INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

IM. M. MOSSAKOWSKIEGO

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Zespół Kliniczno-Badawczy Epigenetyki Człowieka

Zespół Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej

**mgr Marta Cąkała-Jakimowicz**

**ODPOWIEDŹ KOMÓREK**

**REGIONALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH SZCZURA**

**NA PIERWOTNE I WTÓRNE ZAKAŻENIE SKÓRY**

***STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

 Promotor:

**Prof. dr hab. n. med. Waldemar Lech Olszewski**

Warszawa 2016

**STRESZCZENIE**

 **WSTĘP:** Skóra kończyn dolnych człowieka znajduje się w ciągłym kontakcie z otaczającą materią, bogatą w mikroorganizmy oraz substancje chemiczne. Jest ona pokryta włącznie z gruczołami łojowymi, potowymi oraz mieszkami włosowymi saprofityczną florą bakteryjną. Florę tę tworzy wiele szczepów, jednak najczęstszymi są bakterie należące do ziarenkowców, a wśród nich *Staphylococcus epidermidis*. Drobnoustroje te nie są patogenne dopóki zasiedlają swoją niszę fizjologiczną. Urazy otwarte, częste infekcje skóry i tkanki podskórnej oraz wynikające z nich przewlekłe zapalenie są przyczyną zmian w początkowych naczyniach limfatycznych oraz pniach limfatycznych zbierających limfę. W zaawansowanym stadium ma miejsce zwłóknienie naczyń limfatycznych i węzłów chłonnych prowadzące do zastoju limfy i obrzęku limfatycznego. Brak drenażu chłonnego powoduje, że bakterie normalnie zasiedlające powierzchnię skóry, jej gruczoły i mieszki włosowe oraz te, które przeniknęły do tkanek głębokich stają się patogenne, prawdopodobnie wskutek zmiany środowiska chemicznego. Nie mogą one być odtransportowane i namnażają się w tkance. Na nagromadzone w tkankach bakterie odpowiadają regionalne węzły chłonne rekrutacją monocytów i limfocytów z krwi oraz fagocytozą. W węzłach powstają także komórki pamięci immunologicznej, co jest częścią normalnej odpowiedzi na obce antygeny. Nie została dotychczas poznana reakcja węzłów chłonnych na szczepy bakteryjne „fizjologicznie” zasiedlające skórę człowieka, a w szczególności kończyn dolnych. Nie wydaje się, aby ewolucyjnie wytworzyła się tolerancja, gdyż klinicznie obserwuje się długotrwałe zapalenia skóry własnymi gronkowcami. Nie wiadomo dokładnie, jakie fenotypy komórkowe są rekrutowane z krwi i dojrzewają w węzłach, a także czy i jak długa może być wytworzona pamięć immunologiczna na antygeny danych szczepów, pozwalająca na przynajmniej krótkotrwałą odporność.

 **CEL PRACY:** Celem pracy było zbadanie odpowiedzi komórek regionalnych węzłów chłonnych szczura na wybrany gatunek bakterii: *Staphylococcus epidermidis* zasiedlający skórę kończyn dolnych człowieka, a w szczególności: prześledzenie zmiany fenotypów komórek węzłów po pierwotnym i wtórnym zakażeniu, sprawdzenie czy w węzłach wytwarzane są klony komórek T i B pamięci oraz regulatorowe (supresorowe) limfocyty T.

**GRUPY EKSPERYMENTALNE:** Wyszczególniono następujące grupy badawcze: grupy z zakażeniem pierwotnym oraz wczesną (1 dzień po ostatnim podaniu zawiesiny bakterii) i późną (21 dni po ostatnim podaniu zawiesiny bakterii) izolacją materiału, grupa z zakażeniem wtórnym.

**MATERIAŁY I METODY:** Zawiesinę bakterii *S. epidermidis* lub roztwór soli fizjologicznej podawano szczurom podnaskórkowo w grzbiet kończyny tylnej. Wyizolowane podkolanowe węzły chłonne ważono, przeliczano ilość komórek na gram tkanki węzła, a następnie oceniano zmiany odsetka subpopulacji komórkowych w węzłach metodą cytometrii przepływowej oraz w programie Microimage na skrawkach wybarwionych immunohistochemicznie.

Fenotypy komórek podkolanowych węzłów chłonnych oznaczano przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko: limfocytom T, monocytom i granulocytom (W3/13+), pomocniczym limfocytom T i makrofagom (W3/25+), cytotoksycznym limfocytom T (OX8+), limfocytom B (B+, OX12+, OX33+), komórkom dendrytycznym (OX62+), makrofagom (ED1+), granulocytom (HiS48+), komórkom wykazującym obecność białka ICAM-1 (CD54+), PECAM-1 (CD31+), MHC klasy II (OX6+), komórkom szpikowym i tymocytom (OX7+), limfocytom T regulatorowym (CD4+CD25+), limfocytom B pamięci (CD19+CD27+), limfocytom T pamięci pomocniczym (CD4+CD45RC-CD62L+/-) oraz limfocytom T pamięci cytotoksycznym (CD8+CD45RC-CD62L+/-).

**WYNIKI:** Po pierwotnym zakażeniu skóry *Staphylococcus epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału zaobserwowano istotne zwiększenie **liczby komórek** w podkolanowych węzłach chłonnych oraz **masy węzłów** w porównaniu do kontroli**.** Po zakażeniu wtórnym skóry liczba komórek w węzłach pozostawała na poziomie podobnym do tych po zakażeniu pierwotnym. Masa węzłów natomiast była statystycznie niższa od tej po zakażeniu pierwotnym w grupie z wczesną izolacją materiału.

 **W** **ocenie cytometrycznej,** po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek wyrażających następujące białka: OX8, ED1, CD54. Zmniejszył się natomiast odsetek komórek W3/25+ w porównaniu do kontroli. W okresie 3 tygodni od zakażenia pierwotnego zwiększył się istotnie udział komórek (CD4+CD45RC-) oraz komórek (CD8+CD45RC-CD62L-). Po zakażeniu wtórnym skóry wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek: W3/13+, OX8+, ED1+, (CD19+CD27+), (CD4+ CD45RC- CD62L-), (CD8+CD45RC-). Zmniejszył się natomiast odsetek populacji limfocytów B, komórek OX7+, OX62+, OX6+, CD54+, (W3/13+OX6+) oraz (W3/25+OX6+). Nie zaobserwowano ilościowych zmian subpopulacji komórek (CD4+CD25+) po zakażeniu pierwotnym i wtórnym skóry *S. epidermidis*.

**W ocenie morfometrycznej w programie Microimage,** po zakażeniu pierwotnym skóry w grupie z wczesną izolacją materiału, w strefie brzeżnej węzłów wykazano istotne zwiększenie odsetka komórek: W3/13+, W3/25+, OX8+, B+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ oraz CD54+ w porównaniu do kontroli. Wykazano ponadto zmniejszenie udziału procentowego komórek CD31+. W grudkach zaobserwowano zwiększenie udziału procentowego komórek wyrażających białka: W3/13, W3/25, ED1, CD31, OX7, HiS48, OX6 i CD54. W strefie przykorowej węzłów wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek: W3/13+, W3/25+, OX8+, B+, OX62+, ED1+, OX7+, HiS48+ , OX6+ oraz CD54+. W strefie rdzennej węzłów po zakażeniu pierwotnym zaobserwowano istotne zwiększenie udziału procentowego komórek: W3/13+, W3/25+, OX8+, ED1+, OX7+, HiS48+, OX6+ oraz CD54+.

 W grupie po zakażeniu wtórnym skóry w strefie brzeżnej węzłów wykazano zwiększenie udziału procentowego komórek CD54+ w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym. Zmniejszył się natomiast odsetek komórek wyrażających białka: OX62, ED1, CD31 oraz HiS48 w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału. W grudkach chłonnych wykazano znamienne zwiększenie udziału procentowego komórek CD54+ w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym oraz zmniejszenie odsetka komórek CD31+ w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału. W strefie przykorowej węzłów zaobserwowano zmniejszenie udziału procentowego komórek OX62+ w porównaniu do grup po zakażeniu pierwotnym oraz komórek W3/25+, CD31+ i OX7+ w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału. W strefie rdzennej wykazano zmniejszenie odsetka komórek W3/25+, OX62+ i OX7+ oraz zwiększenie udziału procentowego komórek OX8+ w porównaniu do grupy po zakażeniu pierwotnym z wczesną izolacją materiału.

**PODSUMOWANIE I WNIOSKI:** Pierwotne zakażenie skóry *S. epidermidis* w grupie z wczesną izolacją materiału spowodowało zwiększenie liczby komórek, ale nieistotną ilościową zmianę proporcji poszczególnych populacji. Mogłoby to świadczyć, iż organizacja komórkowa węzła jest przygotowana ewolucyjnie na przyjęcie antygenu bakteryjnego ze skóry, a odpowiedź polega głównie na zwiększonej rekrutacji z krwi fenotypów obecnych w węźle już przed zakażeniem.

Wtórne zakażenie skóry *S. epidermidis* nie spowodowało zwiększenia masy i liczby komórek węzłów ponad wartości obserwowane po zakażeniu pierwotnym. Charakteryzowało się natomiast obniżeniem odsetka poszczególnych populacji biorących udział w pierwotnym rozpoznaniu bakterii *S. epidermidis*. Nie wykazano zwiększenia liczebności limfocytów T regulatorowych. Natomiast zaobserwowano istotne zwiększenie udziału procentowego populacji komórek B i T pamięci immunologicznej. Można przypuszczać, iż komórki te uruchamiały szybką odpowiedź humoralną w postaci produkcji przeciwciał specyficznych dla antygenu bakteryjnego poznanego w czasie pierwotnego zakażenia.