

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**LIGONIŲ, KURIEMS ATLIKTA ŠIRDIES PERSODINIMO OPERACIJA,
KRAUJO T LĄSTELIŲ ŽUDIKIŲ SKAIČIAUS POKYČIAI**

Magistrantas VILIUS GRIKŠAS _____
(parašas)

Darbo vadovas

dr. Laimutė Jurgauskienė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2017 m., Vilnius

SANTRUMPOS

APL – antigeną pateikianti ląstelė

mAk – monokloninis antikūnas

CD (angl. *Cluster of differentiation*) – leukocitų diferenciacijos antigenai

CTL – citotoksinis T efektorinis limfocitas

DN – dvigubai neigiamas

Fc (angl. *Fragment crystallizable*) – antikūno molekulės dalis, besijungiančioji su ląstele

FcR – receptorius antikūno Fc fragmentui

FITC – fluoresceino izotiocianatas

INF – interferonas

Ig – imunoglobulinas

IgG – imunoglobulinas G

IgM – imunoglobulinas M

IL – interleukinas

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

LŠN- lėtinis širdies nepakankamumas

PE – fikoeritrinas

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

TNF (angl. *Tumor necrosis factor*) – navikų nekrozės faktorius

ŪŠN- ūminis širdies nepakankamumas

ŽLA – žmogaus leukocitų antigenas

Th (angl. *T helper*) – T pagalbinės ląstelė

NKT – natūralių kilerių T ląstelės

NK – natūralūs kileriai

NKR-P1 (angl. *Natural killer receptor protein 1*) – natūralių kilerių receptoriaus baltymas 1

KIR (angl. *Killer inhibitory receptor*) – kilerius slopinantis receptorius

TRAIL (angl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – apoptozę inicijuojantis ligandas, aktyvuojamas naviko nekrozės faktoriumi

TURINYS

SANTRUMPOS.....	2
ĮVADAS.....	4
1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	5
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
2.1. Transplantacija ir jos rūšys	7
2.2. Imuninės sistemos atsakas į transplantatą.....	8
2.3. Imuninės sistemos atmetimo reakcija	10
2.4. Efektoriniai imuniniai mechanizmai.....	12
2.5. Humoralinis atsakas į transplantatą	13
2.6. Natūralių kiliųjų T (NKT) ląstelės	14
2.6.1. NKT ląstelės prognozuojant atmetimo reakciją.....	17
2.7. NK ląstelės.....	18
2.7.1. NK ląstelės prognozuojant atmetimo reakciją.....	19
3. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI.....	21
3.1. Tiriamieji.....	21
3.2. Metodai	23
3.2.1. Tėkmės citometrijos metodas	23
3.3. Reagentai ir prietaisai	24
3.4. Darbo eiga.....	26
3.4.1. Duomenų analizė	26
3.4.2. Statistinė duomenų analizė	28
4. REZULTATAI	29
5. REZULTATŲ APTARIMAS	35
IŠVADOS.....	38
Literatūros sąrašas.....	39
Santrauka	43
Summary	45

ĮVADAS

Vienas iš pagrindinių kraujotakos sistemos funkcijos sutrikimų yra širdies nepakankamumas. Esant širdies nepakankamumui, pacientai yra gydomi, siekiant stabilizuoti širdies darbą ir funkciją. Tačiau, kai ligos progresavimas pažengęs ir gydymas medikamentais nebėra efektyvus, reikalingos drastiškos priemonės - tokios kaip širdies transplantacija.

Pasaulyje pirmoji širdies transplantacija atlikta 1964 metais. Lietuvoje pirmoji širdies transplantacijos operacija atlikta 1987 m. Vilniaus universiteto Širdies chirurgijos klinikoje. Iki 2017 metų Lietuvoje yra atliktos daugiau nei 100 širdies transplantacijų. Širdies transplantacijos operacija atliekama, kai alotransplantatas yra tapatus pagal paciento kraujo grupę bei kitus transplantacijai keliamus reikalavimus. Tokiu būdu atrenkant transplantacijai tinkamiausią organą, siekiama išvengti ar sumažinti nepageidaujamų alotransplantato atmetimo reakcijų tikimybę. Nepaisant sudėtingų tyrimų ir alotransplantato atrinkimo metodų, nustačius netgi gerą donoro ir recipiento suderinamumą, galimos ūminės ar lėtinės atmetimo reakcijos.

Siekiant nustatyti ir sekti atmetimo reakciją, atliekamas širdies raumens histologinis tyrimas - biopsija. Širdies biopsija atliekama kai įdūrus specialia adata, tyrimui paimamas mažas širdies raumens gabalėlis. Biopsija - informatyvus tyrimas, padedantis įvertinti imuninių ląstelių reakcijas, kurios gali sukelti transplantato atmetimą. Šis invazinis tyrimas gali turėti ir šalutinį poveikį pacientams, kurių imuninė sistema yra slopinama imunosupresiniais vaistais. Dėl šių priežasčių, pasitelkiant naujausias technologijas, bandoma atrasti patikimą ir nedarantį žalos tyrimo būdą, kurį taikant būtų galima identifikuoti atmetimo reakcijas ir skirti adekvatų imunosupresinį gydymą.

Šio mokslinio tiriamojo darbo metu, tėkmės citometrijos metodu siekiama nustatyti natūralių kilerių T (NKT) ir natūralių kilerių (NK) ląstelių, kaip atmetimo reakcijos žymens, patikimumą lyginant jį su biopsijos tyrimo rezultatais.

1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tikslas – įvertinti NKT ir NK ląstelių skaičiaus pokyčius pacientų periferiniame kraujyje ir juos palyginti su biopsijos tyrimo rezultatais, siekiant identifikuoti atmetimo reakciją po širdies transplantacijos.

Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Tėkmės citometrijos metodu nustatyti NKT ($CD3^+CD16^+/CD56^+$) ląstelių skaičių pacientų, kuriems atlikta širdies transplantacija, periferiniame kraujyje.
2. Tėkmės citometrijos metodu nustatyti NK ($CD3^+CD16^+/CD56^+$) ląstelių skaičių pacientų, kuriems atlikta širdies transplantacija, periferiniame kraujyje.
3. Įvertinti NKT ir NK ląstelių skaičiaus pokyčius pagal atmetimo sunkumo laipsnį.
4. Įvertinti ligonių po širdies transplantacijos NKT ir NK ląstelių skaičiaus pokyčių koreliacijas su atmetimo sunkumo laipsniu, šių žymenų informatyvumą ir patikimumą.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

Ūminis širdies nepakankamumas (ŪŠN) – tai būklė, pasireiškianti staigiu požymių ir simptomų, sąlygotų sutrikusios širdies funkcijos, išsivystymu. Dažniausiai ši gyvybei grėsminga ir, nesuteikus tinkamos pagalbos, letali būklė išryškėja paūmėjus lėtiniam širdies nepakankamumui. Gydant pacientus, kuriems reikia neatidėliotinos medicininės pagalbos, iškyla aiškių ir paprastų diagnostikos bei gydymo algoritmų poreikis [7]. Daugeliu atvejų ŪŠN atsiranda kaip lėtinio širdies nepakankamumo (LŠN) paūmėjimas.

LŠN – tai lėtinė liga, dėl kurios širdis negali pakankamai aprūpinti organizmo krauju, reikalingu gyvybinėms funkcijoms palaikyti. 2015 m. Higienos instituto duomenimis, Lietuvoje širdies nepakankamumo diagnozė buvo nustatyta 103 519 gyventojų [34].

Širdies nepakankamumas yra multifaktorinė ir grėsminga gyvybei liga, kuri siejama su dideliu mirštamumu. Pastaruoju metu dedama daug pastangų ir lėšų tyrimams, siejamiems su širdies nepakankamumu, todėl šios patologijos diagnostika bei gydymo priemonės sparčiai tobulėja. Medicinai sparčiai žengiant į priekį, diagnostikos ir gydymo algoritmai vis labiau supaprastinami, tampa aiškesni ir lengviau panaudojami kasdienėje klinikinėje praktikoje. Į algoritmus įtraukiami šiandien moderniausi ir tiksliausi diagnostiniai tyrimai, leidžiantys įvertinti širdies struktūrinius bei funkcinis pokyčius bei įgalinantys planuoti tolesnę diagnostikos ir gydymo kelią, išvengiant klaidų [35].

Progresuojantis lėtinis širdies nepakankamumas (LŠN) tampa svarbia mirties priežastimi ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse. Nors šiuolaikinio medikamentinio, elektrofiziologinio ir chirurginio gydymo galimybės gerokai padidino pacientų, sergančių lėtiniu širdies nepakankamumu, išgyvenimą, širdies transplantacija išlieka veiksmingiausiu gydymo metodu terminalinėmis šios ligos stadijomis, kai visi kiti gydymo rezervai išnaudoti.

Širdies transplantacija – drastiška širdies nepakankamumo gydymo priemonė – taikoma, kai nebeįmanoma medikamentinis gydymas .

2.1. Transplantacija ir jos rūšys

Transplantacija – tai ląstelių, audinių, organų perkėlimas iš donoro į recipiento organizmą. Dažniausiai taikoma transplantacijos forma – transfuzija, t. y. kraujo su forminiais elementais (eritrocitais, trombocitais) perpylimas ir / ar kraujo plazmos perpylimas [1].

Transplantacijos skirstomos į keletą grupių pagal donorinio organo kilmę:

- Autologinė transplantacija – kai donoras ir recipientas yra tas pats asmuo, šis transplantacijos būdas taikomas odos transplantacijoje, pavyzdžiui: po nudegimų.
- Izogeninė transplantacija vienas iš priimtinausių būdų persodinant organus. Donoro ir recipiento genetinė informacija šiuo atveju yra identiška, dėl to atmetimo reakcijos pasireiškimo tikimybė mažesnė. Šio tipo transplantacijos taikymas ribotas – izotransplantatas gali būti tik iš monozygotinio dvynio (brolio ar sesers).
- Ksenogeninė transplantacija – kai donoras ir recipientas priklauso skirtingoms rūšims. Kadangi šio grupės transplantacijai yra naudojami kitos rūšies, dažniausiai kiek įmanoma genetiškai artimesnių organizmų, organai, susiduriama su etinėmis problemomis, taip pat su atmetimo reakcijos grėsme.
- Pagrindinė transplantacijos grupė – alogeninė transplantacija. Ji atliekama tos pačios rūšies individams. Šiai grupei priklauso širdies, plaučių, inkstų, ragenos, kepenų transplantacijos.

2.2. Imuninės sistemos atsakas į transplantatą

Tyrimais buvo nustatyta, kad persodinto organo ląstelių paviršiuje yra ekspresuojamos tam tikro tipo molekulės, kurias šeimininko imuninės ląstelės gali atpažinti kaip svetimkūnius, arba kaip savą audinį [23]. Žmogaus organizme šie baltymai vadinami žmogaus leukocitų antigenais (ŽLA). ŽLA molekulės ekspresuojamos kiekvienos ląstelės, turinčios branduolį, membranoje ir yra pagrindinis veiksnys, sukeliantis recipiento imuninių ląstelių atsaką į svetimkūnį. Pagrindinė ŽLA funkcija organizme – sujungti peptidus, kurie būtų atpažįstami T limfocitų receptorių (TCR).

ŽLA molekulės gali būti 2 tipų. I tipo ŽLA molekulės būna ant visų ląstelių, turinčių branduolį. II tipo ŽLA molekulės yra ekspresuojamos ant antigeną pateikiančios ląstelės. Šio tipo molekulės ekspresijai įtaką daro leukocitai. Pastarieji išskiria citokinus, dėl kurių padidėja ŽLA molekulių raiška ant transplantato ląstelių bei audinių ląstelėse padaugėja sukibimo molekulių (LFA3, ICAM-1).

Abiejų tipų ŽLA molekulės sudarytos iš trijų pagrindinių subvienetų: citoplazminės dalies, transmembraninės dalies ir ekstraląstelinės dalies, pastarosios sudedamosios dalys yra šios: į imunoglobuliną panaši dalis ir peptidą jungianti dalis. Svarbiausias komponentas, siekiant pateikti svetimą peptidą imuninėms ląstelėms, yra peptidą jungianti dalis, kuri sudaryta iš dviejų domenų ir griovelio. Tik vienas peptidas gali jungtis prie peptidą jungiančios dalies, tačiau dėl peptidą jungiančios dalies domenų polimorfiškumo atpažįstamų ir prisijungiamų peptidų įvairovė tampa labai didelė.

Esminis abiejų tipų ŽLA molekulių skirtumas – I ir II tipo molekulės skiriasi T limfocitų aktyvinimu. I tipo ŽLA molekulę atpažįsta $CD8^+$ T limfocitai su savo TCR dėl specifiško jungimosi su į imunoglobuliną panašia dalimi [27]. II tipo ŽLA molekulė su į imunoglobuliną panašia dalimi yra atpažįstama tik $CD4^+$ T limfocitų. Visi šie baltymai sudaro sąlygas, leidžiančias T limfocitams atpažinti svetimą antigeną ir taip inicijuoti imuninę reakciją. Į kiekvieną ŽLA molekulę, susijungusią su svetimumu peptidu, gali sureaguoti apie 2% T limfocitų, tai lemia platų svetimų aloantigeninių antikūnų spektrą, jų atpažinimą ir stiprią atmetimo reakciją.

Svetimi antigenai arba peptidai imuninei sistemai yra pateikiami dviem būdais: tiesioginiu ir netiesioginiu.

Tiesioginis antigeno pateikimas T limfocitams gali būti atpažįstamas, jei jis yra nebaltyminės kilmės, arba kitaip sakant – superantigenas. Pagrindinis T limfocitų antigeno pateikimo kelias, susijęs su transplantato atmetimo reakcija, yra netiesioginis. Antigenas paruošiamas ir pateikiamas

ant ŽLA molekulės T limfocitui.

Su ŽLA molekule pateikiami peptidai paruošiami skirtingais būdais. I tipo ŽLA molekulės peptidus paruošia iš ląstelėje esamų intraląstelinių baltymų. Pirmiausia apdorojimo proceso metu baltymai proteosomų suskaldomi į nedidelius peptidus, toliau, juos apdorojant Goldžio aparatu, pakrautos peptidais ŽLA molekulės patalpinamos ląstelės paviršiuje. Tokia ląstelė tampa taikiniu $CD8^+$ T limfocitams, kurie pasižymi citoliziniu atktyvumu ir taip sunaikina ląstelę taikinį [27]. II tipo ŽLA molekulės antigeninį baltymą gauna endocitozės būdu, per keletą etapų ekstraląstelinis baltymas suskaldomas iki peptidų ir įtraukiamas į ŽLA II tipo molekulės peptido jungiamąją dalį. Peptidai pateikiami $CD4^+$ T limfocitams, kurie toliau yra aktyvinami ir tampa specifiniais tam baltymui T limfocitais.

T limfocitų klonai, aloreaktyvūs specifinei alogeninei ŽLA molekulei, prisijungusiai tam tikrus peptidus, atpažįstami kaip svetimi, todėl vystosi atmetimo reakcija. Peptidai, prisijungiantys prie ŽLA molekulės, gali būti ir autologinio aktyvumo. Užkrūčio liaukoje bręstant T limfocitams, vystosi tolerancija nuosaviems peptidams. Esant autoimuninėms ligoms, T limfocitai nuosavus peptidus atpažįsta kaip svetimus ir aktyvina imuninius procesus, nukreiptus prieš sveikas, nepažeistas savas ląsteles [10].

Donoro aloantigeno pateikimas T limfocitams vyksta dendritinių ląstelių pagalba. Jos ekspresuoja MHC II klasės molekules. Dėl šių savybių dendritinės ląstelės laikomos pagrindinėmis APL (antigeną pateikiančiomis ląstelėmis). Jos lengvai gali keliauti per audinius ir, patekusios iš transplantato į antrinius limfinius mazgus, aktyvinti T limfocitus bei jų diferenciaciją į efektorines ląsteles – T limfocitus $CD4^+$, kurie būna dviejų tipų: pirmo ir antro tipo T helperiai ir $CD8^+$ citotoksiniai arba citoziliniai T limfocitai [24].

2.3. Imuninės sistemos atmetimo reakcija

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 itin neženklius skirtumus tarp svetimų peptidų junginio su nuosavomis ŽLA molekulėmis ir savų peptidų junginio su jomis [1].

Atmetimo reakcija – tai imuniteto atsakas į svetimą genetinę informaciją ir organo, kaip svetimkūnio, sunaikinimas. Visas imuninis atsakas reguliuojamas imuninių ląstelių gaminamų imuninių mediatorių – citokinų.

Atmetimo reakcijos yra išskiriamos trijų tipų: žaibiška, ūmi ir lėtinė.

Žaibiškas (hiperūminis) atmetimas. Vystosi labai greitai, sujungus alotransplantato ir recipiento kraujagysles, trunka nuo keleto minučių iki valandos. Šis atmetimas vystosi sparčiai dėl recipiento kraujyje esančių antikūnų, kurie atpažįsta donorinio organo endotelio ląstelėse esančias I klasės ŽLA molekules. Atmetimo reakciją taip pat gali sukelti ir ne ŽLA tipo antigenai. Geriausiai žinomas atmetimo mechanizmas susijęs su IgM klasės aloantikūnais, kurie yra susiję su kraujo grupės sistema ir nukreipti prieš ABO antigenus, esančius ant kraujagyslių endotelio ląstelių. Padidėjęs jautrumas transplantatui gali būti būdingas pacientams, turėjusiems kraujo transfuzijų, arba po anksčiau atliktos transplantacijos, taip pat moterims, turėjusioms keletą nėštumų. Šių procesų metu organizme susidaro IgG klasės antikūnai, veikiantys prieš svetimas ŽLA molekules, kurios jungiasi ir aktyvina žaibišką atmetimo reakciją.

Hiperūminė atmetimo reakcija inicijuojama jungiantis recipiento antikūnams su alotransplantato endotelio ląstelių paviršiuje esančiais antigenais. Šio jungimosi metu prasideda endotelio ląstelių mirtis dėl komplemento fiksacijos, uždegiminių ląstelių, mononuklearų skverbimosi į audinius. Dėl didelės molekulinės masės *von Willebrando* faktoriaus išsiskyrimo iš alotransplantato endotelio ląstelių, aktyvinami trombocitai – susidaro trombozė. Hiperūmaus atmetimo metu vystosi transplantato išemija, nekrozė, išėitis būna letali.

Ūminis atmetimas dažniausiai vystosi per pirmus šešis mėnesius po širdies transplantacijos. Esant ūminiam atmetimui, pažeidžiamos transplantato kraujagyslių endotelio ir parenchiminės

ląstelės. Pagrindinė ūminio atmetimo priežastis IgG klasės antikūnų sąveika su kraujagyslių endotelio ląstelių antigenais, taip pat alogeninėmis ŽLA molekulėmis. Esant antikūno ir antigeno sąveikai, aktyvinamas komplementas ir uždegiminiai procesai. Atliekant histologinį tyrimą po transplantacijos, vietomis matomas vaskulito vaizdas, taip pat galima pamatyti T limfocitų ir makrofagų infiltraciją. T limfocitai, lizuodami arba išskirdami citokinus, gali pažeisti endotelį. Taip indukuojamas uždegimas, dėl kurio vystosi endotelio nekrozė. Parenchiminių ląstelių lizę sukelia CD8⁺ citotoksiniai limfocitai, tuo tarpu audinių nekrozę inicijuoja aktyvintų makrofagų išskirtos aktyvios medžiagos.

Lėtinis atmetimas. Galimos dvi lėtinės atmetimo reakcijos pasekmės – fibrozė ir normalios persodinto organo struktūros praradimas. Fibrozė – tai atsakas į lėtinę išemiją, kuri atsiranda dėl persodinto organo kraujagyslių pažeidimo. Fibrozė gali atsirasti dėl dviejų priežasčių: kaip lėtos hiperjautrumo reakcijos padarinys dėl aktyvintų makrofagų išskiriamo mezenchiminių ląstelių augimo faktoriaus (pvz., trombocitų kilmės augimo faktoriaus PDGF), arba kaip transplantato kraujagyslių okliuzija, kuri gali vystytis dėl intimos lygiųjų raumenų proliferacijos – kitaip dar vadinamos transplantato arterioskleroze [15]. Šis procesas ir jo rezultatai gali išryškėti po operacijos praėjus nuo 6 mėnesių iki kelerių metų. Suaktyvėjusią kraujagyslių proliferaciją galima vertinti kaip lėto padidėjusio hiperjautrumo formą, kurią sukelia makrofagų sintetinami ir išskiriami lygiųjų raumenų ląstelių augimo faktoriai. Prie šio proceso progresavimo gali prisidėti citomegalo virusinė infekcija.

2.4. Efektoriniai imuniniai mechanizmai

Ląstelėms tarpusavyje sąveikaujant, aktyvuojami T helperiai (Th), kurie išskiria citokinus (IL)-2, IL-5, IL-10, IL-15, TNF- α ir INF- γ).

Interleukinas 2 yra citokinas, išskiriamas Th1, kuris aktyvina antigenui reaktyvius limfocitus. Be to, jis skatina aktyvintų limfocitų proliferaciją, tuo pačiu skatindamas ir klonų ekspansiją. IL-2 išskiriamas, kai T limfocitai aktyvuojami, ir taip skatina T limfocitus tapti efektorinėmis ląstelėmis. IL-2 autokriniškai veikia ne tik T limfocitus, bet ir kitas imunines ląsteles. IL-2 aktyvina NK ląsteles, B ląstelių proliferaciją, daro įtaką granulocitų – makrofagų veikimui, skatina imunines ląsteles skverbtis į imuninio atsako vietą ir ten formuoti reaktyvias kolonijas.

IL-10, priešingai nei IL-2, turi slopinamųjų savybių ir slopina imuninių ląstelių funkcijas, tokiu būdu kontroliuodamas imuninio atsako stiprumą. IL-10 taip pat naudojamas kaip imunosupresorius, neleidžiantis imuninėms ląstelėms kovoti prieš alotransplantatą.

INF- γ citokinas išskiriamas Th1 ląstelių, citotoksinių CD8 limfocitų, NK ir NKT ląstelių. INF- γ išskyrimas turi įtakos imunoreguliaciniams procesams, aktyvina NK ląstelių funkcijas [3]. Taip pat aktyvina B plazmines ląsteles, skatindamas IgG klasės antikūnų gamybą. Jis siejamas su MHC molekulių ekspresijos skatinimu tiek ant antigeną pateikiančių ląstelių (MHC II klasės), tiek ant kitų ląstelių, turinčių branduolį (MHC I klasės), tuo pat metu aktyvinamas ir antigeno, kuris bus pateikiamas ant MHC molekulės peptido forma, paruošimas. INF- γ išsiskyrimas skatina Th1 klasės limfocitų susidarymą iš naiviųjų Th0 limfocitų ir tuo pačiu metu slopina Th2 limfocitų, turinčių įtakos humoraliniam atsakui, brendimą ir aktyvumą.

Siekiant adekvačios CD4⁺ T ląstelių aktyvacijos ir citokinų sekrecijos, veikimas vien tik per antigeno receptorių nėra pakankamai efektyvus. Norint užtikrinti efektyvesnę T helperių aktyvinimą, vyksta papildoma stimuliacija, ligandui jungiantis per kitus T ląstelėje esančius receptorius. Kai kurios poros susidaro tarp T ląstelių paviršiaus molekulės CD2 ir ligando CD58, kuris yra ant antigeną pristatančios ląstelės. Kiti aktyvacijos (ligandų-receptorius) kompleksų variantai: CD11a/CD18:CD54; CD5:CD72; CD40L:CD40; CD28:CD80 arba CD86. T ląstelių inertiškumas ar tolerancija atsiranda tada, kai T ląstelės jungiasi su AP ląstelėmis, nebent signalas yra perduodamas

per vieną ar daugiau ligando-receptoriaus sąveikų, pavyzdžiui: specifiskai per CD40L:CD40 ir CD28:CD80 arba CD86) arba citokinais (IL-1 ir IL-6 iš APC). Šie T ląstelių baltymai ir ligandai, esantys ant AP ląstelių, yra taikiniai, į kuriuos nukreipiama imunoterapija [42].

2.5. Humoralinis atsakas į transplantatą

Humoralinis atsakas susijęs su B limfocitais. Šios ląstelės, aktyvintos antigeno ar kitų imuninių ląstelių sekretuojamų citokinų, verčiamos į plazmines ląsteles. Plazminės ląstelės sintetina antikūnus, nukreiptus prieš specifinį antigeną. Didžiausią įtaką žaibiškoje atmetimo reakcijoje daro IgM klasės antikūnai, nukreipti prieš ABO kraujo grupių antigenus. Nepageidaujamas atmetimo reakcijas gali sukelti ir IgG klasės antikūnai, kurie donoro organizme gali būti susidarę po kraujo transfuzijų, o moterims po nėštumų. Tokiu atveju galimos atmetimo komplikacijos bus ūmios fazės. Siekiant įrodyti antikūnų svarbą atmetimo reakcijoje, buvo atlikti eksperimentai su pelėmis, kurios turėjo B limfocitų deficitą. Tokios pelės išvengė žaibiškos transplantato atmetimo reakcijos.

2.6. Natūralių kilerių T (NKT) ląstelės

NKT ląstelės unikalios bei heterogeniškos T limfocitų populiacijoje. NKT ląstelės randamos užkrūčio liaukoje, blužnyje, kepenyse ir kaulų čiulpuose. Užkrūčio liauka organizme – NKT ląstelių brendimo vieta, o kepenyse NKT ląstelės yra kaupiamos. Sveikų žmonių periferinio kraujo tyrimų metu minimalus rastas NKT ląstelių procentinis skaičius buvo 0,00%, o maksimaliai siekė 11,3%. Remiantis moksliniais duomenimis nustatyta, jog vidutinis moterų NKT ląstelių procentinis skaičius 3,00%, su standartiniu nuokrypiu 2,5, vyrų – 3,5%, esant 2,9 standartiniam nuokrypiui. Tokie duomenys parodo, jog reikšmingos sąsajos tarp lyties ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus vidurkio nėra [25].

Ekspresuojamas NK ląstelių receptorių NK1.1 (antrosios klasės membranos glikoproteinas, koduojamas NKRP1 genų šeimos) ir TCR receptoriai dažniausiai naudojami apibrėžiant NKT ląsteles [40]. Tačiau ne visos NKT ląstelės turi ekspresuotą NK1.1 receptorių. Tai priklauso nuo ląstelės brandos, aktyvacijos stadijos, taip pat audinių ir kitų receptorių ekspresijos [43]. Kadangi, nustatant NKT ląsteles, nėra taikomas universalus žymuo, tai ir nustatyti šias ląsteles gali būti problemiška, šiuo tikslu ląstelės būna skirstomos į dvi grupes: klasikinės ir neklasikinės.

- *Klasikinės* NKT ląstelės priklausomos nuo CD1d. *Klasikinės* NKT yra dviejų tipų. Pirmasis tipas ekspresuoja CD4⁺ molekules, o antrasis tipas, kitaip dar vadinamas dvigubu neigiamu, neturi CD8⁺ ir CD4⁻ molekulių. Abi populiacijos CD1d molekulės pagalba atpažįsta sintetinį α -galaktozilceramidą (α -GalCer) ir taip gali būti aktyvinamos [11]. Klasikinės NKT ląstelės kiekybiniu aspektu lengviau vertinamos dėl α -GalCer/CD1d tetramero susijungimo.
- *Neklasikinės* NKT ląstelės, taip pat aktyvinamos per CD1d molekules, iškiriamos dviejų tipų: pirmasis tipas ekspresuoja CD8a⁺, bet ne CD8b⁻, antrasis tipas – dvigubai neigiamos ląstelės – neturinčios CD8a⁻, CD8b⁻ molekulių. *Neklasikinio* NKT tipo ląstelės nereaguoja į α -GalCer, bei nesudaro tetramero α -GalCer/CD1d, dėl to jas sunkiau identifikuoti ir įvertinti kiekybiškai [21].

Tiek klasikinės, tiek neklasikinės NKT ląstelės ekspresuoja TCR $\alpha\beta$ receptorių, bet yra žinoma, jog neklasikinės NKT ląstelės papildomai geba ekspresuoti ir TCR $\gamma\delta$ receptorių [38].

Žinant, kad ne visos NKT ląstelės ekspresuoja NK1.1 receptorių, specifinis α -GalCer

aktyvinimas NKT ląstelėse yra viena patikimiausių priemonių tikrinant klasikines NKT ląstelių funkcijas. α -galaktozilceramidas yra ligandas, specifiskai sąveikaujantis su CD1d molekule, jis stimuliuoja limfocitų proliferaciją, taip pat skatina antikūnų produkciją [28].

Tiek NK ląstelės, tiek NKT ląstelės turi ląstelės taikinio lizavimo mechanizmus be papildomo ląstelės aktyvavimo. Pagrindinė NKT ląstelių sistema naudojama taikinių ląstelių apaptozei aktyvinti, sąveikaujant Fas/FasL molekulėms [36]. Esant šiai sąveikai, NKT ląstelės išskiria citokiną IL-4, kuris aktyvina T ir B limfocitų proliferaciją ir MHC molekulių ekspresiją, B ląstelių virstimą į plazmines ląsteles, taip aktyvinant imunoglobulinų gamybą, ypač IgE klasės [19]. Be to, IL-4 aktyvina naivuosius Th0 limfocitus ir verčia juos į Th2 tipo limfocitus. INF- γ sekrecija atsiranda tuo pačiu metu kaip ir IL-4 [5]. Keletas efektorinių funkcijų, iš pradžių buvusių priskirtų NK ląstelėms, šiuo metu yra priskiriamos ir NKT ląstelėms arba nuo NKT priklausomoms funkcijoms. Taigi, NK ir NKT ląstelės funkciškai yra susietos *in vivo*. Stimuliuojant α -galaktozilceramidu, buvo matoma NK ir NKT ląstelių tarpusavio sąveika, kuri vyksta per NKT aktyvuotų ląstelių gaminamo INF- γ sekreciją. Eksperimentiškai nustatyta, kad NKT ląstelės daro didelę įtaką NK ląstelių aktyvumui [9]. Pelėms, kurioms buvo blokuoti NKT ląsteles koduojantys genai, suleidus α -GalCer, turinčio aktyvinti NKT ląsteles, buvo nustatytas mažas INF- γ kiekis organizme. Pelėms, kurių NKT ląstelės buvo visiškai aktyvios, atlikus tokį patį eksperimentą, fiksuotas reikšmingas INF- γ kiekio padidėjimas, lyginant su pelėmis be NKT ląstelių [28].

Užkrūčio liauka yra vieta, kur vystosi NKT ląstelės, įgyja TCR α ląstelės paviršiaus receptorių, yra supažindinamos su savais ir svetimais antigenais – taip vyksta teigiama ir neigiama klonų selekcija. Klonai, kurie gali būti aktyvūs prieš savus antigenus, sunaikinami. Šios selekcijos veikimo sritis neapsiriboja vien užkrūčio liauka. Autoreaktyvios NKT ląstelės taip pat naikinamos periferiniame kraujyje [16]. Šios ląstelės gali tiesiogiai migruoti iš kaulų čiulpų į kepenis, kuriose saugomos ir vystosi toliau. Kepenys turi c-kit⁺ pluriopotentes kamienines ląsteles, iš kurių vystosi daug įvairių ląstelių linijų, taip pat ir NKT ląstelės. NKT ląstelės kaupiasi kepenyse, nes jų paskirtis – imuninė organizmo priežiūra [12]. Atliktose studijose su pelėmis, kurioms buvo pašalintos užkrūčio liaukos, buvo matomas didelis NKT ląstelių kiekis kepenyse. Taip pat pastebėta, kad kepenyse esančių NKT ląstelių užtenka pakankamai palaikyti ir aktyvinti imuninį atsaką. Kepenyse esančių ląstelių, turinčių TCR $\gamma\delta$ domenų receptorius, skaičius yra ribotas (2–4 % visų NKT ląstelių), jos daro labai svarbią įtaką imunitetui ankstyvuojant gyvenimo laikotarpiu. Senstant užkrūčio liauka atrofuojasi: kepenų funkcija tampa labai svarbi stengiantis palaikyti imuninių ląstelių kiekį ir

imuninį atsaką organizme, esant užkrūčio liaukos funkcijos deficitui.

NKT ląstelių klasifikavimas į klasikinės ir neklasikinės, yra susijęs su NKT ląstelių aktyvinimo principu. Klasikinėms ir neklasikinėms ląstelėms aktyvinti reikalinga CD1d molekulė, esanti ant antigeną pateikiančios ląstelės [30]. Klasikinių NKT ląstelių aktyvinime dalyvauja ir α -GalCer, sudarydamas α -GalCer/CD1d tetramerą, kai tuo tarpu neklasikinių ląstelių aktyvinime jis nedalyvauja ir minėto tetramero nesudaro [21].

Klasikinės NKT ląstelės, turi TCR $\alpha\beta$ domenų receptorius. Tokios ląstelės po stimuliacijos IL-12 tampa citotoksiškoms ir turi didelę imunoreguliacinę reikšmę gaminant INF- γ ir IL-4 citokinus, kurie reguliuoja Th diferenciaciją [41]. Dėl IL-4 gamybos sutrikimo atsiradusio dėl reguliacijos sutrikimo klasikinėse NKT ląstelėse, galimi tokie patologiniai sutrikimai: lėtinis uždegimas, autoimuninės ligos dėl Th ląstelių aktyvumo sumažėjimo. Pagrindinė klasikinių NKT ląstelių funkcija yra gaminti INF- γ , kuris veikia kaip antinavikinis citotoksikas. Senesnių pelių klasikinės NKT ląstelės, turinčios TCR $\alpha\beta$ receptorius, demonstruoja mažą INF- γ gamybą tiek stimuliuojant ląsteles IL-2, tiek be stimuliacijos. Šis fenomenas taip pat matomas ir tiriant vyresnio amžiaus žmones [24]. Sumažėjęs citotoksiškumas galimai atsiranda ir dėl sumažėjusio perforinų ir granzimo B granulių kiekio ląstelėse. NKT ląstelių gaminamas INF- γ daro įtaką NK ląstelių neefektyviam citotoksiškumui: esant silpnam NKT ląstelių atsakui, gali nepakankamai aktyvinti NK ląsteles arba jas slopinti. Šis būdas, jungiantis NKT ir NK ląstelių funkcijas, yra svarbus, žvelgiant į silpną citokinų atktyvavimą, esant virusinei ar bakterinei infekcijai [3]. Dėl šios priežasties NKT ląstelės laikomos pirmaisiais imuniniais sargybiniais, veikiančiais nuo pat gimimo. Jei vyresniame amžiuje ši funkcija sutrinka, atsiranda didesnė rizika įsivyravuti infekcijos sukėlėjams.

Šiuo požiūriu kepenų NKT ląstelės, turinčios TCR $\gamma\delta$ receptorius, taip pat atlieka svarbų vaidmenį. Šių NKT ląstelių pogrupis klasifikuojamas kaip neklasikinių ląstelių. Šios ląstelės ekspresuoja NK1.1 žymenį, kuris taip pat turi citotoksinių savybių ir gamina tik INF- γ po stimuliacijos IL-12.

2.6.1. NKT ląstelės prognozuojant atmetimo reakciją

Siekiant įvertinti NKT ląstelių įtaką alotransplantato atmetimo reakcijai, buvo atlikti eksperimentiniai tyrimai su pelėmis. Pirminiai tyrimai, atlikti su NKT ląstelėmis, buvo skirti alogeninės transplantacijos atmetimo reakcijai analizuoti. Eksperimento metu nustatyta NKT ląstelių, ne tik kaip citolizinių ląstelių apsauginė funkcija, bet ir imuninius procesus reguliuojanti funkcija. Tokiu būdu įrodyta, kad pelėms, kurioms buvo suleista α -GalCer glikolipido, aktyvinančio NKT ląstelių funkciją, fiksuotas INF- γ gama citokino kiekio padidėjimas [4]. Visai kitaip pelių, kurios turėjo NKT ląstelių deficitą, po stimuliacijos glikolipidu INF- γ kiekis buvo palyginus mažas. INF- γ aktyvina ir kitas imunines ląsteles, tokias kaip B limfocitus, kurie, savo ruožtu, aktyvina humoralinį atsaką ir skatina ŽLA molekulių ekspresiją ant ląstelių, tokiu būdu didindami galimybę imuninėms ląstelėms aptikti pakitusias ląsteles [31,37]. Tai įrodo, kad NKT ląstelės atlieka ne vieną funkciją, turinčią įtakos pelių transplantato atmetimo reakcijoms [39]. NKT ląstelės taip pat atlieka reguliacinę funkciją ne tik per NK ląsteles, bet ir savarankiškai išskirdamos citokinus, pvz., IL-4, IL-10, IL-13 [13,32]. Dauguma tyrimų, skirtų NKT ląstelių funkcijoms tirti, atlikti naudojant graužikų šeimos atstovus, kurių imuninių ląstelių funkcijos skiriasi nuo žmogaus. Siekiant išsamiau iširti ir išsiaiškinti imuninius procesus, vykstančius žmogaus organizme alotransplantato atmetimo metu, reikia atlikti papildomus tyrimus.

2.7. NK ląstelės

Natūralių kiliųjų (NK) ląstelės gavo tokį pavadinimą dėl savo galimybės žudyti pakitusias ląsteles be papildomo aktyvinimo tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. NK ląstelės laikomos pagrindiniu komponentu imuniniam atsakui dėl jų gebėjimo naikinti ląsteles tiesiogiai arba per nuo antikūnų priklausantį ląstelinį citotoksiškumą. Be to, pakitusios ląstelės naikinamos neatsižvelgiant į ekspresuojamas ŽLA molekules. NK ląstelės fenotipas tradiciškai apibūdinamas kaip limfocitai, neturintys T ląstelių receptorių komplekso (TCR) bei CD3 molekulių, bet ekspresuojančios CD16 ir CD56 molekules. Atsižvelgiant į CD56 paviršiaus molekulės ekspresijos tankumą, galima išskirti CD56^{blankus} ir CD56^{ryškus} [6,14]. Grupė, kuri apibūdinama kaip CD56^{blankus}, periferiniame kraujyje sudaro apie 90 % visų NK ląstelių ir dideliu kiekiu ekspresuoja CD16 molekules. Visai kitaip apie 10 % sudaranti likusi NK ląstelių grupė, kuri apibūdinama kaip CD56^{ryškus}, turi mažą arba visai neturi CD16 molekulių ekspresijos [28]. Ištyrus sveikų žmonių periferinį kraują, nustatytas NK ląstelių procentinio skaičiaus vidurkis 12% su 1,00 standartiniu nuokrypiu. Minimalus rastas procentinis NK ląstelių skaičius sudarė 2%, maksimalus – 30% visų limfocitų [26].

NK ląstelės turi tiesioginį arba natūralų citotoksinų aktyvumą prieš virusų infekuotas ląsteles, leukemines ir kitas navikines ląsteles. Citotoksinų aktyvumą lemia dviejų tipų receptoriai esantys ant NK ląstelių membranos paviršiaus: NKR-P1 (lektinas) ir KIR receptoriai. NKR-P1 sujungtas su ligandu, kuris yra oligosacharidas, randamas ant daugelio ląstelių membranų [2,29]. Per NKR-P1 receptorių aktyvinama NK ląstelių granulių egzocitozė ir taip išskiriamas citokinas – perforinas [4]. Jis pažeistoje ląstelės membranoje sudaro poras, per kurias gali patekti kitas citokinas, išskiriamas iš NK ląstelių, t. y. granzimas B, kuris aktyvina ląstelės taikinio endogeninės apoptozės procesus [43].

Priešingai veikia KIR receptoriai: jis jungiasi su ląstelės MHC I klasės molekule ir atpažįsta nuosavus peptidus. Dėl šio receptoriaus slopinamas ir reguliuojamas NK ląstelių aktyvumas.

NK ląstelės turi ir FcRIII receptoriai, dėl to jas gali aktyvinti ir IgG klasės antikūnai. Eksperimentiniais metodais buvo nustatytas nuo antikūnų priklausomas citotoksinis NK aktyvumas. Tokio tipo aktyvinimas susijęs su didesne citotoksiškumo zona. NK ląstelės pažeidžia aplink ją esančius audinius, ne tik konkrečią ląstelę, kuri aktyvina NK ląstelių degranuliaciją [8].

2.7.1. NK ląstelės prognozuojant atmetimo reakciją

Nors NK ląstelių svarba odos ir kaulų čiulpų persodinimo operacijose jau nuo seno pagrįsta moksliniais tyrimais, visgi ilgą laiką buvo manoma, jog transplantatų atmetimo reakcijose NK ląstelių funkcija nereikšminga. Šios nuomonės buvo laikomasi dėl tyrimų rezultatų, rodančių jog NK ląstelių nebuvimas nepadarė įtakos organų transplantatų atmetimo reakcijos pasireiškimui. Remiantis naujausiomis studijomis, nusistovėjusi nuomonė persvartyta ir imta gilintis į NK ląstelių reikšmę atmetimo reakcijoje [38].

Ankstyva NK ląstelių aktyvacija po širdies transplantacijos organizmo imuniniam atsakui gali turėti du prieštarigus vienas kitam aspektus: ji gali inicijuoti transplantato atmetimo reakciją, arba kaip tik turėti reikšmę pastarojo toleracijai recipiento organizme [17].

Remiantis naujausiais tyrimais, pastebėta, jog NK ląstelės dalyvauja ir ūmioje atmetimo reakcijoje. Po atliktos transplantacijos praėjus trimis dienoms, transplantate buvo atrasti infiltruoti limfocitai, kurių didžiąją dalį sudarė NK ląstelės. Šis reiškinys pastebėtas tik alogeniniuose organų transplantatuose, tai susiję su NK ląstelių aktyvacija dėl atpažįstamo streso ligando ir dėl neatpažįstamų MHC I molekulių trūkumo donoro ląstelėse. Galima manyti, jog NK ląstelių aktyvacijai poveikį gali daryti dendritinių ląstelių gaminamas IL-12 ir Th1 ląstelių gaminamas IL-2 bei INF- γ . Toks aktyvavimas NK ląsteles įgalina naikinti transplantato ląsteles per perforino, granzimo, FasL ir TRAIL kelius [18].

Ūmaus atmetimo reakcijoje NK ląstelės taip pat sekretuoja ir INF- γ , ir TNF- α . INF- γ , kuri gamina NK ląstelės, stimuliuoja MHC molekulių ir kostimuliacinių receptorių atsiradimą ant antigeną pateikiančios ląstelės. Toks antigeną pateikiančių ląstelių aktyvinimas skatina tiek tiesioginį, tiek netiesioginį T ląstelių atsaką į alotransplantatą [38].

NK ląstelės pačios sukelti lėtinės atmetimo reakcijos negali, bet jos atieka reikšmingą vaidmenį aktyvindamos Th1 ląsteles. Kaip tiksliai NK ląstelės aktyvina CD4⁺T ląsteles, šiuo metu dar nėra iširta. Manoma, jog tai gali būti siejama su giminingu ryšiu tarp NK ir T ląstelių arba su T ląstelių aktyvacija per citokinus ar kitus mediatorius [20].

NK ląstelių sukelti audinio pažeidimai aktyvina autoimunines T ląsteles. Remiantis moksliniais tyrimais, nustatyta, jog autoimuninės T ląstelės, nukreiptos į širdies audinį, gali sukelti

širdies alotransplantato vaskulopatiją. Dar viena nuomonė apie NK ląstelių vaidmenį lėtinio atmetimo reakcijose – NK ląstelių aktyvacija sukelia pokyčius lokalių antigeną pateikiančių ląstelių veikloje.

Nors moksliniais duomenimis įrodyta, jog NK ir NKT ląstelės daro įtaką lėtinei atmetimo reakcijai, išsamių tyrimų, susijusių su NK ir NKT veikimo mechanizmais, nėra atlikta. Todėl šis mokslo tiriamasis darbas skirtas įvertinti ligonių, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija, NK ir NKT ląstelių skaičiaus, kaip diagnostinio žymens nustatant atmetimo reakciją iš periferinio kraujo, pokyčius.

3. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR METODAI

3.1. Tiriamieji

Tiriamoji medžiaga buvo surinkta 2011–2015 metais VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos Širdies chirurgijos skyriuje. Tyrimai atlikti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos Laboratorinės medicinos centro (VUL SK LMC) Klinikinės imunologijos ir kraujo perpylimo laboratorijoje. Buvo ištirti 59 pacientai, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija. Iš visų pacientų buvo 9 moterys ir 50 vyrų. Tiriamųjų amžius nuo 3 mėnesių iki 74 metų ($41,0 \pm 19,4$).

Tikrinant, ar NK ir NKT ląstelių rodikliai yra patikimi atmetimo reakcijai įvertinti, pastarieji rodikliai buvo lyginami su biopsijos rezultatais. 1 lentelėje pateikti biopsijos tyrimo rezultatų vertinimo kriterijai. Nors biopsija yra patikimas tyrimo metodas, ji kelia riziką paciento sveikatai, todėl šis tyrimas nėra atliekamas taip dažnai, kaip periferinio kraujo imunologiniai tyrimai[33].

1 lentelė. Histologinio tyrimo atmetimo reakcijos vertinimas [22].

Biopsijos vertinimo skalė	Atmetimo reakcijos laipsnis
0	Atmetimo reakcijos nėra
1	Lengva atmetimo reakcija
2	Vidutinio sunkumo atmetimo reakcija
3	Sunki atmetimo reakcija

16 pacientų nebuvo atlikta širdies raumens biopsija. Šių pacientų duomenys toliau nebuvo naudoti statistinėje duomenų analizėje. NK ir NKT ląstelių skaičiaus pokyčių po transplantacijos vertinimas: tiriamieji pacientai, kuriems atlikta širdies raumens biopsija, suskirstyti į 4 grupes pagal širdies raumens biopsijos rezultatus vertinant atmetimo reakciją (2 lentelė). 16 pacientų atmetimo reakcija nepasireiškė, 12 pacientų pasireiškė lengva atmetimo reakcija, 7 pacientams pasireiškė vidutinio sunkumo atmetimo reakcija, 8 pacientams nustatyta sunki atmetimo reakcija.

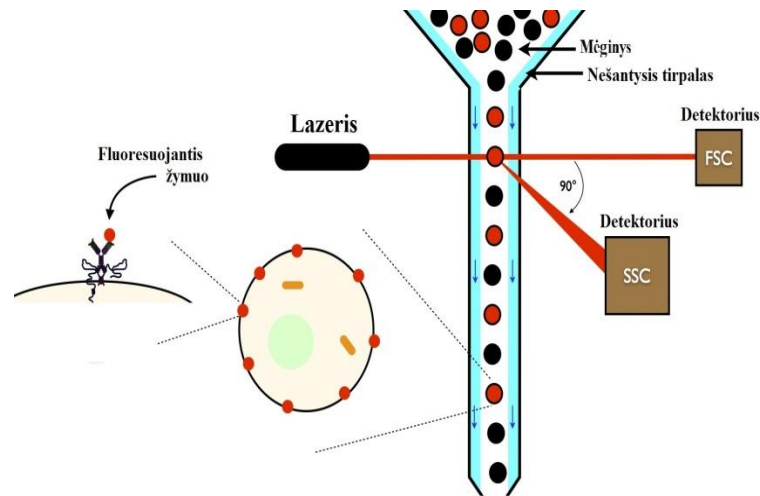
2 lentelė. Tiriamųjų grupės pagal širdies raumens biopsijos rezultatus

Tiriamųjų grupė	Biopsijos įvertinimas	Pacientų skaičius	Tyrimų skaičius	Amžius metais
0	atmetimo reakcija 0	16	38	41,9 ± 16,5
1	atmetimo reakcija 1	12	48	47,0 ± 13,4
2	atmetimo reakcija 2	7	20	46,1 ± 16,0
3	atmetimo reakcija 3	8	44	42,2 ± 14,6

4.2. Metodai

3.2.1. Tėkmės citometrijos metodas

Tyrimo metu duomenims surinkti buvo naudojamas *FACS Calibur* (Becton Dickinson, JAV) tėkmės citometras, kurio veikimas pagrįstas keliais principais (1 schema).



1 schema. Tėkmės citometrijos principas. Hidrodinaminė ir lazerių sistema

Hidrodinaminis principas. Taikant šį principą, tiriamajame mėginyje esančios ląstelės, prieš joms kertant lazerio spindulį, yra išrikiuojamos viena paskui kitą. Tokioms sąlygoms sudaryti pasitelkiamas nešantysis tirpalas ir pastovaus slėgio sistema.

Optinė sistema, kurią sudaro du monochrominiai lazeriai. Jais analizuojama ląstelių dydis, ląstelių vidinė sandara, ląstelės paviršuje esančių molekulių, padengtų fluorochromu, savybės – skirtingų bangos ilgių emisija.

Pagrindinis lazeris argono dujų lazeris, pasiekiantis 15 mW galią ir galintis fiksuoti 488 nm bangos ilgį. Sistemoje esantis diodinis lazeris skleidžia 635 nm bangos ilgio šviesą, kuri atitinka raudoną spalvą. Diodinis lazeris skirtas sužadinti žymenis, kurie fluoresuoja daugiau nei 650 nm bangos ilgiu. Šia lazerių sistema kiekvienoje ląstelėje, praeinančioje lazerio spindulius, galima išmatuoti iki 6 parametru: priekinės sklaidos (FSC), šoninės sklaidos (SSC) ir tris fluoresuojančias

emisijas (žalią, geltoną-oranžinę ir raudoną), naudojant argono dujų lazerį.

Išsamiai ląstelių analizei komerciškai gaminami antikūnai, kurie yra kovalentiškai sujungti su fluorochromu. Antikūnai padengia išorines ląstelės struktūras, pavyzdžiui, leukocitų diferenciacijos antigeną (CD). Prisijungus antikūnui ir jį sužadinus lazerio šviesa, fluorochromu žymėtas antikūnas pradeda švytėti tik jam būdinga šviesos emisija.

Su antikūnu nesujungti fluorochromai skirti žymėti įvairias ląstelių vidines struktūras, tokiu būdu siekiant išanalizuoti citokinų ir citotoksinų ekspresiją, ląstelės funkcijas, subrendimo ar aktyvumo lygį.

Plačiausiai naudojamas fluorochromas yra FITC (fluoresceino izotiocianatas), kuris fiksuojamas žaliajame kanale FL1. PE (fikoeritrinas), sužadinamas ties geltonos-oranžinės spalvos bangos ilgiu ir sužadintas fiksuojamas FL2 detektoriuje. PerCP (peridininio chlorofilo baltymas) yra sužadinamas ties 488 nm bangos ilgiu ir spinduliuoja raudonos bangos spalvą.

3.3. Reagentai ir prietaisai

Atliekant tyrimą naudoti šie reagentai ir prietaisai:

1. Vienkartiniai *Falcon* 12 x 75 mm mėgintuvėliai;
2. Vienkartinės pirštinės;
3. Sūkurinė purtyklė;
4. Centrifuga;
5. Automatinė pipetė su keičiamais vienkartiniais antgaliais;
6. Dejonizuotas vanduo;
7. Lizuojantis tirpalas (*FACS lysing solution* 1:10);
8. Plaunamasis buferis (PBS);
9. Monokloniniai antikūnai, žymėti fluorochromu: FITC, PE (3 lentelė);
10. 1 % paraformaldehido tirpalas;

3 lentelė. Monoklininiai antikūnai, naudoti tyrimo metu.

mAk pagal CD klasifikaciją	Fluorochromas	Specifiškumas
CD3	FITC	T limfocitų žymuo
CD14	FITC	Monocitų/Makrofagų žymuo
CD45	PE	Bendras leukocitų žymuo
CD16/56	PE	Natūralių kilerių žymuo
IgG1	FITC	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės
IgG2a	PE	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės

3.4. Darbo eiga

Punktuoiant veną, periferinis kraujas imamas į sterilų vakuuminį mėgintuvėlį su ličio heparinu, kuris neleidžia kraujui sukrešėti ir taip nepažeidžia kraujo forminių elementų. Tada paruošiamas kraujo mėginys.

Mėginio paruošimas:

1. Į pažymėtus *Falcon* 12 x 75 mm mėgintuvėlius pilama 20 µl monokloninių antikūnų. Monokloniniai antikūnai, naudojant sūkurinę purtyklę, sumaišomi su 100 µl nesukrešėjusio kraujo mėginiu ir inkubuojami 20 minučių tamsoje, kambario temperatūroje (18 – 25 °C).
2. Po inkubavimo į mėgintuvėlius įpilama 2 ml FACS lizavimo tirpalo. Sumaišius purtykle, inkubuojama 10 min. tamsoje, kambario temperatūroje (18 – 25 °C).
3. Po 10 min. inkubacijos mėginiai yra 5 min. centrifuguojami 500 g išcentrine jėga. Po to švelniai nupilamas supernatantas, paliekant jo apie 50 µl ir stengiantis nesudrumsti.
5. Į mėgintuvėlius pilama 1 ml PBS, sumaišoma purtykle ir 5 min. centrifuguojama 500 g išcentrine jėga.
6. Supernatantas nupilamas, paliekant mėgintuvėlyje 50 µl ir stengiantis nesudrumsti.
7. Užpilama 500 µl 1 % paraformaldehido tirpalo.

Po paruošimo citometrinei analizei, mėginiai gali būti analizuojami iš karto arba ne vėliau kaip po 24 valandų nuo paruošimo, jei yra laikomi tamsoje, 2 – 8 °C temperatūroje. Prieš tiriant, mėginiai gerai sumaišomi purtykle.

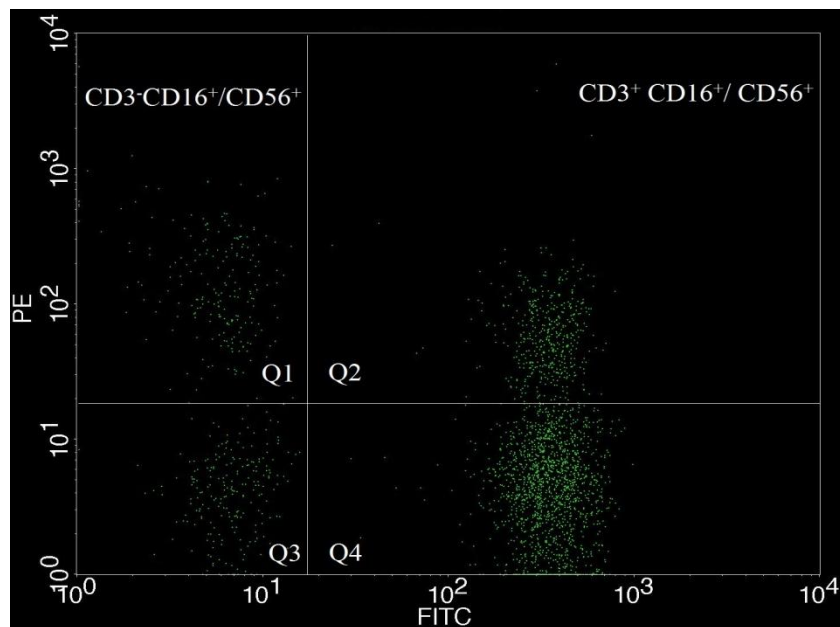
3.4.1. Duomenų analizė

Duomenų rinkimas ir analizavimas atliktas naudojant *FACS Calibur* (BD, JAV) tėkmės citometrą. Prieš darbą tėkmės citometras nustatomas ir koreguojama fluorescencijos spektrų persidengimo kompensacija, naudojant *FACSComp* programinę įrangą bei *CaliBrite* spalvotus rutuliukus.

Naudojant *CellQuestPro* programinę įrangą, tėkmės citometru surinkti duomenys buvo analizuojami. Atliekant analizę, kiekvienas mėginys išmatuotas, surenkant duomenis apie 10 000 ląstelių, ir toliau analizuojamas, įvertinant keturis parametrus: ląstelės dydį, ląstelės grūdėtumą, du skirtingus monokloninius antikūnus (FITC ir PE), kurie jungiasi prie specifinių ląstelės struktūrų.

Prieš mėginio analizavimą buvo atliekama neigiama nespecifinės fluorescencijos kontrolė, naudojant izomorfinius specifiskus pelių žymenis (IgG1, IgG2a). Kontrolinio mėginio tikslas – įvertinti, ar tiriamajame mėginyje nėra nespecifinių antikūnų jungimosi prie ląstelių paviršiaus. Jei analizuojant yra švytėjimas ir jis didesnis kaip 5%, mėginys turi būti ruošiamas iš naujo.

Specifinis žymenų jungimasis prie ląstelių paviršiaus analizuojamas *CellQuestPro* programine įranga ir pateikiamas taškine diagrama, kuri yra suskirstoma į atitinkamus kvartilius pagal žymenų jungimąsi. 1 paveiksle pavaizduota, kaip taškinėje diagramoje pasiskirsto ląstelės, susijungusios su tyrimo metu naudojamais žymenimis. Pateiktame pavyzdyje Q1 pažymėtas kvartilis rodo ląsteles, kurios yra prisijungusios monokloninį antikūną su PE fluorochromu. Ląstelės, priskirtos Q2 zonai, prisijungusios PE ir FITC fluorochromais žymėtus monokloninius antikūnus. Q3 priskiriamos ląstelės, kurios neturi jokių specifinių struktūrų naudojamiems antikūnams. Q4 ląstelės turi specifiskas struktūras, būdingas tik su FITC fluorochromu sujungtam antikūnui. Vertinant kaip ląstelės susijungia su tam tikrais žymenimis, galima atskirti ląstelių subpopuliacijas, tokias kaip NK ir NKT, ir nustatyti šių ląstelių skaičių periferiniame kraujyje.



1 paveikslas. NKT ir NK ląstelių vaizdas taškinėje diagramoje

3.4.2. Statistinė duomenų analizė

Tyrimų rezultatai analizuojami ir pateikiami naudojant programų paketus SPSS 24.0, *Microsoft Office Excel 2007*. Duomenys pateikti analizuojant aritmetinį vidurkį bei standartinį nuokrypį. Siekiant įvertinti atmetimo reakcijos bei NK ir NKT ląstelių ryšį, buvo naudojama vienfaktorinė dispersinė analizė (*One-way ANOVA*). Duomenys pateikiami diagramose ir lentelėse.

4. REZULTATAI

Tiriamieji buvo suskirstyti į 4 grupes, kurios buvo sudarytos atsižvelgiant į biopsijos tyrimų rezultatus (1 lentelė). Visiems pacientams bendrai atlikta 150 tyrimų, siekiant nustatyti NK ląstelių skaičių periferiniame kraujyje (4 lentelė) ir 149 tyrimai, siekiant nustatyti NKT ląstelių skaičių periferiniame kraujyje (5 lentelė).

Tiriant NK ląstelių procentinį skaičių pacientų periferiniame kraujyje, 0 grupėje esantiems pacientams buvo priskirti tyrimai, kurių histologinis širdies raumens tyrimas atmetimo reakcijos neparodė, viso jiems atlikta 38 tyrimai. 1 grupėje – vertinant histologiškai šioje grupėje buvo matoma lengva atmetimo reakcija – atlikti 48 tyrimai. 2 grupėje, kurioje biopsijos tyrimas parodė vidutinio sunkumo atmetimo reakciją – 20 tyrimų. Sunkiai atmetimo reakcijai pagal biopsijos tyrimo rezultatą pasireiškusioje 3 grupei priskirtiems pacientams atlikti 44 tyrimai.

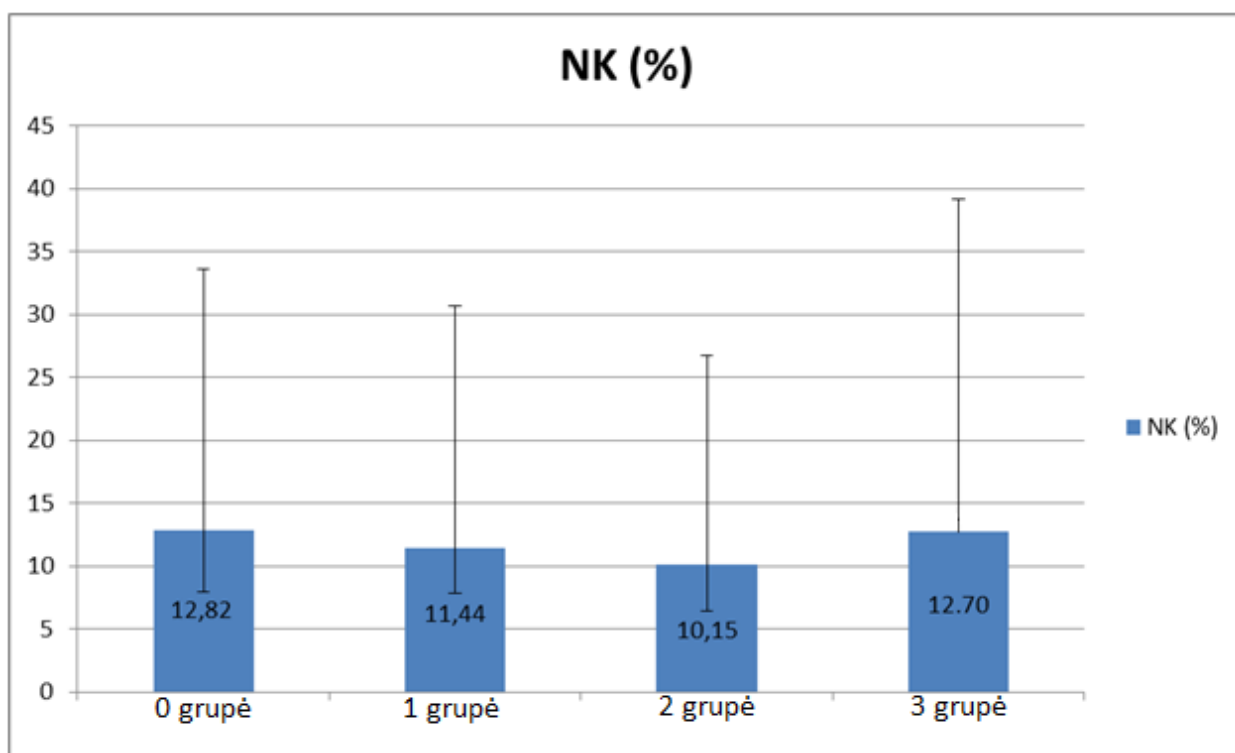
4 lentelė. Vidutinis procentinis NK ląstelių skaičiaus pasiskirstymas tiriamųjų grupėse

Tirtų pacientų grupės	NK (%)	p
0 gr.	12,82 ± 7,97	0.718
1 gr.	11,44 ± 7,82	
2 gr.	10,15 ± 6,46	
3 gr.	12,70 ± 13,73	

Visos grupės buvo išanalizuotos vertinant NK ląstelių procentinį skaičių kraujyje. 0 grupėje, kurioje atmetimo reakcija nepasireiškė, visų atliktų 38 tyrimų rezultatų vidurkis buvo 12,82% – didžiausias, lyginant visų keturių grupių rezultatus, standartinis nuokrypis 7,97. Daugiausiai, 48 tyrimai, atlikti pacientams, kurie priskiriami 1 grupei ir pasižymi lengva atmetimo reakcija, šios grupės pacientų tyrimų rezultatų vidurkis, rodantis NK ląstelių skaičių kraujyje, yra 11,44%, standartinis nuokrypis šioje grupėje buvo 7,82. 2 grupėje, kuriai priskirtiems pacientams atmetimo reakcija buvo vidutinio sunkumo, atlikta 20 tyrimų; NK ląstelių vidutiniškai rasta 10,15%, standartinis nuokrypis šioje grupėje 6,46. 3 grupėje, kuriai priskirti pacientai su sunkia atmetimo reakcija, atlikti 44 tyrimai, ramiantis gautais rezultatais nustatyta, jog vidutinis NK ląstelių skaičius šioje grupėje 12,70%, standartinis nuokrypis 13,73.

0, 1 ir 2 grupių rezultatų pasiskirstymas ženkliai nesiskyrė tarpusavyje, 3 grupės rezultatų dispersija buvo didžiausia. Tokiam dideliam standartiniam nuokrypiui (13.73) įtaką galėjo daryti įvairūs kintamieji: pacientų amžius, lytis, taikoma imunosupresijos strategija ir organizmo atsakas į imunosupresinius vaistus. Remiantis gautais duomenimis apie vidutinį tam tikros pacientų grupės NK ląstelių skaičių kraujyje ir atsižvelgiant į tai, kad vidutiniai skaičiai vertinant procentine išraiška tarpusavyje skyrėsi neženkliai, galima teigti, jog NK ląstelių skaičius tiesioginės sąsajos su atmetimo reakcijos sunkumu neturi.

Stulpelinėje diagramoje matomi visų keturių grupių pacientų tyrimų rezultatų, tiriant NK ląstelių kiekį periferiniame kraujyje, vidurkiai su standartiniu nuokrypiu (2 paveikslas).



2 paveikslas. NK procentinis (%) duomenų pasiskirstymas tiriamose grupėse.

Siekiant nustatyti NK ląstelių skaičiaus vidurkių skirtumus pagal atmetimo sunkumo rodiklį, buvo atlikta vienfaktorinė dispersinė analizė (One-way ANOVA), kurios tikslas įvertinti, ar tiriamųjų grupių rezultatų vidurkiai reikšmingai skiriasi. Rezultatai parodė, kad NK ląstelių skaičiaus procentinės išraiškos vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskiria – statistinio reikšmingumo (p) įvertis didesnis negu 0,05 ($p = 0,718$) (4 lentelė), dėl šios priežasties nuspręsta

palyginti tiriamųjų grupių vidurkius vienos su kita tarpusavyje (konkrečiau – 0 grupė, kurioje pacientams atmetimo reakcija nepasireiškė, buvo lyginama su likusiomis trimis grupėmis, turinčiomis skirtingo sunkumo atmetimo reakciją).

Kadangi sveikiems žmonėms nebuvo atlikti tyrimai (tirti tik pacientai po širdies transplantacijos), kaip kontrolinis rodiklis pasirinkta 0 grupė, kurioje po širdies transplantacijos neįvyko atmetimo reakcija. Nors pagal p reikšmę statistiškai reikšmingo rezultato patvirtinti negalima, visgi pastebėta, jog lyginant 0 grupės rezultatus su 1 grupės, p reikšmė buvo 0,499, lyginant 0 grupės su 2 – 0,984, o lyginant 0 grupės NK ląstelių procentinio skaičiaus rezultatą su 3 grupės p reikšmė buvo 0,219.

Tiriant NKT ląstelių procentinį skaičių pacientų periferiniame kraujyje, rezultatai buvo analizuojami tuo pačiu principu kaip ir nustatant NK ląstelių procentinį skaičių – buvo atliekami tyrimai ir vertinami vidutiniai procentiniai skaičiai kiekvienoje pacientų grupėje pagal atmetimo reakcijos sudėtingumą.

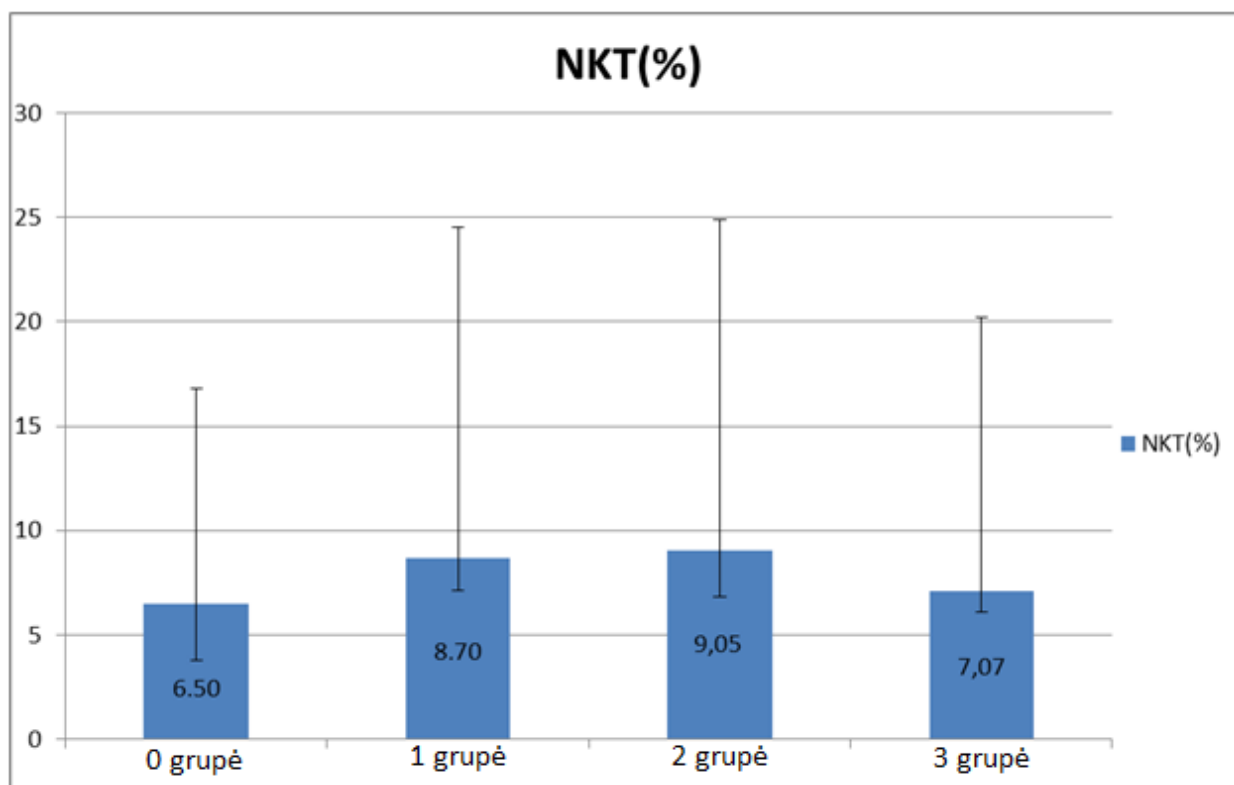
5 lentelė. Vidutinis procentinis NKT ląstelių skaičiaus pasiskirstymas tiriamųjų grupėse

Tirtų pacientų grupės	NKT (%)	p
0	6,50 ± 3,78	0,241
1	8,70 ± 7,12	
2	9,05 ± 6,81	
3	7,07 ± 6,06	

Visos grupės išanalizuotos vertinant NKT ląstelių procentinį skaičių kraujyje. 0 grupės pacientams, kurių histologinis širdies raumens tyrimas atmetimo reakcijos neparodė, atlikti 38 tyrimai; jų rezultatų vidurkis buvo 6,50 % su mažiausiu visose keturiose grupėse standartiniu nuokrypiu – 3,78. 47 tyrimai buvo atlikti 1 grupei priskiriamiesiems pacientams su pasireiškusia lengva atmetimo reakcija – tai gausiausia tyrimų skaičiumi grupė; vidutinis NKT ląstelių procentinis skaičius joje – 8,70 %, standartinis nuokrypis – 7,12. 2 grupės pacientų, kurių histologinis širdies raumens tyrimas parodė vidutinio sunkumo atmetimo reakciją, atlikta 20 tyrimų; šios grupės rezultatai išsiskyrė tarp kitų aukščiausiu NKT ląstelių procentiniu skaičiumi – vidutiniškai rasta 9,05 % NKT ląstelių; standartinis nuokrypis 6,81. 44 tyrimai atlikti pacientams, kuriems pasireiškė sunki atmetimo reakcija (jie priklauso 3 grupei), vadovaujantis gautais periferinio kraujo tyrimų

rezultatais, nustatytas vidutinis NKT ląstelių procentinis skaičius 7,07 % su standartiniu nuokrypiu 6,06.

Visų keturių grupių pacientų tyrimų rezultatai pateikiami stulpelinėje diagramoje (3 paveikslas), kurioje matomi rastų procentinių NKT ląstelių skaičių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais.



3 paveikslas. NKT procentinis (%) duomenų pasiskirstymas tiriamose grupėse

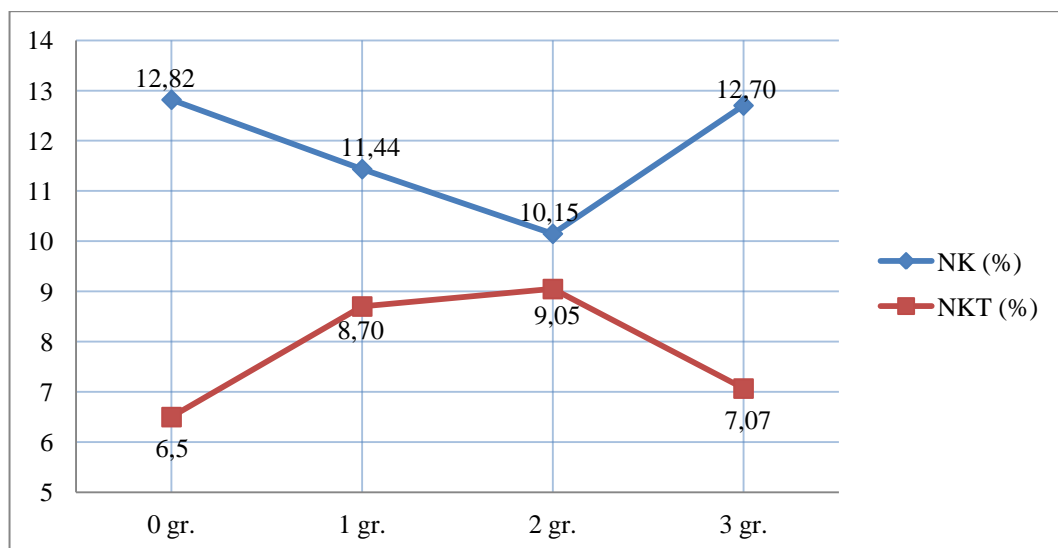
Siekiant nustatyti NKT ląstelių skaičiaus vidurkių skirtumus pagal atmetimo rodiklį, taip pat kaip ir NK ląstelių vidurkių palyginime, atlikta vienfaktorinė dispersinė analizė (One-way ANOVA). Rezultatai parodė, kad NKT ląstelių skaičiaus procentinės išraiškos vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskiria; statistinio reikšmingumo (p) rodiklis yra didesnis negu 0,05 ($p = 0,241$) lygiai taip pat kaip ir ankščiau aptartu atveju, lyginant NK ląstelių skaičius tarp grupių (5 lentelė). Nepastebėjus statistiškai reikšmingo skirtumo tarp visų keturių grupių vidurkių, buvo lyginami tiriamųjų grupių, kuriose atmetimo reakcija pasireiškė, vidurkiai.

Kaip kontrolė buvo naudojami 0 grupės pacientų periferinio kraujo tyrimų rezultatų

vidurkiai. Pastarieji (1, 2 ir 3 grupių NKT ląstelių procentinio skaičiaus rezultatai) buvo kiekvienas atskirai lyginami su 0 grupės, kurioje nebuvo pasireiškusi atmetimo reakcija po širdies transplantacijos. Minimalaus statistinio reikšmingumo įverčio ($p=0,05$) nebuvo pasiekta nei vienu iš trijų lyginamųjų atvejų: nei lyginant 0 grupės tyrimų rezultatų vidurkius su 1 (statistinio reikšmingumo įvertis šiuo atveju 0,100), nei 0 grupės su 2 (statistinio reikšmingumo įvertis 0,080), nei 0 grupės su 3 (statistinio reikšmingumo įvertis 0,648). Visgi, atliekant NKT ląstelių procentinio skaičiaus vidurkių palyginimą tarp 0 ir kitų grupių, pastebėta – palyginimo rezultatas su 1 grupės vidurkiu labiausiai priartėjo prie minimalios p reikšmės. Tai leidžia daryti prielaidą, jog šioje grupėje atliktų tyrimų metu rastas NKT ląstelių procentinis skaičius galimai turėjo įtakos atmetimo reakcijos pasireiškimui ar jos sunkumui.

Tiriamąjį mokslinį darbą metu vertintas NKT ir NK ląstelių skaičiaus pokytis, pacientų, su skirtingo sunkumo atmetimo reakcija periferiniame kraujyje ir ieškoma tendencingo kitimo, galinčio patvirtinti ar paneigti šių ląstelių įtaką atmetimo reakcijos sunkumo lygiui. NK ląstelių skaičius rastas didžiausias nesant atmetimo (12,82%), esant lengvam ir vidutiniam atmetimams jis nežymiai mažėjo (11,44% ir 10,15%), pasireiškus sunkiam atmetimui vėl nereikšmingai padidėjo (12,70%). Remiantis literatūriniais duomenimis, žinoma, jog atlikus sveikų žmonių periferinio kraujo tyrimus, NK ląstelių procentinis skaičius gali svyruoti nuo minimalaus 2% iki maksimalaus 30%, o šių ląstelių procentinio skaičiaus vidurkis siekia 12% su 1,00 standartinio nuokrypiu. Laikant šiuos duomenis normos ribomis, galima teigi, kad šio mokslinio tiriamojo darbo metu nustatyti NK ląstelių procentiniai skaičiai visose pacientų grupėse su skirtingu atmetimo sunkumo laipsniu šių ribų neperžengia.

Priešingai nei NK, NKT ląstelių procentinis skaičius mažiausias aptiktas nesant atmetimo (6,50%), esant lengvam ir vidutinio sunkumo atmetimui nereikšmingai didėjo (8,70% ir 9,05%), sunkaus atmetimo atveju vėl neženkliai sumažėjo (7,07%) (4 paveikslas). Iš literatūroje pateikiamų sveikų žmonių periferinio kraujo tyrimų rezultatų žinoma, jog minimaliai NKT ląstelių randama 0,00%, o maksimaliai 11,3%. Pacientų su skirtingo sunkumo atmetimo reakcijomis, ar tų, kuriems atmetimas nepasireiškė, periferiniame kraujyje rastas NKT ląstelių procentinis skaičius neperžengia sveikų žmonių NKT procentinio skaičiaus ribų.



4 paveikslas. NKT ir NK ląstelių procentinio skaičiaus kitimo tendencija, priklausomai nuo atmetimo sunkumo.

Laikyti NK ir NKT ląstelių skaičiaus reikšmingais atmetimo reakcijos sunkumui identifikuoti nėra objektyvu dėl to, jog grupėms priskirti pacientai skyrėsi tarpusavyje lytimi bei amžiumi. NK ląstelių procentinio skaičiaus patikima sąsaja su atmetimo sunkumo lygiu laikyti negalima ir dėl itin didelio standartinio nuokrypio, siekusio 13,73.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Pastaruojų metu atliekama vis daugiau tyrimų, siekiant įvertinti imuninių ląstelių (NK, NKT, B limfocitų, CD4⁺ T ląstelių, CD8⁺ T ląstelių) subpopuliacijas žmonių, kurie yra po širdies transplantacijos, kraujyje. Taip pat analizuojami minėtų ląstelių tarpusavio ryšiai, imuninę sistemą sudarančių komponentų funkcijos.

Manoma, jog NK ir NKT ląstelės atlieka svarbią funkciją transplantatų toleravimo bei atmetimo reakcijose.

NK ląstelės laikomos reikšmingomis imuniniam atsakui, dėl jų gebėjimo naikinti ląsteles tiesiogiai arba per nuo antikūnų priklausantį ląstelinį citotoksiškumą. Ankstyva NK ląstelių aktyvacija po širdies transplantacijos gali inicijuoti transplantato atmetimo reakciją, arba kaip tik turėti reikšmę pastarojo tolerancijai recipiento organizme. NKT ląstelės žinomos kaip vienos pirmųjų ląstelių, dalyvaujančių imuniniame atsake. Jos aktyvina NK ląsteles, taip pat atlieka reguliacinę funkciją. NKT ląstelės reikšmingos prieš naviką nukreiptuose procesuose bei geba slopinti autoimuninių ligų atsiradimą. Eksperimento, kurio metu pelėms, esančioms po organų transplantacijos, tirtas kraujas, nustatyta, kaip NKT ląstelės dalyvauja imuniniuose procesuose: citokinų ir INF- γ išskyrimo.

Vienas šio mokslinio darbo tikslų – nustatyti ryšį tarp NK ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus ir biopsijos tyrimų rezultatų, kurie indikavo skirtingo sunkumo atmetimo reakcijas, ar, kai kuriais atvejais, parodė, jog ši reakcija nepasireiškė. NK ir NKT ląstelių veikimo mechanizmai atmetimo ar toleravimo reakcijose po transplantacijos apžvelgti remiantis literatūros šaltiniais. Mokslinio darbo tyrimo metu buvo vertinamas šių ląstelių procentinis skaičius ir siekiama nustatyti jų sąsajas su transplantato atmetimo reakcijomis. Literatūros apžvalgoje rasta duomenų apie tai, jog NKT ląstelės gali daryti įtaką alotransplantato tolerancijos procesams, naikindamos antigeną pateikiančias ląsteles. Taip pat eksperimentuojant su pelėmis buvo pastebėtas reikšmingas ryšys tarp NK ir NKT ląstelių, susietų per citokinų sekreciją. Organizme esant NKT ląstelių stygiui ar jų funkcijos sutrikimams, stebimas sumažėjęs INF- γ kiekis kraujyje. Jis svarbus aktyvinant T-helperių funkcijas. Tokiais atvejais imuninis atmetimo atsakas į alotransplantatą sumažėja ir pelių gyvenimo

trukmė tampa reikšmingai ilgesnė, lyginant su pelėmis, turinčiomis normalų NK ir NKT ląstelių skaičių.

Šio mokslinio tiriamojo darbo eigoje pacientams bendrai atlikta 150 tyrimų, siekiant nustatyti NK ląstelių skaičių periferiniame kraujyje ir 149 tyrimai, siekiant nustatyti NKT ląstelių skaičių periferiniame kraujyje. Tyrimai buvo atliekami skirtingoms grupėms priskirtiems pacientams, bei nustatomas vidutinis procentinis ląstelių skaičius. Į keturias grupes pacientai, kuriems atlikta širdies transplantacija, buvo suskirstyti pagal biopsijos tyrimo rezultatus: pagal tai, kokio sunkumo atmetimo reakcija pasireiškė (0 grupė – atmetimo reakcija nepasireiškė, 1 grupė – pasireiškusi atmetimo reakcija buvo lengva, 2 grupė – atmetimo reakcija vidutinio sunkumo ir 3 grupė, kurioje atmetimo reakcija buvo sunki). Keturiose tiriamųjų grupėse NK ląstelių procentinis skaičius svyravo nuo 10,15% iki 12,82%, NKT ląstelių – nuo 6,50% iki 9,05%.

Siekiant nustatyti NK ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus vidurkių skirtumus pagal atmetimo reakcijos sunkumo rodiklį, atlikta vienfaktorinė dispersinė analizė. Tyrimų rezultatų analizės metu nustatyta, jog NK ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus vidurkiai minimalaus statistinio reikšmingumo (p) rodiklio nepasiekė. Statistiškai reikšmingais duomenis būtų galima laikyti, jei p įvertis būtų ne didesnis kaip 0,05. Tai leidžia daryti išvadą, kad tarp šių ląstelių skaičiaus ir atmetimo reakcijos pasireiškimo ar jos sunkumo statistiškai patikimos priklausomybės nėra. Gauti NK ir NKT ląstelių vienfaktorinės dispersinės analizės rezultatai parodė, jog negalima išvystyti reikšmingos sąsajos tarp efektorinių ląstelių procentinio skaičiaus ir atmetimo reakcijos sunkumo lygio.

Šio tiriamojo mokslinio darbo metu gauti duomenys iš periferinio kraujo tyrimų negali įvertinti NK ir NKT ląstelių įtakos, darytos transplantatui atmetimo ar toleravimo reakcijose. Dėl šių ląstelių savybės infiltruotis į transplantato audinį, būtų tikslinga atlikti efektorinių ląstelių procentinio skaičiaus vertinimą jame – tai galimai padėtų konkrečiau apibrėžti jų svarbą imuninio atsako procesuose.

Dauguma apžvelgtų studijų, susijusių su NK ir NKT ląstelių funkcijomis, paremtos eksperimentų atliktų su graužikais, kuriems transplantuoti organai, rezultatais. Neaptikta studijų, sietinų su žmogaus imuninės sistemos veikimu, vertinant NK ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus pokyčio po transplantacijos aspektu. NK ir NKT ląstelių veikimo mechanizmai žmogaus ir graužikų organizmuose skiriasi – tikslesniam vertinimui reikėtų atlikti daugiau tyrimų. Būtų tikslinga įvertinti ne tik NK ir NKT ląstelių procentinį skaičių, bet ir iširti jų funkcijas, veikimo mechanizmus,

brandos lygį bei šio lygio įtaką imuniniam atsakui, kuris daugumoje mokslinių straipsnių nėra detalai aprašytas ir iki galo ištirtas

IŠVADOS

1. Tėkmės citometrijos metodu NKT ląstelių skaičius periferiniame kraujyje ligonių, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija, nesant atmetimo rastas mažiausias (6,50%), lengvo ir vidutinio sunkumo atveju šių ląstelių skaičius nereikšmingai didėjo (8,70% ir 9,05%), o esant sunkiam atmetimui jis vėl sumažėjo (7,07%).
2. NK ląstelių skaičius periferiniame kraujyje ligonių, kuriems atlikta širdies persodinimo operacija, rastas didžiausias (12,82%) nesant atmetimo, lengvo ir vidutinio sunkumo atmetimo metu jis nereikšmingai mažėjo (11,44% ir 10,15% atitinkamai), o sunkaus atmetimo atveju jis vėl padidėjo (12,70%).
3. Atlikus duomenų analizę, nustatyta – pasireiškus lengvam, vidutinio sunkumo, sunkiam atmetimui, ar jam nepasireiškus, tiek NKT, tiek NK ląstelių procentinio skaičiaus vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskiria – minimalus statistinio reikšmingumo įvertis (p) 0,05 nebuvo pasiektas.
4. Analizuojant tyrimų rezultatus, nustatyta: NKT ir NK ląstelių procentinio skaičiaus vidurkiai minimalaus statistinio reikšmingumo (p) rodiklio nepasiekė. Tai leidžia daryti išvadą, kad tarp šių ląstelių skaičiaus ir atmetimo reakcijos pasireiškimo ar jos sunkumo, statistiškai patikimos priklausomybės nėra, galimai dėl skirtingų tirtųjų asmenų amžiaus, lyties bei imunosupresijos lygio.

Literatūros sąrašas

1. Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas „Šviesa“ 2001; p. 169-178, 312-320.
2. Aguilar P., Mathieu P.C, Clerc G., Ethevenot G., Fajraoui M., Mattei S. Modulation of Natural Killer (NK) Receptors on NK (CD3-/CD56+), T (CD3+/CD56-) and NKT- like (CD3+/CD56+) Cells after Heart Transplantation. *Transplantation immunology* 2006; 25(2): 200-205.
3. Akdis M., Burgers S., Cramer R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E. etc. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; 127(3): 701-721.
4. Arase H., Arase N., Saito T. Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *Journal of experimental medicine* 1996; 183(5): 2391-2391.
5. Au-Yeung B.B., Fowell J.D. A. Key Role for Itk in Both IFN γ and IL-4 Production by NKT Cells. *The Journal of Immunology* 2007; 179: 111-119.
6. Beziat V., Duffy D., Quoc N.S., Garff-Tavernier L.M, Decocq J., Combadiere B. CD56bright CD16+ NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 2011; 186.
7. Brukienė E., Bakštytė G., Pečkauskas A., Macas A. Ūminis širdies nepakankamumas (literatūros apžvalga). *Medicinos teorija ir praktika*. 2013 - T. 19 (Nr. 3), 279–284 p.
8. Caligiuri A.M. Human natural killer cells. *Blood Journal* 2008; 112(3) 461-469.
9. Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S., Beavis A., Koezuka Y. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT cells Rapidly Activate NK Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 163: 4647-4650.
10. Chinen J., Buckley R.H. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 2010; 125(2): 324-335.
11. Cianferoni A. Invariant Natural Killer T Cells. *Antibodies* 2014; 3: 16-36.

12. Gapin L., Godfrey I.D., Rossjohn J. Natural Killer T cells obsession with self-antigens. *Curr Opin Immunology* 2013; 25(2): 168-173.
13. Godfrey I.D., Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 114(10): 1379-1388.
14. Hayhoe R.P., Henson S.M., Akbar A.N., Palmer D.B. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset. *Human Immunology* 2010; 71(7): 676.
15. Häyry P., Isoniemi H., Yilmaz S., Mennander A., Lemström K., Räisänen-Sokolowski A. etc. *Chronic Allograft Rejection* 1993; 134(1): 33-81.
16. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition.
17. Yu G., Xu X., Vu D.M., Kilpatrick D.E., Li C.X. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2006; 203(8): 1851-1858.
18. Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Nishimura S., Ohta A., Ohmi Y. The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand α -Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-2 Production by Dendritic Cells and IL-12 Receptor Expression on NKT Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1999;189(7): 1121-1127.
19. Lang L. M. How do natural killer T cells help B cells? *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(8): 1109-1121.
20. LaRosa F.D., Rahman H.A., Turka A.L. The Innate Immune System in Allograft Rejection and Tolerance. *Journal Immunology* 2007; 178(12): 7503-7509.
21. Liao C., Zimmer M.I., Wang C. The Functions of Type I and Type II Natural Killer T (NKT) Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(6): 1330-1338.
22. Malickaitė R., Jurgauskienė L., Simanavičienė S., Maneikienė V.V., Sudikienė R., Ručinskas K. Imuninė stebėšana širdies transplantacijoje: atmetimo reakcijos poveikis T limfocitų žymenų ekspresijai. *Lietuvos chirurgija*. 2010, 8(3), p. 120-126.
23. Maneikienė V.V., Čelurkienė J. ir kt. Pacientų atranka širdies transplantacijai: šiuolaikiniai kriterijai. *Lietuvos chirurgija*. 2007, 5(3), p. 207–211.

24. Panda A., Arjona A., Sapey E., Bai F., Fikrig E., Montgomery R.R. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunology* 2009; 30(7): 325.
25. Pandales F.R., Bolanos N., Mercado M., Gonzales J.M., Cuellar A., Reference values of the natural killer cells (NK and NKT) on blood donors in Bogota. *Acta Medica Colombiana* 2007; 32(3).
26. Pascal V., Schleinitz N., Brunet C., Ravet S., Bonnet E., Lafarge X., Mhammed Touinssi M., Reviron D., ect. Comparative analysis of NK cell subset distribution in normal and lymphoproliferative disease of granular lymphocyte conditions. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 2390-2940.
27. Pittet J.M., Speiser E.D., Valmori D., Cerottini J., Romero P. Cutting Edge: Cytolytic Effector Function in Human Circulating CD8+ T Cells Closely Correlates with CD56 Surface Expression. *The Journal of Immunology* 2000;164: 1148-1152.
28. Poli A., Michel T., Theresine M., Andres E., Hentges F., Zimmer J. CD56 natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-465.
29. Pratschke J., Stauch D., Kotsch K. Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *ESOT* 2009; 22: 859-868.
30. Salio M., Cerundolo V. Linking Inflammation to Natural Killer T Cell Activation. *PLOS Biology* 2009; 7(10): 1-5.
31. Seino K., Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *The Journal of Experimental Medicine* 2005; 202(12): 1623-1626.
32. Selno K., Fukao K., Muramoto K., Yanagisawa K., Takada Y., Kakuta S. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98(5): 2577-2581.
33. Stewart S., Winters G.L., Fishbein M.C., Tazelaar H.D., Kobashigawa J., Abrams J. etc. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2005; 24(11): 1710-1720.
34. Sveikatos statistika. Traumų ir nelaimingų atsitikimų stebėsenos sistemos duomenys. Prieiga internete: http://stat.hi.lt/default.aspx?report_id=169

35. Taylor D., Meiser B., Weber S. The international society of heart and lung transplantation guidelines for the care of heart transplant recipients. *ISHLT Guidelines for the Care of Heart Transplant Recipients* 2010; 8.
36. Tan J., Xiao W., Wang L., He Y. Type I natural killer T cells: naturally born for fighting. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010; 31: 1123-1132.
37. Togashi Y., Chamorro K., Wakita D., Tsutsumi N., Iwakura Y., Matsubara N., etc. Natural killer T cells from interleukin-4-deficient mice are defective in early interferon- γ production response to α -galactosylceramide. *Cancer Sci* 2007; 98(5): 721-725.
38. Touw W., Bromberg S.J. Natural Killer Cells and the Immune Response in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2010; 10: 1354-1358.
39. Tsuruyama T., Fujimoto Y., Yonekawa Y., Miyao M., Onodera H., Uemoto S. Invariant natural killer T cells infiltrate intestinalis allografts undergoing acute cellular rejection. *European Society for Organ Transplantation* 2012; 25: 537-544.
40. Vahl J.C., Heger K., Kneis N., Hein Y.M., Boon L., Yagita H. NKT Cell-TCR Expression Activates Conventional T Cells in Vivo, but Is Largely Dispensable for Mature NKT Cell Biology. *PLOS Biology* 2013; 11(6): 1-16.
41. Walsh T.P., Strom B.T., Turki A.L. Routes to Transplant Tolerance versus Rejection: The Role of Cytokines 2004; 20(2): 121-131.
42. Weiskopf D., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transplantation Int.* 2009;22(11):1041.
43. Wu L., Kamer Van L. Natural Killer T cells in health and disease. *Front Biosci* 2011; 3: 236-251.

Santrauka

Šio tyrimo tikslas – įvertinti NK ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus pokyčius ligoniams po širdies transplantacijos. Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie uždaviniai: tėkmės citometrijos metodu nustatyti NK ($CD3^+CD16^+/CD56^+$) ir NKT ($CD3^+CD16^+/56^+$) ląstelių skaičių ligonių po širdies transplantacijos periferiniame kraujyje ir palyginti jų skaičiaus pokyčius su biopsijos tyrimo metu nustatyto atmetimo laipsniu, bei įvertinti šių rodiklių informatyvumą perspėjant transplantuoto organo atmetimą.

Iškelto tikslo ir uždavinių įgyvendinimui ištirti 59 pacientai po širdies persodinimo operacijos, kuriems atlikta 150 tyrimų ir, kurie buvo suskirstyti į 4 grupes pagal biopsijos tyrimo rezultata.

Keturiose pacientų grupėse, su skirtingo sudėtingumo atmetimo reakcijomis (su lengva (1gr.), vidutine (2gr.), sunkia (3gr.), bei pacientų grupėje, kurioje atmetimo reakcija nepasireiškė (0 gr.)), rastas NK ląstelių skaičius, kurio vidurkiai svyravo nuo 10,15% iki 12,82%, NKT ląstelių - nuo 6,50% iki 9,05%.

Nustatytas statistiškai nereikšmingas NK ląstelių procentinio skaičiaus vidurkių kitimas: nesant atmetimo – NK ląstelių skaičius buvo didžiausias (12,82%), esant lengvam ir vidutiniam atmetimui, jis nežymiai mažėjo (11,44% ir 10,15%), sunkaus atmetimo atveju NK ląstelių skaičius vėl nereikšmingai padidėjo (12,70%). Laikyti NK ląstelių skaičiaus kitimo reikšmingu rodikliu atmetimo reakcijos sunkumui identifikuoti nėra objektyvu dėl itin didelio duomenų pasiskirstymo (standartinis nuokrypis siekė net 13,73).

NKT ląstelių procentinis skaičius, priešingai nei NK ląstelių, mažiausias buvo nesant atmetimo (6,50%), esant lengvam ir vidutiniam sunkumui nereikšmingai didėjo (8,70% ir 9,05%), o sunkaus atmetimo metu vėl sumažėjo (7,07%). Šio tiriamojo mokslinio darbo metu tirtas periferinis kraujas, bet, remiantis literatūriniais duomenimis, žinoma, jog NK ir NKT ląstelių skaičius gali kisti ne tik priklausomai nuo lyties, amžiaus ar kitų kriterijų, bet ir dėl individualių organizmo savybių. Be to, NKT ląstelės geba infiltruotis į alotransplantato audinius, todėl galima daryti prielaidą, kad infiltravęsi jos dalyvauja atmetimo reakcijos vystyme. Dėl šios priežasties būtų tikslinga tirti ne tik periferinį kraują, bet ir biopsijos medžiagą imuninių ląstelių kokybiniu ir kiekybiniu aspektais – tai galimai padėtų konkrečiau apibrėžti NK ir NKT ląstelių svarbą imuninio atsako procesuose.

Vienfaktorinės dispersinės analizės metodu, įvertinus tyrimų rezultatus, išsiaiškinta, jog NK ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus vidurkiai statistinio reikšmingumo rodiklio ($p = 0,05$) nepasiekė. Tai leidžia daryti išvadą, kad tarp NK ir NKT ląstelių procentinio skaičiaus ir atmetimo reakcijos pasireiškimo ar jos sunkumo statistiškai patikimos priklausomybės nepastebėta.

Summary

The main aim of this research is to evaluate the percentage change of Natural Killer (NK) and Natural Killer T (NKT) cells after heart transplantation. To reach this goal four objectives were raised:

- To apply flow cytometry method in order to determine the number of NK (CD3⁻CD16⁺/CD56⁺) cells in peripheral blood after the heart transplantation;
- To apply flow cytometry method in order to determine the number of NKT (CD3⁺CD16⁺/56⁺) cells in peripheral blood after the heart transplantation;
- To compare its change with biopsy results applying the method of elimination;
- To evaluate how informative these indicators are when warning patients of the rejection of transplant organ.

In order to fulfill the aim and objectives 59 patients who had had heart transplantation have been examined. 150 tests have been done to selected patients, after that they have been classified into 4 groups according to biopsy results.

It was identified that in those 4 groups of patients with different levels of transplant rejection: 1 group – slight rejection; 2 group – medium rejection; 3 group – high rejection; 0 group – no effect, the number of NK cells ranged from 10,15% to 12,82%, NKT cells from 6,50% to 9,05%.

Insignificant static variation of NK cells was estimated: 0 group with no rejection had the highest number of NK cells (12,82%), groups 1 and 2 with slight and medium rejection had fractionally decreasing number of NK (11,44% and 10,15%), finally group 3 with the highest level of rejection had increase in the number of NK (12,70%). Because of a high breakdown (standard deflection reached 13,73) it would be incorrect to assume that the change of the number of NK cells is a valuable indicator in order to identify the success of transplantation.

The number of NKT cells, on the contrary, was the lowest in group 0 with no rejection (6,50%), in groups 1 and 2 with slight and medium rejection it increased insignificantly (8,70% and

9,05%), and finally in group 3 with the highest rejection it decreased (7,07%). It is a must to note that peripheral blood have been used during this scientific research, however according to literature it is known that the number of NK and NKT cells depends not only on the gender, age or other significant factors, but also it may vary due to individual features of the organism. Moreover, NKT cell are able to infiltrate into allograft tissue, that is why we can assume that when infiltrated these cells directly participate in rejection reaction. For this reason, it would be appropriate to examine the qualitative and quantitative aspects of biopsy's substance immune cells as well. It might help to more accurately determine the importance of NK and NKT cells in the process of immune response.

After evaluation of the results (applying one-way ANOVA method) it was found out that: the average level of NK and NKT cells had not reached the statistical indicator ($p = 0.05$). Therefore the conclusion must be drawn that there is no statically reliable dependency between NK and NKT cells and the success of transplantation.