ir *Microsoft Office Excel 2007*. Duomenys pateikti paskaičiuvus aritmetinį vidurkį ir standartinį nuokrypį. Skirtumai tarp grupių įvertinti Mann-Whitney U testu

ir Wilcoxon testu neparametriniams duomenims. Rezultatai buvo laikomi reikšmingi, jei $p < 0.05$. Duomenys pavaizduoti diagramomis.

5. REZULTATAI

Siekdami įvertinti $CD3^+CD103^+$, $CD3^+CD134^+$, $CD3^+CD16^+CD56^+$ (NKT) limfocitų ekspresiją ligonių po širdies transplantacijos kraujyje ir šių limfocitų ekspresijos kitimą esant transplantato atmetimui, surinkome 9 pacientų grupę, kuriems tėkmės citometro pagalba buvo įvertinta tiriamų limfocitų ekspresija 10 dienų prieš atmetimą ir patvirtinto ūmaus atmetimo dieną. Tie patys tyrimai atlikti ir sveikų asmenų grupėje.

NKT limfocitų taškinių diagramų vaizdas pateiktas 6 paveiksle.



6 pav. NKT limfocitų taškinės diagramos:

A – atmetimo dieną (Q2 kvadrate $CD3^+CD16^+CD56^+$ 22%);

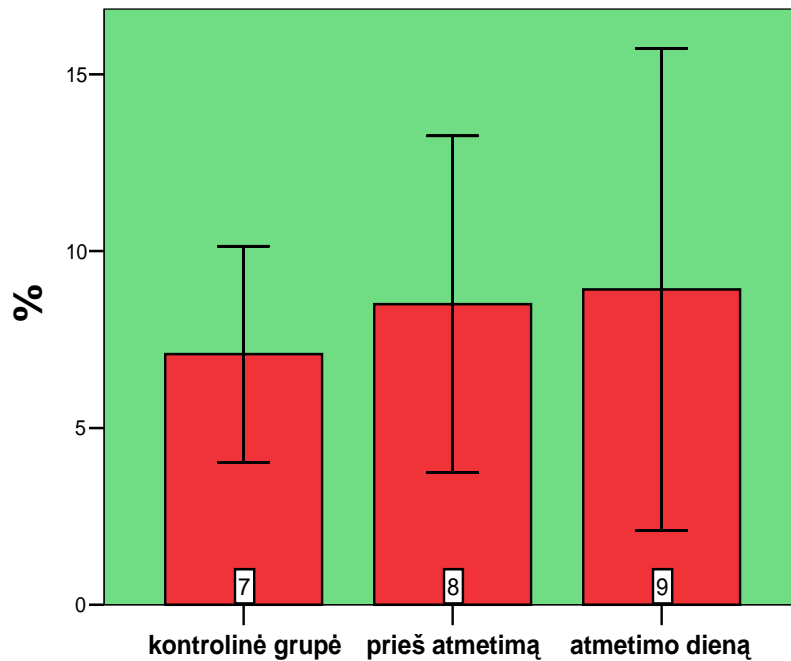
B – kontrolinė grupė (Q2 kvadrate $CD3^+CD16^+CD56^+$ 5%).

3 lentelėje pateikti NKT limfocitų, tirtų tėkmės citometrijos metodu, pasiskirstymas tiriamųjų periferiniame kraujyje.

3 lentelė. NKT procentinis pasiskirstymas tiriamųjų kraujyje.

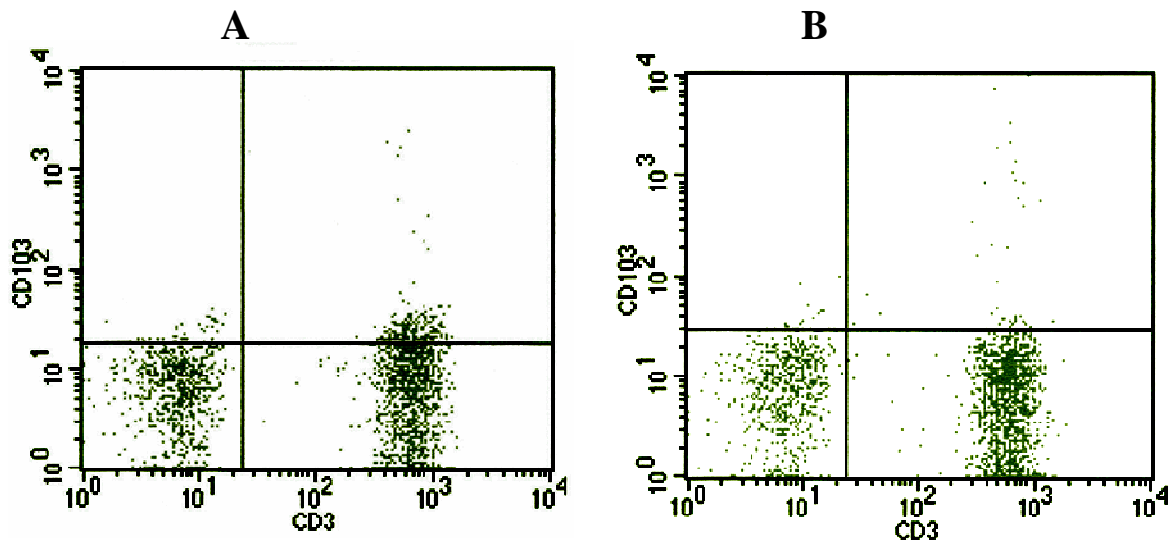
	Kontrolinė grupė	Prieš atmetimą	Atmetimo dieną	p*
NKT (%)	7,1±2,7*	8,1±4,8	8,9±6,8*	>0,1

Vertindami NKT limfocitus nustatėme, kad kontrolinėje grupėje šių ląstelių vidurkis mažesnis negu prieš atmetimą ir atmetimo dieną.



7 pav. NKT limfocitų vidurkis kraujyje

Taškinė diagrama pateikia tėkmės citometrijos metodu tirtų CD3⁺CD103⁺ limfocitų matomą skirtumą 10 dienų prieš atmetimą ir atmetimo dieną (8 pav.), o 4 lentelė - statistinį limfocitų pasiskirstymą tiriamųjų periferiniame kraujyje.

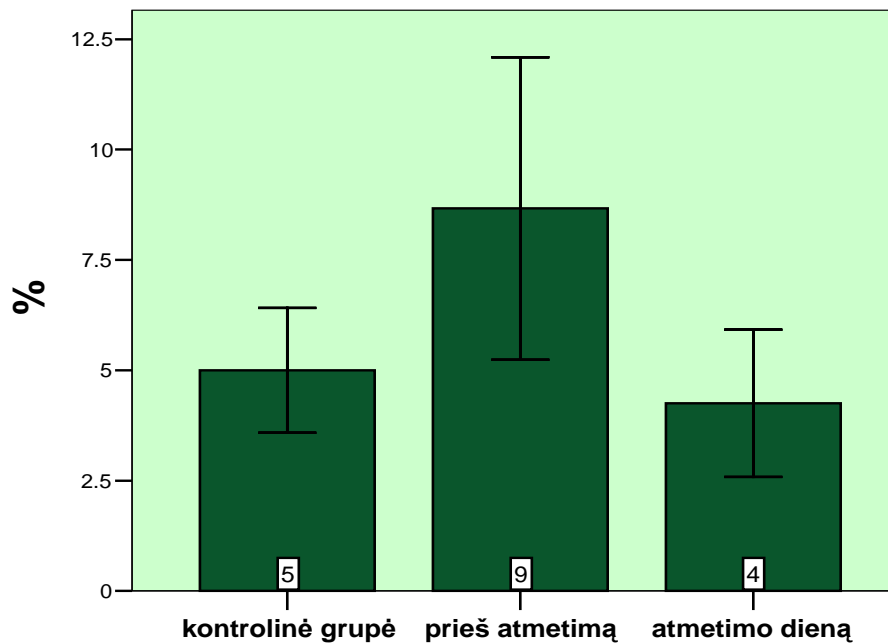


8 pav. CD3⁺CD103⁺ limfocitų taškinės diagramos:
 A – prieš atmetimą (Q2 kvadrate CD3⁺CD103⁺ 10%);
 B – atmetimo dieną (Q2 kvadrate CD3⁺CD103⁺ 2%).

4 lentelė. CD3⁺CD103⁺ limfocitų procentinis pasiskirstymas tiriamųjų kraujyje.

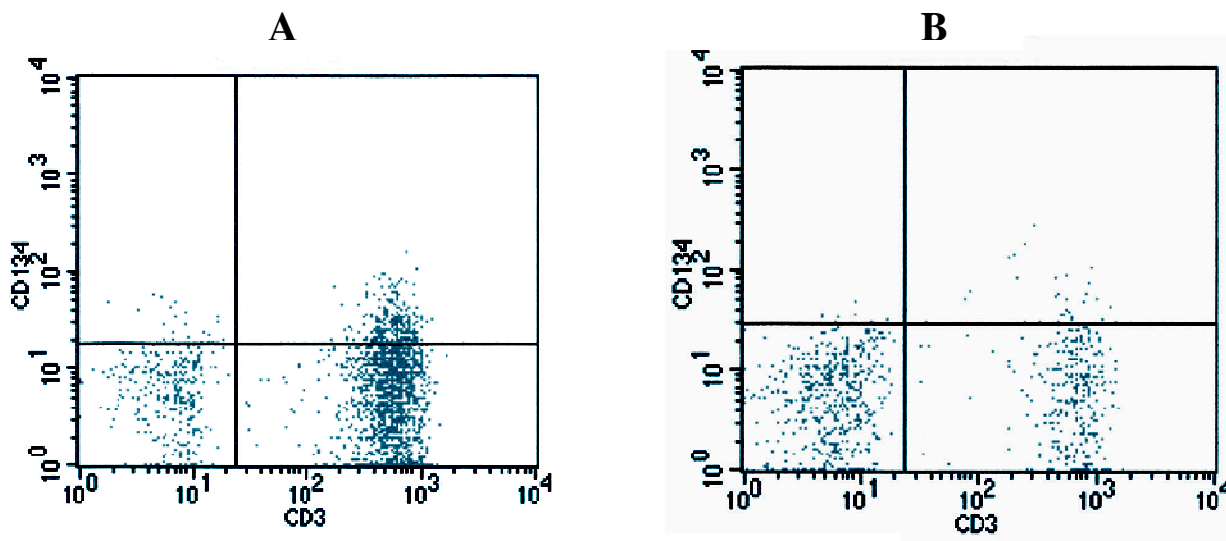
	Kontrolinė grupė	Prieš atmetimą	Atmetimo dieną	p*
CD3 ⁺ CD103 ⁺ limfocitai (%)	5,0±1,4	8,7±3,4*	4,3±1,7*	<0,05

Gavome statistiškai patikimą skirtumą tarp tiriamųjų grupių CD3⁺CD103⁺ limfocitų pasiskirstymo. 10 dienų prieš atmetimą šių limfocitų procentas kraujyje 8 pacientams yra didesnis negu atmetimo dieną ir bendras vidurkis didesnis negu kontrolinėje grupėje (9 pav.).



9 pav. CD3⁺CD103⁺ limfocitų vidurkis kraujyje

Panašius rezultatus gavome tėkmės citometrijos metodu vertindami kraujo CD3⁺CD134⁺ limfocitų populiaciją. CD3⁺CD134⁺ limfocitų taškinių diagramų vaizdas prieš atmetimą ir atmetimo dieną pateiktas 10 paveiksle.



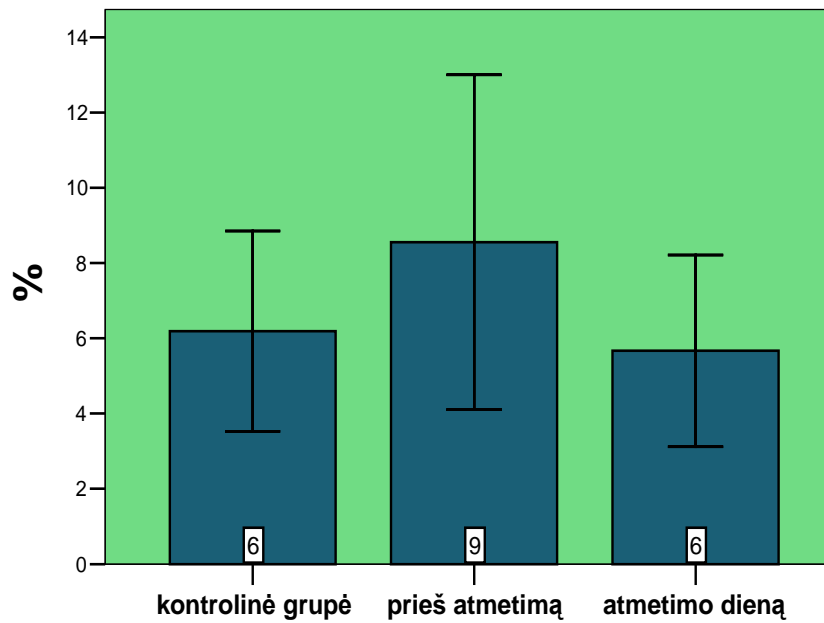
10 pav. CD3⁺CD134⁺ limfocitų taškinės diagramos:
 A – prieš atmetimą (Q2 kvadrate CD3⁺CD134⁺ 14%);
 B – atmetimo dieną (Q2 kvadrate CD3⁺CD134⁺ 4%).

Statistinė CD3⁺CD134⁺ limfocitų charakteristika sveikų asmenų, 10 dienų prieš atmetimą ir atmetimo dieną tirtų pacientų kraujyje pateikta 5 lentelėje.

5 lentelė. CD3⁺CD134⁺ limfocitų procentinis pasiskirstymas tiriamųjų kraujyje.

	Kontrolinė grupė	Prieš atmetimą	Atmetimo dieną	p*
CD3 ⁺ CD134 ⁺ limfocitai (%)	6,2±2,7	8,7±4,5*	5,7±2,6*	>0,05

6 pacientams iš 9 prieš atmetimą šių ląstelių procentas yra didesnis negu atmetimo dieną, o bendras vidurkis didesnis negu sveikų asmenų grupėje (11 pav.).



11 pav. CD3⁺CD134⁺ limfocitų vidurkis kraujyje.

6. REZULTATŲ APTARIMAS

Jau praeitame šimtmeetyje atrasta ir susidomėta neįprasta $CD3^+$ limfocitų populiacija, kuriai Ag pateikiamas ne ŽLA komplekso sudėtyje, ir gebančia ekspresuoti NK ląstelių paviršiaus žymenis ($CD16^+CD56^+$), dar vadinama NKT limfocitais. Jų atliekama funkcija žmogaus organizme sukėlė didelį mokslininkų susidomėjimą ir iki šių dienų jau yra išaiškinti keli NKT limfocitų potipiai [32]. Gerai žinomas teigiamas NKT ląstelių poveikis žmogaus organizmui, toks kaip dalyvavimas slopinant autoimunines ligas, imuninis atsakas į mikobakterijų glikolipidinius antigenus, navikines ląsteles [42]. Nemažiau svarbi jų reguliacinė funkcija. Autoriai, atlikę eksperimentus su pelių modeliais, išaiškino NKT limfocitų gebėjimą sintetinti IL-10 ir tokiu būdu slopinti imuninį atsaką prieš širdies transplantatą [32, 62].

Vienas iš šio darbo uždavinių buvo stebėti ir įvertinti kaip kinta NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) limfocitų kiekis ligonių, kuriems buvo atlikta širdies persodinimo operacija, kraujyje. Tam tikslui buvo atrinkta 21 pacientai, kuriems atlikta širdies transplantacija. Iš šios žmonių grupės atrinkti 9 asmenys, kuriems buvo patvirtintas ūmus transplantato atmetimas. Šiems pacientams tėkmės citometro pagalba buvo įvertinta NKT limfocitų skaičius 10 dienų prieš atmetimą ir transplantato atmetimo dieną. Kadangi literatūros šaltiniuose nenurodytas $CD3^+CD16^+CD56^+$ limfocitų kiekis sveikame organizme, buvo atrinkta 29 asmenų grupė, kuriai ištirtas šių ląstelių procentas periferiniame kraujyje. Atlikti skaičiavimai parodė, kad transplantato atmetimo dieną įvertintų NKT limfocitų procentas svyruoja didesnėse ribose negu sveikų asmenų grupėje ir šių ląstelių vidurkis yra didesnis atmetimo dieną negu kontrolinėje grupėje. Vertinant NKT limfocitų kitimą prieš širdies transplantato atmetimą ir atmetimo dieną, šių ląstelių vidurkis taip pat didesnis atmetimo dieną negu prieš atmetimą. Dėl mažos tiriamųjų grupės, šis skirtumas nėra statistiškai patikimas, tačiau galima pastebėti, kad $CD3^+CD16^+CD56^+$ limfocitų skaičius didėja prieš širdies transplantato atmetimą ir yra didžiausias atmetimo dieną. Mums sunku pasakyti, ar šis pokytis stebimas dėl NKT limfocitų dalyvavimo slopinant transplantato atmetimą, nes kita šių ląstelių funkcija yra dalyvavimas slopinant infekcinius susirgimus, pavyzdžiui, hepatito B viruso replikaciją [34]. Virusiniai susirgimai, tokie kaip CMV, taip pat galėtų iššaukti transplantato atmetimą, todėl tolimesniuose darbuose būtų įdomu įvertinti $CD3^+CD16^+CD56^+$ limfocitų ir infekcinių žymenų koreliaciją

esant širdies transplantato atmetimui. Be to ištirti didesnę pacientų su širdies transplantatu grupę ir sekti jų potransplantacinę būklę vertinant NKT pokytį. Pastebėjus $CD3^+CD16^+CD56^+$ limfocitų tendencingą didėjimą vertinti šį kitimą kaip galimą perspėjimą apie gresiantį transplantato atmetimą arba infekciją.

Dar viena svarbi ląstelių populiacija, dalyvaujanti transplantato atmetime, yra T limfocitai ekspresuojantys CD103 paviršiaus žymenį. Kol kas autorių yra aprašyta jų daroma žala inkstų ar kepenų transplantatų epitelio ląstelėms [13], o duomenų apie galimus pažeidimus po širdies persodinimo operacijos nėra. Tai mus paskatino įvertinti $CD3^+CD103^+$ limfocitų skaičių aukščiau minėtoje tiriamųjų grupėje. Nustatėme, kad transplantato atmetimo dieną vertintų limfocitų procentinis vidurkis nežymiai mažesnis negu sveikų asmenų. Vertinant $CD3^+CD103^+$ limfocitų kitimą prieš širdies transplantato atmetimą ir atmetimo dieną, nustatyta, kad 8 pacientam iš 9 šių ląstelių procentas yra didesnis 10 dienų prieš atmetimą negu atmetimo dieną, o lyginant vidurkius, $CD3^+CD103^+$ limfocitų prieš atmetimą statistiškai patikimai daugiau negu sveikų asmenų grupėje ar atmetimo dieną. Gauti rezultatai leidžia manyti, kad CD103 paviršiaus žymens ekspresijos pokytis ligonių po širdies persodinimo operacijos galėtų būti ankstyvas žymuo, įspėjantis apie galimą transplantato atmetimą.

Paskutinio, mūsų vertinto, T limfocitų CD134 paviršiaus žymens ekspresijos pokyčiai yra aprašyti lėtinės ar ūmios GVHD atveju esant kamieninių ląstelių transplantacijai [33, 46]. Taip pat yra žinoma, kad šio žymens ekspresija prasideda praėjus 24-72 valandoms po T limfocitų aktyvacijos [24]. Mums buvo įdomu įvertinti kaip kinta $CD3^+CD134^+$ limfocitų procentas ligonių, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija, kraujyje esant atmetimui ir 10 dienų prieš atmetimą. Taip pat įvertinome ir palyginome šių ląstelių skaičių sveikų asmenų grupėje. Nustatėme, kad prieš atmetimą $CD3^+CD134^+$ limfocitų skaičiaus vidurkis didesnis negu kontrolinėje grupėje ir didesnis negu atmetimo dieną. Šie rezultatai, žinant CD134 paviršiaus molekulės ankstyvą ekspresiją tuoj po aktyvacijos [24], ir tolimesni tyrimai, galėtų priskirti šį žymenį prie ankstyvų širdies transplantato atmetimo žymenų ir įspėti gydytojus apie galimą širdies transplantato atmetimą.

7. IŠVADOS

1. T limfocitų CD16/56 paviršiaus žymens ekspresija ligonių, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija, kraujyje didėja prieš atmetimą ir transplantato atmetimo metu lyginant su sveikų asmenų grupe.
2. T limfocitų CD103 paviršiaus žymens ekspresija ligonių kraujyje statistiškai patikimai didesnė prieš transplantato atmetimą negu atmetimo metu.
3. T limfocitų CD134 paviršiaus žymens ekspresija ligonių su širdies transplantatu kraujyje didesnė prieš transplantato atmetimą negu atmetimo metu.
4. Sveikų asmenų T limfocitų CD16/56 paviršiaus žymens ekspresija mažesnė nei prieš atmetimą bei atmetimo dieną, o CD103 ir CD134 žymenų kontrolinės grupės mažesnė nei prieš atmetimą ligonių su širdies transplantatu.

CD3⁺CD103⁺ ir CD3⁺CD134⁺ molekulių ekspresijos sekimas ligonių po širdies transplantacijos kraujyje galėtų padėti gydytojams vertinti širdies transplantato būklę.

Darbo vadovas:

Darbą atliko:

Literatūros sąrašas:

1. Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas „Šviesa“ 2001; p. 169-178, 198-199, 312-320.
2. Alan D. Salama, Nader Najafian, Michael R. Clarkson, William E. Harmon and Mohamed H. Sayegh. Regulatory CD25⁺ T Cells in Human Kidney Transplant Recipients. 2003; 14:1643-1651.
3. Alan G. Baxter, The cells that knew too much. The Journal of Clinical Investigation. 2000; 105 (12): 1675-1677.
4. Alison J Curry, Jo Chikwe, Xin G Smith, Ming Cai, Herbert Schwarz, J Andrew Bradley, Eleanor M Bolton. OX40 (CD134) blockade inhibits the co-stimulatory cascade and promotes heart allograft survival. The Journal of Transplantation. 2004; 78 (6): 807-814.
5. Andrew Zloza and Lena Al-Harhi. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. Journal of Leukocyte biology. 2006; 26: 4-6.
6. Arlene H. and Abul K. Abbas. T-Cell Costimulation — Biology, Therapeutic Potential, and Challenges. The New England Journal of Medicine. 2006; 355: 973-975.
7. Barry K. Rayburn. Posttransplant Complications: Early Graft Failure, Acute Rejection, and Cardiac Allograft Vasculopathy. Medscape Portals. 2001.
8. Carter N.P., Meyer E.W. Introduction to the principles of flow cytometry. In Ormerod MG (ed): Flow cytometry. A practical approach 2nd ed. New York:L Oxford University Press, 1994, p. 1 – 25.

9. Chang DM, Ding YA, Kuo SY, Chang ML, Wei J. Cytokines and cell surface markers in prediction of cardiac allograft rejection. *The Journal of Immunology investigation*. 1996; 25(1-2): 13-21.
10. Claude Carnaud, Daniel Lee, Olivier Donnars, Se-Ho Park, Andrew Beavis, Yasuhiko Koezuka and Albert Bendelac. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *The Journal of Immunology*. 1999; 163: 4647-4650.
11. Dale I. Godfrey, and Mitchell Kronenberg. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114 (10): 1379-1388.
12. Daniel Kreisel, Alyssa M. Krasinskas, Alexander S. Krupnick, Andrew E. Gelman, Keki R. Balsara, Sicco H. Popma, Markus Riha, Ariella M. Rosengard, Laurence A. Turka and Bruce R. Rosengard. Vascular Endothelium Does Not Activate CD4⁺ Direct Allorecognition in Graft Rejection. *The Journal of Immunology*. 2004; 173: 3027-3034.
13. Donghua Wang, Rongwen Yuan, Ye Feng, Riham El-Asady, Donna L. Farber, Ronald E. Gress, Philip J. Lucas and Gregg A. Hadley. Regulation of CD103 Expression by CD8⁺ T Cells Responding to Renal Allografts. *The Journal of Immunology*. 2004; 172: 214-221.
14. Dong VM, Womer KL, Sayegh MH. Transplantation tolerance: The concept and its applicability. *Pediatric transplantation*. 1999; 3: 181-192.
15. Eckart Schott, Roberto Bonasio and Hidde L. Ploegh. Elimination In Vivo of Developing T Cells by Natural Killer Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003; 8: 1213-1224.

16. Elizabeth Nardin. Mechanisms of immunity to malaria. NYU medical center. 2007, www.med.nyu.edu/parasitology/faculty/enardin.html.
17. Geri R. Brown, Ed Lee and Dwain L. Thiele. TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal GVHD in MHC class II-disparate mice. *The Journal of Immunology*. 2002, 168: 3065-3071.
18. Hadley GA, Rostapshova EA, Gomolka DM, Taylor BM, Bartlett ST, Drachenberg CI, Weir MR. Regulation of the epithelial cell-specific integrin, CD103, by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *The Journal of Transplantation*. 1999; 15; 67 (11):1418-25.
19. Hideaki Obara, Kazuhito Nagasaki, Christine L. Hsieh, Yasuhiro Ogura, Carlos O. Esquivel, Olivia M. Martinez, and Sheri M. Krams. IFN- γ , produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses. *American Journal of Transplantation*. 2005; 5 (9): 2094–2103.
20. Howard J Eisen, Patient information: Heart transplantation. *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report*. 1999.
21. Huser N., Tertilt C., Gerauer K., Maier S., Traeger T., Assfalg V., Reiter R., Heidecke CD., Pfeffer K. CCR-4 deficiency mice show prolonged graft survival in a chronic cardiac transplant rejection model. *European Journal of Immunology*. 2005; 35 (1): 128-38.
22. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00042614>.
23. http://en.wikipedia.org/wiki/Heart_transplantation#Indications. 2007.
24. <http://en.wikipedia.org/wiki/CD134>

25. Ye Feng, Donghua Wang, Rongwen Yuan, Christina M. Parker, Donna L. Farber and Gregg A. Hadley. CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8⁺ cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002; 196 (7): 877-886.
26. Yuan Zhay and Jerzy W. Kupiec-Weglinski. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: active players but to what extent? *Journal of American Society of Nephrology*. 2003; 14:1706-1708.
27. Janine Jason, Ian Buchanan, Lennox K. Archibald, Okey C. Nwanyanwu, Michael Bell, Timothy A. Green, Angelia Eick, Alison Han, Dustin Razsi, Peter N. Kazembe, Hamish Dobbie, Madhu Midathada, and William R. Jarvis. Natural T, and NK cells in mycobacterial, *Salmonella*, and Human Immunodeficiency Virus infections. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000; 182: 474-481.
28. John J. Reilly. Chronic lung transplant rejection: Bronchiolitis obliterans. AGA institute. 2006.
29. Kemnitz J, Cremer J, Restrepo-Specht I, Haverich A, Ziemer G, Heublein B, Borst HG, Uysal A, Georgii A. Hyperacute rejection in heart allografts. Case studies. *Pathology, research and practice*. 1991, 187 (1): 23-9.
30. Kyung Soo Kim, Mark D. Denton, Anil Chandraker, Andreas Knoflach, Rolando Milord, Anna Maria Waaga, Laurence A. Turka, Mary E. Russell, Robert Peach and Mohamed H. Sayegh. CD28-B7 mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection. *American Journal of Pathology*. 2001, 158: 977-986.
31. Ken-ichiro Seino, Katashi Fukao, Kenzo Muramoto, Kazuhiko Yanagisawa, Yasutsugu Takada, Shigeru Kakuta, Yoichiro Iwakura, Luc Van Kaer, Kazuyoshi Takeda, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, Hisashi Bashuda, Hideo Yagita, and Ko Okumura. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001; 98 (5): 2577-2581.
32. Ken-ichiro Seino and Masaru Taniguchi. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 202 (12): 1623–1626.
 33. Kotani A, Ishikawa T, Matsumura Y. Correlation of peripheral blood OX40+ (CD134+) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001; 98: 3162-3164.
 34. Kazuhiro Kakimi, Luca G. Guidotti, Yasuhiko Koezuka, and Francis V. Chisari. Natural killer T cell activation inhibits Hepatitis B Virus replication *in vivo*. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192 (7): 921-930.
 35. Lee P.T., K. Benlagha, L. Teyton, A. Bendelac. Distinct functional lineages of human V α 24 natural killer T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002; 195: 637-641.
 36. Lisa A. Robinson, Chandra Nataraj, Dennis W. Thomas, David N. Howell, Robert Griffiths, Victoria Bautch, Dhavalkumar D. Patel, Lili Feng and Thomas M. Coffman. A Role of Fractalkine and Its Receptor (CX₃CR1) in Cardiac Allograft rejection. *The Journal of Immunology*. 2000; 165: 6067-6072.
 37. Marlies E. J. Reinders, Masayuki Sho, Atsushi Izawa, Ping Wang, Debabrata Mukhopadhyay, Kerith E. Koss, Christopher S. Geehan, Andrew D. Luster, Mohamed H. Sayegh, and David M. Briscoe. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003; 112 (11): 1655–1665.
 38. Matthew H. Blake. Mechanisms of Acute Transplant rejection. Medical university of South Carolina. 2006; p. 109-116.

39. M. E. Mc Nerney, K. M. Lee, P Zhou, L. Molinero, M. Mashayekhi, D. Guzior, H. Sattar, S. Kuppireddi, C. R. Wang, V. Kumar and M. L. Alegre. Role of Natural Killer Cell in Cardiac Allograft Rejection. *American Journal of Transplantation*. 2006; 6: 505-513.
40. Michael P. Fischbein, James Yun, Hillel Laks, Yoshihito Irie, Michael C. Fishbein, Benjamin Bonavida, Abbas Ardehali. Role of CD8⁺ lymphocytes in chronic rejection of transplanted hearts. *The Journal of Thoracic And Cardiovascular Surgery*. 2002; 123: 803-809.
41. Ming Li and Yuanchao Zhang. The Effect of Anti-Human CD134 Monoclonal Antibody on Phytohemagglutinin-Induced mRNA Expression of Perforin in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 2005; 2 (6): 467-471.
42. Mitchell Kronenberg. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual reviews*. 2005; 23: 877-900.
43. Nicholas L. Tilney and Jerzy W. Kupiec-Weglinski. *The Biology of Acute Transplant Rejection*. Surgical research laboratory, Boston. 1991; p. 98-106.
44. Olivia M Martinez and Hugo R. Rosen. Basic concepts in transplant immunology. *CAQ corner*. 2005; 11 (4): 370-381.
45. Osamu Yoneda, Toshio Imai, Seiji Goda, Hiroshi Inoue, Akira Yamauchi, Toshio Okazaki, Hisao Imai, Osamu Yoshie, Eda T. Bloom, Naohika Domae and Hisanori Umehara. Fractalkine-Mediated Endothelial Cell Injury by NK Cells. *The Journal of Immunology*. 2000; 164: 4055-4062.

46. Phillip Ruiz. Graft Versus Host Disease. Miller School of Medicine, University of Miami. 2006.
47. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). *Journal of Immunology*. 1995; 155: 1151–1164.
48. Stefan Maier, Christine Tertilt, Nicole Chambron, Klaus Gerauer, Norbert Hüser, Claus-Dieter Heidecke & Klaus Pfeffer. Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allograft in CD28^{-/-} mice. *Nature Medicine* Homepage. 2001; 7: 557 – 562.
49. Tarek El-Sawy, Masayoshi Miura and Robert Fairchild. Early T cell response to allograft occurring prior to alloantigen priming up-regulates innate-mediated inflammation and graft necrosis. *The American Journal of Pathology*. 2004; 165: 147-157.
50. Terese Winslow, Lidia Kibiuk. Can stem cell repair a damage heart? Stem cell information. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter9.asp>. 2001.
51. The Merck Manuals Online Medical Library. General principles of transplantation. <http://www.merck.com/mmpe/sec13/ch166/ch166b.html>. 2005.
52. Thorton, A. M., and E. M. Shevach. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998; 188: 287-296.
53. Uehara S., Chase M. C., Kitchens H. W., Rose S. H., Colvin B. R., Russell S. P. and Madsen C. J. NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *The Journal of Immunology*. 2005; 175: 3424-3430.

54. Vassalli G., A. Gallino, M. Weis, W. von Scheidt, L. Kappenberger, L. K. von Segesser and J.-J. Goy. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *European Heart Journal*. 2003; 24 (13): 1180-1188.
55. Wahl, S. M., J. Swisher, N. McCartney-Francis, and W. Chen. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *The Journal of Leukocyte Biology*. 2004; 76:15-24.
56. Womer KL. Transplantation Tolerance. *Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation*. 2005; 16: 498-505.
57. www.library.thinkquest.org/.../photos/photo_7.html
58. www3.imperial.ac.uk/portal/page/portallive/0F.
59. www.morst.govt.nz/publications/a-z/s/stem-cell-research/section-1/#top
60. www.themoneytimes.com/articles/20080501/resea
61. Xue-Zhong Yu, Michael H. Albert, Paul J. Martin and Claudio Anasetti. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN- γ dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 113: 1624-1630.
62. X. Jiang, S. Kojo, M. Harada, N. Ohkohchi, M. Taniguchi, K.-i. Seino. Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance. *American journal of transplantation*. 2007; 7 (6), 1482–1490.
63. Xueli Yuan, Alan D. Salama, Victor Dong, Isabela Schmitt, Nader Najafian, Anil Chandraker, Hisaya Akiba, Hideo Yagita and Mohamed H. Sayegh. The role of the

CD134-CD134 ligand costimulatory pathway in alloimmune responses in vivo. The Journal of Immunology. 2003; 170: 2949-2955.

SUMMARY

The changes of the expression of T lymphocyte CD16/56, CD103, CD134 surface markers in patients with heart transplant

The aim of this work was to evaluate the changes of the expression of T lymphocyte CD16/56, CD103, CD134 surface markers in the blood of the patients who underwent heart transplantation. For this purpose we collected heparinized blood samples of 21 patients with cardiac transplant and 29 healthy volunteers.

9 patients out of 21 underwent acute cardiac transplant rejection. Blood samples of these patients were tested using flow cytometry 10 days before heart rejection and on the day when rejection was upheld.

Our results showed that the expression of T lymphocyte CD16/56 surface molecule is higher on the rejection day than in control group. Expression of CD103 marker is higher 10 days before rejection than on the rejection day and is lower than in healthy volunteers. Expression of CD134 marker is higher before transplant rejection and higher than in healthy controls.

Monitoring of CD3⁺CD103⁺ and CD⁺CD134⁺ cells in the blood after heart transplantation could be helpful in prediction of heart transplant rejection.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto dekanei hab.dr., prof. Zitai Aušrelei Kučinskienei už suteiktą galimybę studijuoti magistrantūroje.

Taip pat dėkoju savo darbo vadovei dr. Laimutei Jurgauskienei už vadovavimą ir pateiktas žinias, už palaikymą, visokeriopą pagalbą atliekant tyrimus ir rašant šį darbą.

Esu dėkinga Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikos Klinikinės imunologijos laboratorijos vedėjai dr. Radvilei Malickaitei už galimybę atlikti magistrantūros darbą šioje laboratorijoje ir laboratorijos darbuotojams, ypač Teresei Brazevič už pasidalinimą patirtimi ir už pagalbą atliekant tyrimus.

Dėkoju dr. Loretai Bagdonaitei ir kitiems VU dėstytojams už vertingas pastabas ir pateiktas žinias studijuojant magistrantūroje.

