

Studium imunitních mechanismů souvisejících s ortotopickou transplantací rohovky není možné bez malých zvířecích modelů. Nejenom, že jsou si imunitní mechanismy u myši, potkanů a lidí do určité míry podobné, ale je zde částečně umožněno i jejich přímé pozorování. Cílem této práce bylo studovat model ortotopické transplantace rohovky: zavést model alotransplantace u myši (BALB/c → C57BL/6) a potkana (Wistar Furth → Lewis) a konkordantní xenotransplantační model (z potkana na myš, Lewis → BALB/c and Sprague Dawley → BALB/c). Dále pak bylo cílem zavedení hodnotících kritérií pro sledování klinického průběhu po transplantaci.

Na začátku byl sledován vliv techniky zakončení stehů na přežívání xenotransplantátů a efektivitu vybraných imunosupresivních látek: cyklosporinu A, monoklonální protilátky proti T lymfocytům (anti-Thy-1.2) a AMT (specifický inhibitor inducibilní synthasy oxidu dusnatého (2-amino-5,6-dihydro-6-metyl-4-H-1,3-thiazin)). Naše výsledky demonstrují, že způsob, jakým jsou stehy zakončeny, významně ovlivňuje výsledek transplantace a dále, že má vliv na účinnost jednotlivých imunosupresiv, a proto je třeba tuto skutečnost brát v potaz při hodnocení jejich efektivity.

FTY720 je nová imunosupresivní látka s naprosto novým mechanismem působení. Modifikuje mimo jiné migraci T lymfocytů, jejich sekvestraci v lymfatických uzlinách a tymu. Naše výsledky ukazují, že léčba pomocí FTY720 i v monoterapii, výrazně oddaluje a tlumí v závislosti na dávce zánětlivou odpověď po konkordantní xenotransplantaci rohovky a zabraňuje nekrose okraje transplantátu a jeho odlučování, což pravděpodobně umožní jeho pozdější infiltraci. Současně jsme zjistili, že léčba pomocí FTY720 výrazně redukuje expanzi T a B lymfocytů a expresi aktivačních markerů B lymfocytů (molekul hlavního histokompatibilního komplexu II (MHC II) a CD86) v drénujících lymfatických uzlinách (DLN) s následným snížením infiltrace xenotransplantátu zánětlivými buňkami. Ukazujeme, že FTY720 i v monoterapii silně potlačuje imunitní odpověď po xenotransplantaci rohovky, a že je tak možné, alespoň v experimentální léčbě, dosáhnout dlouhodobějšího přijetí rohovkového xenotransplantátu.

Dále ukazujeme, že FTY720 efektivně brání rejekci rohovkového alotransplantátu a má potenciál zabránit rejekci i při oddáleném podání. Tlumí časnou infiltraci rohovky CD11c+ buňkami, zabraňuje expanzi T a B buněk v DLN a následně interferuje s pozdní infiltrací zánětlivých buněk do transplantátu. FTY720 též selektivně snižuje počet buněk v DLN transplantovaných myši 20. den po transplantaci, což naznačuje, že aloantigenem aktivované dělicí se buňky jsou preferenčně ovlivněny FTY720.

Naše výsledky dokládají, že snížení exprese MHC II na B buňkách lymfatických uzlin vlivem FTY720 je možno prokázat v podmínkách *in vivo* i *in vitro*. Nicméně, tento jev je možno pozorovat pouze u B buněk lymfatických uzlin a nikoliv u CD11c+ buněk, či B buněk sleziny. Ačkoliv FTY720 snižuje expresi MHC II na B buňkách lymfatických uzlin, stimulace lipopolysacharidem jejich expresi částečně obnoví, což ukazuje, že jiné molekulární cesty účastníci se regulace exprese MHC II mohou

částečně fungovat i v přítomnosti FTY720. Souhrnem lze říci, že FTY720 snižuje expresi MHC II molekul na povrchu B220+ buněk v lymfatických uzlinách, což může představovat další mechanismus imunosupresivního působení FTY720.

Rejekce transplantátu rohovky je zprostředkována především dárcovsky specifickými CD4+ T buňkami a T_H1 typ imunitní odpovědi zde převládá. Posun imunitní odpovědi příjemce směrem od T_H1 k T_H2 by mohl pozitivně ovlivnit přežívání transplantátů rohovky.

Transdukce s AdrIL-4 (samostatně či v kombinaci s vIL-10) viditelně utlumila reakci duhovkových cév v období krátce po transplantaci i během rejekce na rozdíl od kontrolních myší či myší s rohovkami transdukovanými Ad β -gal či AdvIL-10, což pravděpodobně odráží imunosupresivní působení IL-4 na zánětlivou reakci v přední komoře oka. *Ex vivo* transdukce rohovky s AdrIL-4 neoddláí rejekci alotransplantátu rohovky. Navíc je v závislosti na dávce spojena se zvýšenou opacitou rohovky, pravděpodobně v důsledku infiltrace eosinofilů pod vlivem eotaxinu produkovaného IL-4 ovlivněnými fibroblasty rohovky. Kombinovaná léčba s IL-4 a vIL-10 je doprovázena výraznější opacitou rohovky a zvýšenou aktivitou neovaskularizace a kombinace IL-4 s nízkým titrem vIL-10 zkracuje přežívání transplantátů. Závěrem naší studie je, že posun lokální imunitní odpovědi směrem k typu T_H2 není dostatečně účinný k oddálení rejekce transplantátu rohovky a změny, které jsou v této souvislosti pozorovány, je třeba dále studovat.

Použití malých zvířecích modelů pro studium transplantačních imunitních mechanismů výrazně rozšiřuje naše možnosti porozumět imunitním mechanismům (a to nejen těm souvisejícím s transplantací). Také nám pomáhá v posuzování účinnosti imunomodulačních látek či postupů a v rozpoznávání mechanismů jejich působení. Tato disertační práce ukazuje rozmanitost možností, jež tyto aplikace umožňují.