

AVIAN ÉS HUMÁN NATURAL KILLER RENDSZEREK
ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Doktori értekezés

Seprényi György

Szeged

1989



B 5150



E 3.497

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
1. A természetes citotoxicitás effektor sejtjei	2
2. Az NK aktivitás	2
3. Az NK aktivitásért felelős sejtek	3
4. Az LGL sejtek felületi jellemzése	6
5. Szöveti előfordulás és az NK sejtek eredete	7
6. Humán granulociták természetes citototoxikus aktivitása	8
7. Az NK reakció mechanizmusa	10
8. A szárnyasok természetes citotoxicitása	12
9. Az NK reakció modulációja	13
10. Az interferonok hatása az NK aktivitásra	15
11. Az NK sejtek in vivo szerepe	16
III. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK	18
IV. ANYAGOK	20
V. MÓDSZEREK	21
1. Effektor sejtek	21
1.1. Csirke fehérvérsejtek izolálása	21
1.2. Pulyka fehérvérsejtek	21
1.3. Granulocita szeparálás	21
1.4. LGL szeparálása	22
1.5. Humán fehérvérsejtek	22
2. Target sejtek	23
2.1. NK reakciók target sejtjei	23
2.2. A csirke ADCC target sejtje	24
3. Citotoxicitási tesztek	24
3.1. Target sejtek jelölése	24
3.2. A citotoxicitási reakciók mérése	26
4. A leukocita előkezeléseknél felhasznált készítmények	26
4.1. Csirke interferonok	26
4.2. Humán interferonok	27
4.3. Vírusok	27
4.4. Monoklonális ellenanyagok	28

5.	Az effektor ill. a target sejtek előkezelése	28
5.1.	Csirke effektor sejtek kezelése monoklonális ellenanyagokkal	28
5.2.	A csirke fehérvérsejtek kezelése tripszinnel	29
5.3.	Az effektor sejtek fertőzése in vitro humán adenovíruszal	30
5.4.	Az effektor sejtek előkezelése interferonnal	30
5.5.	A target sejtek előkezelése interferonnal	31
6.	A kísérleti állatok és azok oltása	32
6.1.	Csirkék	32
6.2.	Pulykák	32
7.	Festési eljárások	32
8.	A sejtek kemilumineszcenciájának (CL) mérése	32
9.	Eredmények matematikai értékelése	33
VI.	EREDMÉNYEK	34
1.	A csirke natural killer rendszer effektor sejtjeinek azonosítása	34
2.	A csirke granulociták szerepe az ADCC reakcióban	36
3.	Tripszin kezelés hatása a csirke granulociták ADCC és NK aktivitására	37
4.	Humán adenovírusok hatása a csirke NK aktivitásra	38
5.	Az adenovírusok hatása a kvalitatív vérképre	39
6.	Az adenovírusok által kiváltott interferon indukció és a citotoxicitás stimulációjának összefüggése	40
7.	Pulykák natural killer aktivitásának vizsgálata	41
8.	Adenovírus fertőzés hatása a humán limfociták citotoxicitására	42
9.	Az interferonok hatása a csirke NK aktivitásra	43
10.	A csirke interferonok hatása az NK aktivitásra az effektor sejtek kezelése esetén	43
11.	Az interferonok hatása az NK aktivitásra a csirke target sejt előkezelése esetén	44
12.	Az interferonok in vitro hatása a humán NK aktivitásra	44

13. A humán és a csirke granulocita funkciók összehasonlítása	46
14. Humán granulociták NK aktivitásának vizsgálata	46
15. Humán és csirke granulociták chemilumineszcenciájának összehasonlítása	47
16. A SOD, a kataláz és a PMA hatása a csirke granulociták CL aktivitására	48
VII. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	50
1. A csirke perifériás granulociták citotoxicitása	50
2. Humán adenovírusok hatása a csirke natural killer aktivitásra	52
3. Az interferonok szerepe a citotoxicitás fokozásában	54
4. Az adenovírus hatása a humán limfociták NK aktivitására	55
5. Az interferonok hatása az NK aktivitásra csirkékben	55
6. A humán és szárnyas NK aktivitás összehasonlítása	56
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	60
IX. IRODALOM	63
X. KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK JEGYZÉKE	
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ad	adenovírus
ADCC	antitest függő celluláris citotoxicitás (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
Bvvt	birkavörösvértest
'C	komplement
CL	kemilumineszcencia
Con A	concanavalin A
cpm	count per minute
E:T	effektor:target arány
FCS	főttális borjúsavó
HuIFN	humán interferon
IFN	interferon
IL-2	interleukin-2
i.v.	intravénás
LAK	limfokin-aktivált killer
LGL	large granular lymphocyte
NC	natural citotoxic
NE	nemzetközi egység
NK	natural killer
NKCF	natural killer citotoxikus faktor
PMA	forbol-mirisztát-acetát
PMN	polimorfonukleáris sejtek
PBS	phosphate buffered saline
SOD	szuperoxid-dizmutáz
TNF	tumor nekrosis faktor
TCID ₅₀	szövetkultúra fertőző dózis 50% (tissue infective dose 50%)
vvt	vörösvértest

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A természetes citotoxicitás effektor sejtjei

A természetes, sejtközvetített citotoxicitás megfogalmazás számos effektor sejtet foglal magába. Ide tartoznak az ún. nagy granulumú limfociták (LGL), a polimorf-nukleáris sejtek (PMN), és a monóciták/makrofágok. Ezek a sejtek különböző típusú természetes citotoxikus reakciókat közvetítenek: Az ún. natural killer (NK) (Kiessling 1975), antitest-függő celluláris citotoxicitás (ADCC), limfokin-aktivált killer (LAK) (Grimm és mtsai 1982) és a natural cytotoxic (NC) (Patek és mtsai 1988) aktivitást. A legrészletesebben ezek közül a natural killer (NK) sejtek biológiai aktivitását tanulmányozták.

2. Az NK aktivitás

Több mint 10 év telt el, amióta az egészséges humán egyedek perifériás limfocitáinak háttércitotoxicitását folyamatosan fenntartott tumoros sejtvonalakkal szemben azonosították, és a spontán citotoxicitást mutató sejtcsoportot natural killer sejteknek (NK) nevezték el (Rosenberg és mtsai 1974; Herberman és mtsai 1973, 1975; Takasugi és mtsai 1973). Az elnevezés alapját az a megfigyelés képezi, miszerint olyan sejpopulációról van szó, amely spontán módon, minden előző immunizálás nélkül

képes bizonyos célsejteket elpusztítani. Az NK reakció kvantitatívan mérhetővé és standardizálhatóvá akkor vált, amikor a világszerte elterjedt daganatos sejtvonalakat target sejtként kezdték használni. Ilyen pl. a leggyakrabban használt, a citotoxikus reakciókban igen érzékenynek bizonyuló K562 jelű erythroleukémiás sejtvonal (Lozzio és mtsai 1975), amelyet krónikus mieloid leukémiás betegből izoláltak. A reakció mérése általában a target sejt lízisének kimutatásán alapul. A leggyakrabban használt technikában a célsejt lízisének detektálására, az un. ^{51}Cr -release módszert (Brunner és mtsai 1968) alkalmazzák, amelyet kidolgozása óta már tovább fejlesztették mikromódszerré. A teszt folyamán különböző számú NK effektor sejtpreparátumot kevernek össze, állandó számú, előzőleg ^{51}Cr (nátrium-kromát) izotóppal jelölt target sejttel, így különböző effektor:target arány érhető el. 3-4 óra együttes inkubáció után a célsejtekből a felülúszóba kiszabaduló izotóp mennyiségéből (természetesen figyelembe véve a spontán izotóp kieresztést) következtethetünk a citotoxicitás mértékére.

3. Az NK aktivitásért felelős sejtek

Azt a kérdést, hogy mi is az a NK sejt nehéz egyetlen mondatban megválaszolni. Egy eredeti definíció szerint: Egészséges egyedekben található olyan limfocita szubpopuláció, amely képes minden előzőleges immunizálás nélkül, elpusztítani daganatos sejtvonalakat. Ez a definíció



azonban nem határolja el közvetlenül ezeket az effektor sejteket a természetes sejtközvetített citotoxicitás többi effektor sejtjétől. Sokáig a "0" limfocita elnevezést viselte. A szeparálási technikák fejlődésével mint pl. a Percoll gradiensen való szeparálás (Timonen és Saksela 1980; Timonen és mtsai 1981), majd később a monoklonális ellenanyagok felhasználása, lehetővé tették ennek a sejtcsoportnak a nagy fokú izolálását, s így a részletes morfológiai jellemzését is. A monoklonális ellenanyagok felhasználásával nagy tisztaságú NK sejtpopuláció izolálása vált lehetővé.

Morfológiájukra jellemző: Az NK aktivitással rendelkező sejteknek kb. 80%-a az ún. nagy granulumú limfociták (LGL) közé tartozik, jellegzetes azurofil granulumokkal a citoplazmában.

-12-20 μm nagysággal a középmeretű limfociták populációját alkotják.

-magas citoplazma/mag arány.

-az esetek jó részében jellegzetes bab vagy vese alakú mag.

Az ember perifériás limfocitáinak 2-6 %-át alkotják. Az NK sejtek nem adherensek, nem fagocitálnak és megtalálhatók a legtöbb emlős és madár faj egyedeiben.

Majdnem az összes NK sejt rendelkezik a felületén FcR receptorral és kb. 50%-uk a birka vörösvértestekkel (Bvvt) 4 °C-on alacsony affinitású rozettát alkot, de csak kis részük képez nagy affinitású rozettát 29 °C-on (Santoli és mtsai 1976; West és mtsai 1977). Az FcR receptorok se-

gítségével, amelyek az IgG Fc fragmentumát ismerik fel az NK sejtek kapcsolatba léphetnek az immunglobulin G közvetítésével a target sejtekkel, és így az ellenanyag-gal fedett célsejtek lízisét okozhatják (Kay és mtsai 1977; Perussia és mtsai 1979; Benczur és mtsai 1979). Korábban azt a limfocita alcsoportot, amely mediálja az ADCC-t, funkcionálisan killer (K) sejteknek definiálták. Ezek azonosak vagy nagyrészből átfedőek az NK sejt alcsoportjaival (Koren és mtsai 1978; Kay és mtsai 1977; Nelson és mtsai 1977).

Az LGL sejtek ultrastrukturális jellemzése:

a nukleusz kerek vagy bab alakú, a kromatin kondenzált, kiemelkedő (Grossi és Ferrarini 1982; Grossi és mtsai 1982). A citoplazma bőséges és különféle sejtorganelleumokat tartalmaz. Ezek közé tartozik a kiterjedt Golgi-apparátus és a nagy mennyiségű szétszórtan elhelyezkedő uncoated vezikulumok. Az un. PTA (paralell tubular arrays), amely csőszerű kötegekből áll, csak szórványosan fordul elő az LGL sejtjeiben. Valószínű, hogy a coated-vezikulumok felelnek meg a fénymikroszkóppal megfigyelhető granulumoknak (Grossi és mtsai 1982). Az LGL vezikulumai és granulumai hidrolázokat, mint pl. α -naftilacetát és β -butirátészterázt, savanyúfoszfátázt, β -glükoronidázt (Grossi és mtsai 1982) és szerin-észterázt (Young 1988) tartalmaznak. A granulumokban sohasem található, a granulocitákra és a monocitákra jellemző peroxidáz aktivitás (Ferrarini és mtsai 1980).

4. A LGL sejtek felületi jellemzése

Az előzőleg már említett Bvvt és Fc receptorokon kívül számos egyéb receptor található az NK aktivitásért felelős sejtek felszínén, amelyek utalhatnak ezen sejtek származására is. A legtöbb LGL sejt receptorral rendelkezik a C3b komplement komponenssel szemben (Perussia és mtsai 1983). Monoklonális ellenanyagok felhasználása, amelyek a humán NK sejtek felszínén elhelyezkedő markerekhez kötődnek, elősegítik a fenotipikus jellemzést és az alcsoportok elkülönítését. A humán NK sejtekről hiányoznak a B sejtekre jellemző felületi markerek, mint pl. a HLA-DR antigén (Ng és mtsai 1980). Az a monoklonális ellenanyag, amelyről kimutatták, hogy az NK sejtek FcR receptoraival reagál, a B73.1 jelű IgG1 alosztályba tartozó ellenanyag volt (Perussia és mtsai 1983). Az NK sejtek és a mielomonocita eredetű sejtek kapcsolatát az OKM1 és Mac1 mindkét sejtcsoporttal való reagálása, míg a T sejtvonallal való rokonságát az OKT8 30-50 %-ban bekövetkező kötődése bizonyítja (Perussia és Fanning 1983). Az OKT10 alacsony sűrűségben a legtöbb NK sejten (Ortaldo J.R. és mtsai 1981) előfordul. Bár a limfoid sejtek különböző alcsoportjai mutathatnak NK aktivitást, ezen sejtek nagy többsége az LGL sejtpopulációkhoz tartozik, amit elsősorban a Leu 11a (HNK-15), a Leu 7 (HNK-1) B73.1 monoklonális ellenanyagok segítségével azonosítanak (Abo és mtsai 1981; Lanier és mtsai 1983; Perussia és mtsai 1983).

5. A szöveti előfordulás és az NK sejtek eredete

Morfológiailag a normál donorok perifériás vérében az LGL sejtek a limfociták átlagosan kb. 3,6 %-át alkotják, de a B73.1 jelű monoklonális ellenanyag segítségével nagyobb százalékú előfordulást mutatnak. Az összes B73.1(+) sejt LGL morfológiával rendelkezik és felszínéről hiányoznak a B és T márkerek (Perussia & Starr és mtsai 1983). A férfi donorok magasabb NK aktivitást mutatnak mint a női egyedek (Santoli és mtsai 1976), és a B73.1(+) sejtek száma is magasabb, bár nem szignifikánsan. A lépben és a csontvelőben a monoklonális ellenanyagokkal detektálható NK és LGL sejtek száma alacsony, de kimutatható, és láthatóan hiányoznak a normál timuszból és nyirokcsomókból (Herberman és mtsai 1979).

Három hipotézis létezik az NK sejtek eredetére vonatkozóan:

1./ Mieloid eredetre utal a morfológia, néhány, a PMN-ekre és a monocitákra jellemző enzim jelenléte, és a CR3 és FcR2 jelenléte.

2./ A T sejt eredetre utal négy felületi antigén (T10; T8; HNK-1 és E-R) és az a tulajdonság is, hogy IL-2 jelenlétében proliferálnak.

3./ Végül, lehetséges, hogy az NK sejtek egy időig még nem definiált sejtvonalhoz tartoznak, amely felszínén más vonalak felületi márkerei is jelen vannak, különösen utalva a citotoxikus T sejtekre. (Trinchieri és mtsai 1984).

6. A humán granulociták természetes citotoxikus aktivitása

A polimorf magvú leukociták, irodalom szerinti elsődleges, klasszikus funkciója a szervezet antibakteriális védelme. Amíg a gyulladásos folyamatokban való részvételük hosszú idő óta apró részletekig ismert, addig a tumor ellenes védekezésben betöltött szerepükkel csak az utóbbi évtizedekben kezdtek foglalkozni. Lundgren és mtsai (1968) és Takasugi és mtsai (1975) polimorf magvú leukociták által okozott adherens sejtkultúrák károsodását írták le. Korec és mtsai ^3H -timidin felvételével többféle target sejtet használva, granulociták által kiváltott citosztázist írtak le (Korec és mtsai 1980). Ezek a szerzők arra is felfigyeltek, hogy ennek a reakciónak nem volt kapcsolata a peroxidáz termeléssel, amely viszont döntő szerepet játszik az antibakteriális védekezésben. Az általunk tanulmányozott irodalmak egyikében sem írtak le "NK"-szerű, 4 óra alatt spontán (előzőleges aktiváció nélkül) lezajló citotoxikus reakciót. Úgy tűnik, hogy a nyugvó sejtek csak citosztatikusak lehetnek (Korec 1980), de bizonyos aktiváló ágensek hatására citotoxikussá is válhatnak. Az aktiváció hatására mobilizálódik a peroxidáz rendszer, amely ezután részt vesz a tumor destrukcióban (Clark és Klebanoff 1975). A granulociták aktivációja *in vitro* leggyakrabban phorbol-észterekkel kezelve, vagy opszonizált zimoján partikulák fagocitózisa nyomán történhet. Lukács és mtsai (1985)

limfokinekkal való előkezelés nyomán hoztak létre granulocita aktivációt xenogén vörösvértestekkel szemben. Később ezt a limfokint a γ interferonnal azonosították (Steinbeck és mtsai 1986). A vizsgálatoknál bovin granulocitákat használtak. Más immunomoduláns anyagok és baktériumkivonatok ugyancsak citotoxikussá tehetik a nyugvó sejteket, szintén az ún. "oxidatív burst" aktiválásán keresztül (Morikawa és mtsai 1985). Cameron megfigyelése, amely spontán citotoxikus granulocitákról számol be (Cameron 1983; Cameron 1985), teljesen egyedülállónak mondható, bár ezt a hatást csak 24 órás ^3H -timidin inkorporációval végzett kísérlettel tudták detektálni.

A granulociták Fc receptorokkal is rendelkeznek, amelyek antigenitás szempontjából közelebb állnak az NK sejtek hasonló receptoraihoz mint a monociták Fc receptoraihoz (Perussia 1982). Így aktív szerepet játszanak az ADCC mediálásában. A target sejtekkel szemben termelt ellenanyag hidat képez a granulocita és a célsejt között, aktiválva egyben az effektor sejteket is.

Mindezek alapján, úgy tűnik, hogy az aktiváló ágensek hiánya esetén a granulociták nem mutatnak az NK sejtekhez hasonló 3-4 óra alatt spontán lezajló, ^{51}Cr -release teszttel mérhető reakciót.

7. Az NK reakció mechanizmusa

Az effektor-target sejtek kapcsolódását - amely nem esik MHC restrikció alá (Reynolds és mtsai 1987) - követően a bekövetkező sejttoxikus lépés a mai napig sem ismert pontos részletekig. Számos elmélet létezik, amelyek irodalma jelentősen kiterjedt. Ezen elméletek közül a legfontosabbnak jelenleg az tűnik, amely szerint az effektor sejt egy protein természetű anyagot bocsájt ki, az effektor-target kapcsolódást követően, amely azután a célsejt lízisét okozza (Marx 1986). Egyes szerzők azonosnak tekintik a citolizin (másnéven perforin) nevű protein természetű anyagot és a komplement rendszer C9 komponensét, mivel mindkettő hatására membránperforációk keletkeznek (Zalman és mtsai 1986; Young és mtsai 1988). Wright (1982) az un. NKCF (natural killer cytotoxic factor) kibocsájtását írja le, amely nem bizonyult azonosnak a fent említett protein szekréttummal (Goldfarb 1986). Más szerzők a citolízist okozó anyagot proteáz ill. foszfolipáz-A₂ aktivitású enzimmel azonosítják. Az bizonyos, hogy a citotoxikus anyagok kibocsátását az effektor és a target sejt specifikus kapcsolódása előzi meg (Goldfarb és mtsai 1982). Az ultramikroszkópos megfigyelés szerint az effektor sejtben a Golgi apparátus és a mikrotubuláris rendszer a target sejt felé orientálódik, kapcsolódásuk esetén. Így a granulumok áramlása és tartalmuk kiürülése a közvetlen kontaktus helyére irányul (Kupfer és Dennert 1984). Érdekesség, hogy az a

monoklonális ellenanyag, amely az NK sejtek, a monociták és még az aktivált T sejtek lítikus aktivitását is függeszti, ugyanígy csökkenti az LGL-sejtek ADCC reakcióját is (Burns és mtsai 1983). Ebből következik, hogy bár a target-effektor kötődés különbözik a két reakcióban, ugyanakkor a lízis utolsó lépésének közel hasonló vagy ugyanazon mechanizmus alapján kell lejátszódnia.

A granulociták természetes citotoxicitásáról szóló irodalom méginkább szegényes és ellentmondásos. Eddig a perforinhoz és az NKCF-hez hasonló proteint nem mutattak ki, az irodalom alapján azonban úgy tűnik, hogy a klasszikusnak mondható granulocita citotoxikus faktorok -az oxidatív burst folyamán létrejövő oxidatív mediátorok-, csak bizonyos stimuláló hatásokra jönnek létre (Clark és Klebanoff 1975; Weiss és Slivka 1982; Dallegri és mtsai 1983). Az egyik leggyakrabban használt aktiváló ágens a PMA, a protein kináz C aktiválásán keresztül fejti ki hatását, amely H_2O_2 keletkezéséhez vezet. Az aktivált granulociták citolítikus aktivitásában a neutrális szerinproteázok is résztvehetnek (Pontremoli és mtsai 1986). Míg a mieloperoxidáz, H_2O_2 , halid rendszer a mikroorganizmusok fagocitózisában vesz részt, addig az eukarióta sejtek esetében, amelyek elpusztítása extracellulárisan történik, így más mechanizmusok létezését kell feltételezni. Nem ismert, hogy a granulociták milyen mechanizmus szerint fejtik ki a citosztatikus hatásukat a tumor sejtekkel szemben. Inoue és Sendo (1983) szerint a

citosztázis és a citolízis között csak kvantitatív különbség létezik, mivel a metabolizmusukban gátolt sejtek előbb-utóbb elpusztulnak. Így a granulociták ill. az aktivált granulociták csak hosszabb, 24-48 órás inkubáció után fejtik ki citolítikus aktivitásukat (Inoue és Sendo 1983).

8. A szárnyasok természetes citotoxicitása

A szárnyas tumorimmunológia és a sejtközvetített citotoxicitás irodalma az emlősökéhez képest jóval szegényesebb. A csirke lépsejtek aktivitását in vitro idáig többféle target sejttel szemben vizsgálták. Sharma és Okazaki szerint a vizsgált target sejtek közül az LSCC-RP9-es sejtkultúra bizonyult a legérzékenyebbnek. Ez a sejtvonal limfoblasztoid eredetű, amely RAV-2-vel (Rous associated virus) oltott csirke burzális tumorból származik (Sharma és Okazaki 1981), de bebizonyították, hogy a citotoxicitás nem a vírusspecifikus antigénekkal szemben jön létre. Az is bebizonyosodott, hogy az effektor sejtek nem T sejt eredetűek és az anti-B savó sem befolyásolja a citotoxicitást.

A csirke fehérvérsejtek ADCC reakciót mutatnak, de a kontaktus az csak avian eredetű ellenanyag segítségével jön létre az effektor és a target sejtek között. Az emlős eredetű ellenanyagok nem ismerik fel, és így nem kapcsolódnak a csirke target sejtekhez (Imir és mtsai 1977). Chi és Thorbecke szerint az ADCC reakcióban főleg az Fc

receptor pozitív adherens sejtek heterogén populációja vesz részt, és csak kis százalékban az ún. "0" sejtek. Természetes citotoxicitást mediáló sejteket, amelyek az emlősök NK sejtjeihez hasonlóak, több szerző kívánt azonosítani, de csak megközelítő pontossággal utalnak egyik vagy másik sejtcsoportra. Sharma és Coulson szerint a természetes citotoxicitás csak a lépben található, de ezek a sejtek hőérzékenyek (Sharma és Coulson 1979). Fleischer (1980) ezzel szemben adherens, nagy sűrűségű sejteket írt le, amelyek NK-szerű funkcióval rendelkeztek, mind csirkékben mind fürjekben. Az effektor sejteket javarészt a perifériás vérből izolálta és csak kisebb százalékban a lépből. Újabban kimutattak hasonló aktivitású sejteket a csirke intestinumából (Chai és mtsai 1988). Lucas és Jamroz (1961) megállapították, hogy a szárnyasok perifériás vérében is megtalálhatóak az LGL-hez hasonló limfociták.

9. Az NK reakció modulációja

A natural killer aktivitást moduláló ágensek száma igen kiterjedt. A szervezetet érő változásokra az NK sejtek igen élénken reagálnak (különböző környezeti tényezőkre, pl. stresszre, hormonális változásokra, erős dohányzásra, alkoholizmusra, és ezek mellett még cirkadián (Fernandes és mtsai 1979.) és cirkaannuális (Pati és mtsai 1987) ritmussal is rendelkeznek). Ezen tényezők

mellett az NK aktivitás még egy szigorú genetikai kontroll alatt is áll (Petrányi és mtsai 1975). Míg a pozitív irányú stimuláció leggyakrabban az interferon indukción keresztül valósul meg, addig a negatív irányú moduláció számos úton keresztül valósulhat meg. Ezenkívül igen érzékenyen reagálnak a szuppresszor sejtek aktivitására is (Herberman 1982; Brunda és mtsai 1982). Az alábbi táblázatban a moduláló ágensekről csak egy vázlatos felsorolást adunk a teljesség igénye nélkül.

I. táblázat.

Az NK aktivitást serkentő anyagok

Interferonok	(Herberman 1977)
Poly I:C	(Goldfarb 1981)
Lektinek	(Brunda 1980)
IL-2	(Henney 1981)
Retinol	(Goldfarb 1981)
TNF	(Ostensen 1987)
Szelénium	(Petrie 1989)



II. táblázat.

Az NK aktivitást gátló anyagok

Tripszin	(Bundy 1980)
PMA	(Goldfarb 1981)
cAMP	(Goto 1983)
PGE ₂	(Droller 1978)
Cholera toxin	(Goldfarb 1981)
Mannose 6-P	(Ortaldo 1984)
Hydrocortison	(Glassman 1985)
Monensin	(Carpen 1982)

10. Az interferonok hatása az NK aktivitásra

Az interferon egy glikoprotein természetű anyag, melyet a szervezet sejtjei termelnek különböző típusú inducerek hatására (vírus, baktérium, antigén, mitogén stb.). Az interferonok antigenitásuk, pH érzékenységük, valamint a termelődési módjuk alapján három különböző csoportba különíthetők el (Stewart és mtsai 1980):

1./ A leukocita interferon (IFN- α) vírus fertőzések által indukálódik a B és az LGL sejtekben valamint a makrofágokban.

2./ A fibroblaszt interferon (IFN- β) termelődését vírusok és polinukleotidok váltják ki fibroblaszt sejtekben.

3./ Az un. immun-interferon (IFN- γ), amely fizikokémiai tulajdonságaiban jeletősen eltér az előző kettőtől, - mitogének és antigének hatására T sejtekben termelődik.

Az interferonok hatásai közé tartozik, hogy modulálják az immunrendszer (NK, ellenanyag termelő) sejtjeit (Bloom 1980). Az IFN típusok biológiai hatásukban is különböznek egymástól. Míg az IFN- α és β vírusszaporodást gátló hatása kifejezettebb, addig a sejtosztódást gátló hatás az IFN- γ esetében erősebb. Mindhárom IFN típus stimulálja az NK és az ADCC aktivitást (Trinchieri és Santoli 1978 a,b; Herberman és mtsai 1978 a,b; Senik és mtsai 1980; Friedman és Vogel 1983). Legtöbbször az effektor és a target sejtek együtt inkubálása esetén is termelődik interferon (Trinchieri és mtsai 1978). Természetesen nem csak az interferon, hanem az interferon inducerek is, mint pl. a Poly I:C és a különböző vírusok is fokozzák az NK reakciót. Fontos megemlíteni, hogy az IFN kezelés nyomán bekövetkező NK stimuláció de novo protein szintézishez kötött (Bishop és Schwartz 1982).

11. Az NK sejtek in vivo szerepe

Növekedik azon bizonyítékok száma, amelyek igazolni igyekeznek, hogy az NK sejtek fontos szerepet játszanak a szervezet természetes védekezésében bizonyos daganattípusokkal (Bloom és mtsai 1982) és vírus fertőzésekkel (Ausiello és mtsai 1983; Bukowski és mtsai 1983) szemben. Az előzőnek ugyan ellentmond az a megfigyelés, hogy

olyan betegekben ahol a rákos állapot előrehaladott, az NK aktivitás gyakran alacsony (Cunningham-Rundles és mtsai 1981; Kadish és mtsai 1981; Takasugi és mtsai 1977), bár ez másodlagosnak tűnik a rák terjedésével szemben, és következménye lehet, akár az NK és tumor sejtek egymásra hatásának, akár szuppresszor sejtek jelenlétének (Allavena és mtsai 1981; Herberman és mtsai 1980). Bizonyítékok vannak arra is, hogy az NK sejtek szabályozzák a vérképzést (Hansson és mtsai 1982) és az immunfunkciókat vagy direkt sejtkölcsönhatásokon, vagy a termelődő limfo-
kinek hálózatán keresztül. Ugyanakkor bizonyítékok az NK sejtek in vivo szerepére a emberben csak indirekten konklúzívak, alapvetően a különböző patológiás esetekben megfigyelt NK sejt aktivitás eltéréseken alapul. A direkt bizonyítékok főleg az NK sejtek sokféle in vivo szerepére a különböző kísérleti állatokban végzett kísérletek eredményeiből származnak.

III. ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az Intézetünkben Béládi és Pusztai közölte az első adatokat arról, hogy a humán adenovírusok interferon indukció képességével rendelkeznek csirkékben (Béládi és Pusztai 1967). Ez a képességük nem csak *in vitro* sejtkultúrákban (Béládi és mtsai 1970; Mucsi és mtsai 1970), hanem *in vivo* körülmények között (Pusztai és mtsai 1969; Béládi és mtsai 1979) is érvényesül. A humán adenovírus ugyanakkor immunosuppresszív hatást is kifejt a csirkék primer és szekunder immunválaszára (Béládi 1973) és ennek hátterében az indukált interferon állhat (Béládi és mtsai 1979; Béládi 1979). Az Intézetben adenovírus fertőzés modellezésére használt csirkék természetes citotoxicitásáról és ennek adenovírusok és az általuk indukált interferonok citotoxicitást moduláló hatásáról, az adatok nagyon hiányosak voltak. Korábbiakban munkatársaink a csirke LGL sejtek által kifejtett ADCC aktivitást már tanulmányozták, de hiányzott ennek az aktivitásnak a humán rendszer LGL sejtjei által mediált "párja", az NK aktivitás.

Az Intézetünkben munkatársaink által előállított humán interferonok biológiai hatásának ellenőrzése is szükségessé vált ADCC és NK aktivitásra. Ez ugyan csak *in vitro* körülmények közötti hatásról adott információt, de esetleges *in vivo* felhasználáshoz is prognosztikus támpontot nyújtott.

Célkitűzések:

I. A humán adenovírus hatásának vizsgálata csirke NK aktivitásra

1. Az NK aktivitás kimutására alkalmas rendszer kidolgozása.

2. A humán adenovírus fertőzés NK aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata.

3. Az adenovírusok által indukált interferonok szerepének tisztázása a citotoxicitás stimulációjában.

II. Az adenovírus hatásának vizsgálata az NK reakcióra humán rendszerben.

1. A vírus esetleges közvetlen hatásának kimutatása *in vitro* humán rendszerben.

III. A csirke interferon hatásának vizsgálata a csirke NK aktivitásra.

1. Az interferonok hatásának vizsgálata az NK aktivitásra.

2. Az interferonok hatásának vizsgálata a target sejtre.

IV. Hu-IFN α és Hu-IFN γ preparátum NK aktivitásra kifejtett hatásának mérése.

V. A csirke és humán NK aktivitás tulajdonságainak összehasonlítása.

IV. ANYAGOK

^{51}Cr Mr C-5 (LNK)

^{51}Cr C.J.S. (Amersham)

Density Marker Bead (Pharmacia)

✓ DMSO (sigma)

✓ EDTA (Reanal)

✓ Eagle tápfolyadék

FCS (Foetal Calf Serum) Gödöllő

Ficoll 400 (Pharmacia)

Heparin (Serva)

Komplement--tengerimalac savóból 1:20 hígítású

Kataláz (Sigma)

Luminol (Sigma)

✓ PBS pH 7,2

Percoll (Pharmacia)

PMA Phorbol-12-myristate-13-acetate (Sigma)

✓ RPMI 1640 tápfolyadék

SOD szuperoxid-dizmutáz (Sigma)

Tripszin 1:250 (Difco)

✓ Tryptose Phosphate Broth (Difco)

Uromiro (Bracco)

V. MÓDSZEREK

1. Effektor sejtek

1.1. Csirke fehérvérsejtek izolálása

A csirkékből szívpunkcióval nyert heparinos (10 NE/ml) perifériás vért PBS-sel 3x-ra hígítottuk, majd 1,085-ös sűrűségű Ficoll-Uromiro gradiensre rétegeztük óvatosan. Ezt követően 800 g-vel 20'-ig centrifugáltuk 16-18 °C-on. Az interfázisban lévő fehérvérsejteket Pasteur pipettával összegyűjtöttük, 3x mostuk PBS-el 600 g-el 10'-ig centrifugálva. Az üledéket RPMI tápfolyadékban szuszpendáltuk, a sejtek életképességét tripánkék segítségével ellenőriztük, majd a sejtszámot Bürker kamra segítségével határoztuk meg.

1.2. Pulyka fehérvérsejtek

A vért szárnyvénából nyertük, majd az előbbiekhöz hasonlóan dolgoztuk fel.

1.3. Granulocita szeparálás

Az 1.1. fejezetben leírt fehérvérsejteket további szeparálásnak vetettük alá, hogy granulocitákat nyerjünk, Hjorth és mtsai (1981) módszerét kisebb módosításokkal alkalmazva. A fehérvérsejtszuszenziót kétlépcsős Per-

coll gradientsre rétegeztük. A felső lépcső 60 %-os, az alsó pedig 80 %-os hígítású izotóniás Percoll volt. A centrifugálás 450 g-n történt, 30 percig 18 °C-on. A felső interfázisból a mononukleáris sejteket, az alsóból pedig a PMN sejteket nyertük. A szeparálást egyszeri PBS-sel történő mosás követte, az előzőleg leírtak alapján.

1.4. LGL szeparálás

Az előzőleg kétlépcsős gradiens 60 %-os hígítású interfázisából kinyert mononukleáris sejteket 5×10^6 sejt/ml-re beállítva, plastik petricsészébe kiültettük. 45 perc inkubáció után a nonadherens sejteket összegyűjtöttük, és óvatosan többlépcsős Percoll gradientsre rétegeztük (Timonen és Saksela 1980). A lépcsők különbségei esetenként 2,5-5 %-osak voltak. A sűrűségbeli különbséget Density Marker Bead segítségével állapítottuk meg. Az LGL sejteket az 1,062-1,064 sűrűségű rétegek interfázisából izoláltuk. A frakciók tisztasága LGL sejtekre nézve 30-50 % között mozgott.

1.5. Humán fehérvérsejtek

Heparinnal alvadásgátolt perifériás vért 1,075-ös sűrűségű Ficoll-Uromiro gradientsre rétegeztük Böyum leírása alapján, és a sejteket 1.1. pontban leírtak alapján szeparáltuk és mostuk. A monocitákat plastikra való kiültetéssel távolítottuk el. A humán granulociták szepará-

lása a csirkénél leírtnál sokkal egyszerűbb volt a vérkép alapvető különbségei miatt. A teljes vért 3x-os hígítás után kétlépcsős Percoll gradiensre rétegeztük (Hjorth és mtsai 1981). A granulocitákat az alsó interfázisból nyertük kb. 90 %-os tisztaságban.

2. Target sejtek

2.1. NK reakciók target sejtjei

- K562: erythromyeloid leukémiás eredetű humán sejtek (Lozzio és Lozzio 1975).
- LSCC-H32: avian limfoid leukémia vírussal transzformált (ALL) csirke fibroblasztoid sejtek (Kaaden és mtsai 1982).
- LSCC-RP9: Rous sarcoma vírussal transzformált limfoblasztoid csirke sejtek (Sharma és Okazaki 1981).

A K562 jelű sejteket szuszpenziós kultúrában tartottuk fent RPMI-1640 tápfolyadékban, amelyet 10 % foetalis borjúsavóval (FCS) egészítettünk ki. A sejteket 5 % CO₂ tenzió mellett termosztátban inkubáltuk. Az LSCC-RP9 sejteket ugyancsak szuszpenzióban tartottuk fenn, de itt az előbb leírt tápfolyadékhoz még 5 % csirke savót is adtunk. Az LSCC-H32 jelű sejteket Eagle tápfolyadékban (+10 % Tryptose Phosphate Broth) szaporítottuk 15 %-nyi FCS-sel kiegészítve, egy sejt rétegű, adherens kultúrában.

2.2. A csirke ADCC target sejtje

Birka vörösvértest (Bvvt; Phylaxia), Alsevehr oldatban tárolva (egy hetesnél régebbi vért nem használtunk fel).

A sejteket felhasználásuk alkalmával 3x mostuk PBS-ben, majd 3,8%-os Na-citrát oldatban 5%-os vvt szuszpenziót készítettünk.

Az ADCC kísérletekhez birka vörösvértest ellen termelt csirke ellenanyagra volt szükségünk, amelyet 3-4 hónapos kakasból nyertünk. Az immunizálás 3-5 alkalommal 30%-os Bvvt szuszpenziót iv. oltva (0,1ml/100g) történt. Próba-véreztetés után az utolsó oltást követő 1-2 héttel nyert inaktivált (56 °C 30 perc) savót használtuk fel mint hemolizint. A savó ellenanyag titerét 1%-os Bvvt szuszpenzió agglutinációját tesztelve határoztunk meg, és a kísérletekben az agglutinációs titernek megfelelő koncentráció felét használtuk fel.

3. Citotoxicitási tesztek

3.1. Target sejtek jelölése

A spontán citotoxicitások mérésére az ún. "chrom-release" tesztet használtuk.

a) NK reakció

A csirke NK aktivitás mérésére target sejteknek az LSCC-H32-es és az LSCC-RP9-és jelű sejt vonalakat használ-

tuk. A humán rendszer tesztelésére a K562-es target sejteket használtuk. A szuszpenziós sejtkultúrában lévő sejtekből egyszeri mosás után 0,5 ml térfogatban $3-5 \times 10^6$ sejtet jelöltünk 200 μCi (7.4 MBq) ^{51}Cr izotóppal (Amersham v. LNK), és 45 percig 37°C -on inkubáltuk CO_2 termosztátban. Az inkubációs idő letelte után a sejteket 3x mostuk PBS-ben, majd $1 \times 10^5/\text{ml}$ sejtszámmra állítottuk be. Az adherens sejteket $1-2 \times 10^5/\text{ml}$ számmal indítottuk a tenyésztő flaskákban úgy, hogy a kísérletek napjára folyamatos monolayert alkossanak. A jelölés céljára 0,25% tripszin és 0,02% EDTA keverékével tripszineztek kb. 5 percig 37°C -on míg a sejtek a flaska aljáról el nem váltak. Ekkor savó tartalmú hideg tápfolyadék hozzáadásával leállítottuk a tripszin hatását. A sejteket centrifugáltuk, 10% FCS tartalmú RPMI 1640 tápfolyadékban szuszpendáltuk, majd a szuszpenziós sejtekhez hasonlóan $3-5 \times 10^6$ sejtet izotóppal jelöltük.

b) A csirke ADCC reakció

Az ADCC méréséhez csirke hemolizinnel érzékenyített Bvvt-t használtunk. 5%-os Bvvt szuszpenzióból $2-5 \times 10^7$ sejtet jelöltünk 200 μCi ^{51}Cr -mal 75 percig 37°C -os termosztátban. Az inkubációs idő utolsó 30 percében adtuk a sejtekhez a szenzibilizáló ellenanyagot a jelölt sejt térfogatával azonos mennyiségben. Az inkubáció végén 3x PBS-sel kimostuk a meg nem kötődött izotópot és ellenanyagot. A mosás után a sejteket $1-5 \times 10^5/\text{ml}$ -re állítottuk.

3.2. A citotoxicitási reakciók mérése

A tesztet műanyag mikrotiter lemezekben végeztük. Az effektor sejtekből 100-100 μ l-et mérve a lyukakba 4 felező hígítási lépcsőt készítettünk. Mindegyik hígításból 3 párhuzamosunk volt. A jelölt 1×10^5 /ml target sejtekből mindegyik lyukhoz konstansan 100-100 μ l-t mértünk. A spontán release ellenőrzésére 3 parallelben a target sejtekhez csak tápfolyadékot adtunk (az sp. release mértéke minden esetben 10 % alatt maradt). Az inkubációs idő 4 óra volt 37°C-on CO₂ termosztátban. Ezután a felülúszókba kiszabadult izotóp mennyiségét mértük gamma számlálón. A króm kiszabadulás mért értéke (cpm) egyenesen arányos a citotoxicitási %-kal. A citotoxicitási %-ot az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\text{Citotoxicitási\%} = \frac{\text{felülúszó cpm} - \text{spontán cpm}}{\text{teljes beépült aktivitás cpm}} \times 100$$

4. A leukocita előkezeléseknél felhasznált készítmények

4.1. Csirke interferonok

A csirke leukocita interferon 12. típusú humán adeno-vírussal indukált volt, amelynek a tisztítási eljárások után 10^5 NE/mg fehérje specifikus aktivitása volt. A csirke interferonok antivirális értékmérése csirke embrionális fibroblaszt (CEF) sejtek szekunder tenyészetén

vesicular stomatitis virus (VSV) citopátiás hatásának gátlása alapján történt (Puszai és mtsai 1986).

4.2. Humán interferonok

Az α interferonok termelése Cantell és mtsai (1971) által kidolgozott módszer módosításával (Béládi és mtsai 1980) történt Sendai vírussal fertőzött leukocitákban. A tisztítatlan α interferon specifikus aktivitása $2-3 \times 10^4$ NE/mg fehérje, a tisztított készítményeké (Tóth és mtsai 1985) 1×10^6 NE/mg fehérje volt.

Az IFN- γ termelése Con-A indukcióval történt, specifikus aktivitása 10^3 NE/mg fehérje, a tisztított pedig 1×10^5 NE/mg fehérje specifikus aktivitással rendelkezett (Tóth és mtsai 1985).

A humán interferonok antivirális hatásának mérése MDBK (borjú vese) és WISH (humán amnion) sejteken történt, VSV citopátiás hatásának gátlását tesztelve (Tóth és mtsai 1985).

4.3. Vírusok

A humán adenovírus 6. és 12. típusát használtuk. A vírusokat HEp-2 sejten szaporították és CsCl grádiensen tisztították, tárolásuk -70°C -on történt (Taródi és mtsai 1977).

4.4. Monoklonális ellenanyagok

A monoklonális ellenanyagok a hagyományos hibridizációs technikával (Köhler és Milstein 1975) előállítottak voltak (Mándi és mtsai 1987).

A munkához az immunfluoreszcenciával tesztelt hibridómák közül az 1C3-at (amely granulocita specifikus volt) és 2B1-t (burzális sejtekkel és monocitákkal reagáló) választottuk ki. Ezen ellenanyagok nagyobb mennyiségben való termelését a klónozott sejtek Balb/c egerek hasüregébe oltásával ill. a kifejlődő ascites visszanyerésével érték el. A hőinaktivált ascitest 1:100 véghígításban használtuk.

5. Az effektor ill. target sejtek előkezelése

5.1. Csirke effektor sejtek kezelése monoklonális ellenanyagokkal

A szeparált csirke perifériás fehérvérsejteket (1×10^7 /ml), vagy pedig a tisztított granulocitákat ($1-2 \times 10^6$ /ml) 30 percig kezeltük 37 °C-on 1C3-as vagy néhány esetben 2B1 monoklonális ellenanyagot tartalmazó Balb/c egér ascites 1:100 hígításával. Ezután a sejteket 1x megmostuk PBS-ben, majd tengerimalac komplement (C') 1:20 hígítását adtuk a sejtekhez, mellyel 45 percig inkubáltuk. Ezután újabb mosás következett, amely után a sejtszámot beállítva a sejteket effektor sejtekként ad-

tuk a citotoxicitási tesztekhez. A kontroll mintákat hasonlóan kezeltük, kivéve, hogy csak a hígításra használt tápfolyadékot adtuk a mintákhoz ellenanyag és komplement kezelés nélkül.

5.2. A csirke fehérvérsejtek kezelése tripszinnel

Az 1×10^7 /ml sejtszámba beállított csirke fehérvérsejtszuszpenziót 37°C -on 45 percig inkubáltuk 0,1 %-os tripszin jelenlétében. Ez a tripszin koncentráció a sejtek életképességét nem befolyásolta, amit a kezelés utáni tripánkéssel végzett exklúziós sejtszámlálás is bizonyított. Ezután a sejteket 10 % FCS tartalmú tápfolyadékban mostuk, majd egyrészüket ugyanebben a közegben 1×10^7 /ml-re állítva a sejtszámot a citotoxicitási reakcióhoz hozzáadtuk, mint effektor sejtek. A tripszinnel kezelt sejtek másik felét autológ plazmában vettük fel és 4°C -on inkubáltuk egy órán keresztül. Ez követően, hasonlóan az előzőekhez mostuk a sejteket és 1×10^7 /ml-re állítva a sejtszámot az NK és ADCC aktivitásra teszteltük. A kontrollt a tripszinnel és autológ savóval történő kezelés helyett csak tápfolyadékban inkubáltuk és a kezelt sejtekhez hasonlóan mostuk.

5.3. Az effektor sejtek fertőzése in vitro humán adenovírussal

Az effektor sejtek (humán perifériás limfociták, csirke és pulyka perifériás fehérvérsejteket) fertőzésekor 10^7 sejtet/ml-t kezeltünk 10^7 - $10^{7,5}$ TCID₅₀ 12. típusú humán adenovírussal és 24-72 órán keresztül inkubáltuk. (Humán kísérleteknél $10^{4,5}$ - $10^{7,5}$ TCID₅₀ között változtattuk a vírus mennyiségét). Az inkubációs idő letelte után a felülszókat centrifugálással (600 g, 10 perc) eltávolítottuk illetve IFN értékmérésre félretettük. A sejteket 10 % FCS-sel kiegészített RPMI 1640 tápfolyadékban szuszpendáltuk és a citotoxicitási teszt target sejtjeihez adtuk. Egyes kísérletekben ezt a lépést megelőzte a csirke fehérvérsejtek kezelése 1C3 vagy 2B1 jelű monoklonális ellenanyaggal és komplementtel, az előbbieken ismertetett módon. A termelődött csirke interferonok értékmérése CEF szekunder tenyészetén a VSV citopátiás hatásának gátlása alapján történt (Pusztai és mtsai 1986).

5.4. Az effektor sejtek előkezelése interferonnal

A humán vagy csirke effektor sejteket 5×10^6 /ml-re állítottuk, és 1-18 órán keresztül nyers vagy tisztított interferon különböző koncentrációival kezeltük. Ezután sejteket PBS-sel 1x mostuk és a citotoxikus reakciókban mint effektor sejteket használtuk.

5.5. A target sejtek előkezelése interferonnal

A sejt kultúra tripszinezésekor 2×10^5 /ml sejtszámmal indítottuk az újabb tenyészeteket 20-20 ml térfogatban flaskánként. Egy-két óra inkubálás után mialatt a sejtek a tenyésztő edények aljára kitapadtak, csirke interferont adtunk a tenyészetekhez különböző koncentrációban, majd 24-48 órán keresztül továbbinkubáltuk azokat. Az inkubációs idő leteltével a sejteket a szokványos módon tripszineztek és izotóppal jelöltük, de a 45 perces jelölés inkubációjának ideje alatt is a sejteket tartalmazó tápfolyadékban hasonló koncentrációban volt jelen az interferon. Az interferon jelenléte a felülszókban nem befolyásolta sem az izotóp felvételt sem a spontán izotóp felszabadulást.

6. A kísérleti állatok, és azok oltása

6.1. Csirkék

White Leghorn törzsből származó 6-12 hetes állatokat alkalmaztunk kísérleteinkben. Ezeket az állatokat i.v. szárnyvénába oltottuk $10^{10,5}$ TCID₅₀ 6. vagy $10^{7,5}$ TCID₅₀ 12. típusú humán adenovírussal, amelyeket 0,2 ml fiziológiás NaCl-ben szuszpendáltunk. A nyers csirke interferont ugyancsak i.v. oltottuk (2000 NE/2ml). A csirkékből szívpunkcióval nyertük a perifériás vért 10 NE/ml heparinnal gátolva a véralvadást.

6.2. Pulykák

A 6-8 hetes kanadai gyöngypulykákból (Szentese, Árpád MGTSZ) a perifériás vért a szárnyvénából nyertük 10 NE/ml heparinnal gátolva a véralvadást.

7. Festési eljárások

A fehérvérsejtek és a target sejtek életképességét minden esetben tripánkék kizárásos módszerrel ellenőriztük, és így állapítottuk meg a sejtszámokat is Bürker kamra segítségével.

A kvalitatív vérkép ellenőrzésekor a csirke fehérvérsejtek számlálására a Natt-Herrick (1952) festést végeztük, mivel ennek a festéknek a segítségével a trombociták elkülöníthetők voltak a fehérvérsejtektől, illetve a mononukleáris sejtek is elkülönültek a granulocitáktól (Natt és Herrick 1952).

A keneteket beszárítva fixáltuk, majd May-Grünwald Giemsa szerint festettük. E festés segítségével morfológiailag azonosíthattuk az LGL sejteket, a monocitákat és a granulocitákat.

8. A sejtek kemilumineszcenciájának (CL) mérése

A humán és csirke granulocitákat szeparálás után 5×10^6 /ml sejtszámra állítottuk be RPMI 1640 tápfolyadékban és felhasználás előtt jégben tároltuk.

A Luminolból 10 mg/ml törzsoldatot készítettünk DMSO-ban, majd ezt -20°C -on tároltuk. Alkalmazása során 100x hígítást készítettünk PBS-ben, amelyből 10-10 μl -t a szcintillációs flaskákba mérve 10^{-6} M végkoncentrációt értünk el. A flaskákba előzőleg 2-2 ml PBS-t mértünk mintánként. A PMA-ból (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) 10 mg/ml DMSO-ban oldott törzsoldatot készítettünk, amelyből a kísérletektől függően 5-10-15 ng/ml-es végkoncentrációt készítettünk a flaskákban. A mérést a sejtek hozzáadásával indítottuk el úgy, hogy a lehűtött sejt-szuszpenziókból 100-100 μl -t mértünk mintánként a flaskákhoz. A mérést PACKARD TRI-CARB folyadékszscintillációs számlálóban végeztük, "Chemiluminescencia on" üzemmódban 25°C -on. Az egyes mintákat 1-1 percig mértük, majd a mérések ismétlésére 5-7 perc múlva került sor a mintaszámtól függően. A SOD és a kataláz hatását a humán granulocitákra úgy vizsgáltuk, hogy 100-400 $\mu\text{l}/\text{ml}$ végkoncentrációt készítettünk a flaskákba mérve.

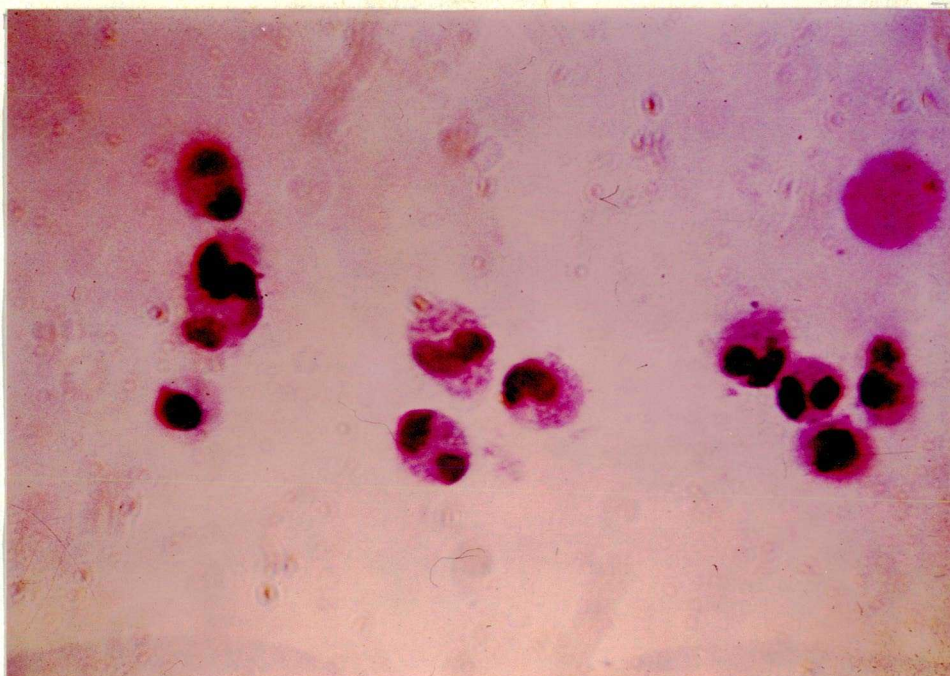
9. Eredmények matematikai értékelése

A kísérletek eredményeinek valódiságát Student-féle kétmintás T-próbával számolt szignifikancia szintekkel ellenőriztük.

VI. EREDMÉNYEK

1. A csirke natural killer rendszer effektor sejtjeinek azonosítása

A csirke natural killer rendszerben két sejtvonal bizonyult érzékenynek a sejttoxikus hatással szemben. Mindkét target sejtvonal vírussal transzformált volt. Míg az LSCC-H32 fibroblaszt eredetű volt, addig az LSCC-RP-9 limfoblasztból származott (Sharma és Okazaki 1981; Kaaden és mtsai 1982). Az 1,085-ös sűrűségű Ficoll-Uromiron szeparált fehérvérsejtek 4 órás inkubációs idő alatt is citotoxikusnak bizonyultak mindkét target sejttel szemben. Az LSCC-H32 jelű sejtvonal esetében átlagosan 30-35 %-ot ért el a citolízis, az LSCC-RP-9 esetében azonban alacsonyabb: 15-20%-os volt. Az 1,075-ös sűrűségű Ficoll-Uromiron szeparált mononukleáris sejtek nem mutattak reakciót, ezért további lépések váltak szükségessé az effektor sejtpopuláció azonosítására. Így az 1,085-ös fajsúlyú Ficoll-Uromiron való vvt. mentesítés után kétlépcsős, 60 ill. 80 %-os Percoll gradiensen a fehérvérsejteket tovább szeparáltuk. A 60 %-os rétegen a mononukleáris sejteket, a 80 %-os rétegen pedig főként a granulocitákat izoláltuk. Az effektor sejteknek a 80 %-os Percoll rétegről izolált granulociták bizonyultak. Morfológiai azonosításuk elsődlegesen May-Grünwald Giemsa festéssel történt, amely 70-80 %-os tisztaságú granulocita populáció jelenlétét

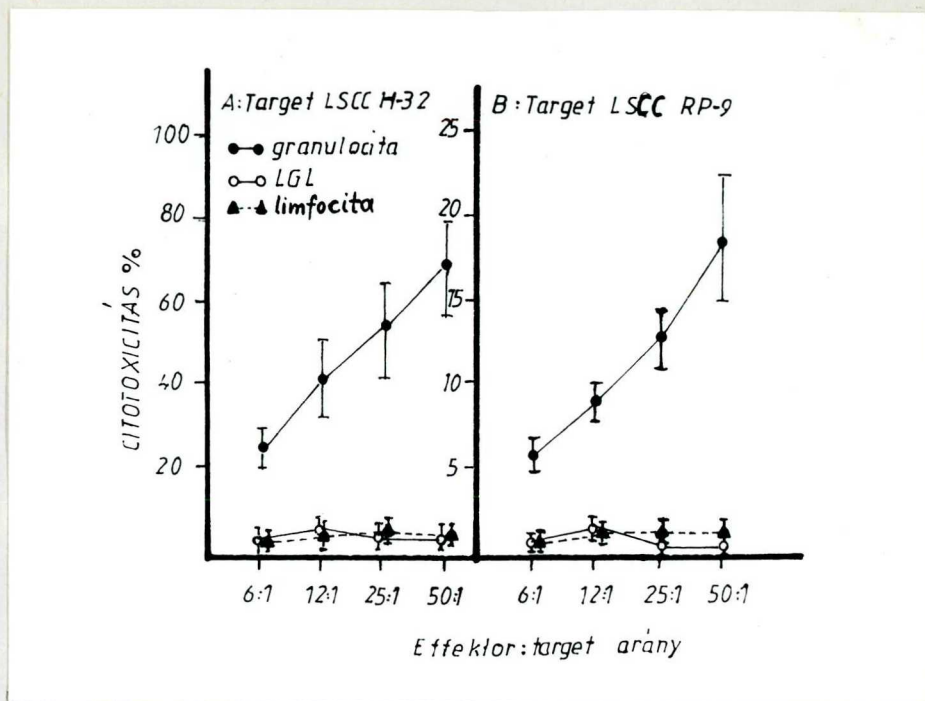


1. ábra. Szeparált csirke granulociták morfológiai képe
May-Grünwald Giemsa szerint festett keneten.

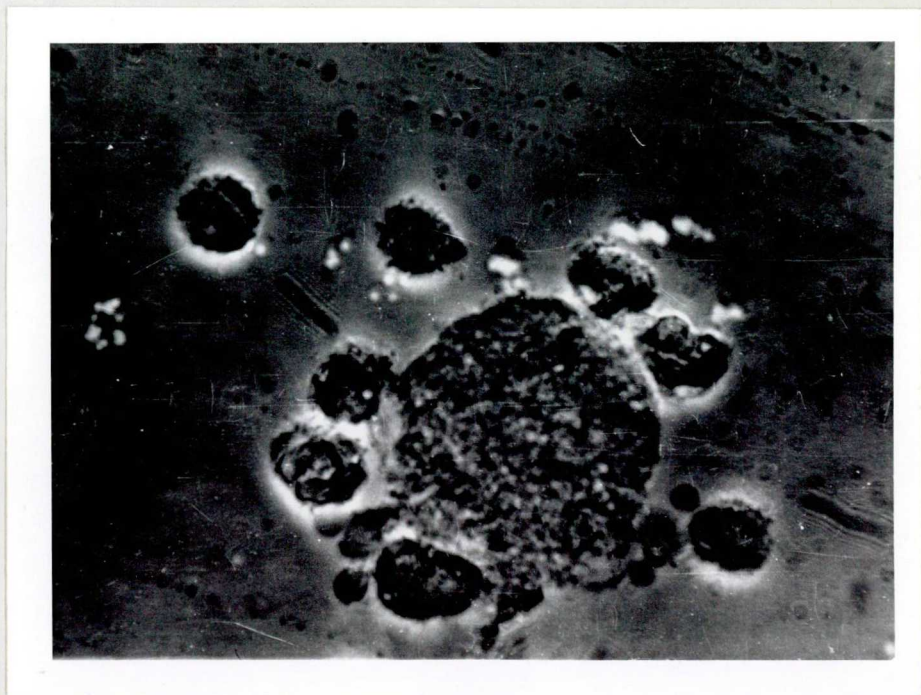


2. ábra. Szeparált csirke LGL sejtek morfológiai képe
May-Grünwald Giemsa szerint festett keneten.

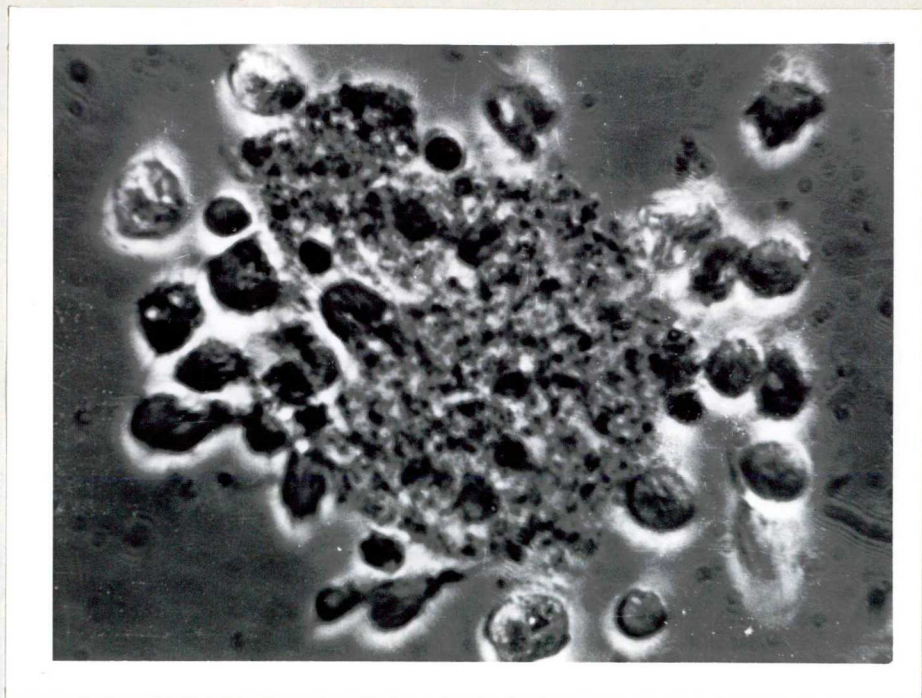




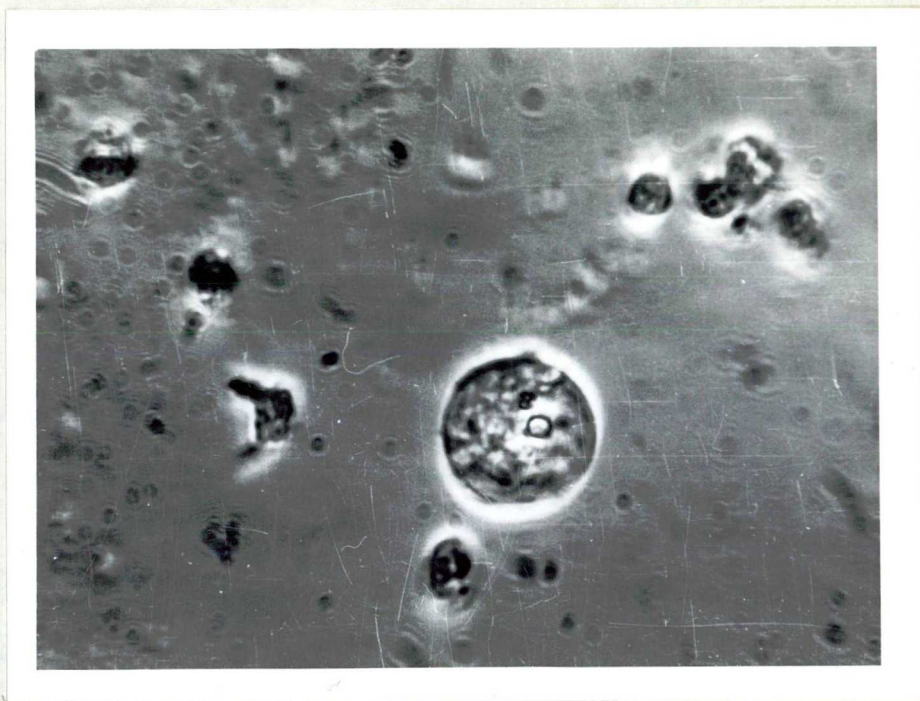
3. ábra. Csirke granulociták, limfociták és LGL sejtek spontán citotoxikus aktivitása .



4. ábra. A csirke granulociták rozettaszerűen helyezkednek a target sejt (LSCC-H32) körül .



5. ábra. A csirke granulociták és az elpusztított target sejt (LSCC-H32).



6. ábra. Csirke LGL sejtek és target sejtek (LSCC-H32).

bizonyította (1. ábra). A réteg szennyeződése a kis limfocitáktól, a trombocitáktól és a vvt-től eredt. Az effektor populáció legbiztosabb azonosítását az Intézetünkben munkatársaink által előállított csirke granulocita elleni monoklonális ellenanyag biztosította. Ennek specifitását citofluorometriásan is igazolták (Mándi és mtsai 1987). Bebizonyosodott, hogy a polimorfonukleáris sejteknek, a granulocitáknak tulajdonítható a spontán, 4 órában kifejeződő citotoxikus aktivitás. A felső interfázisban (60 %-os Percoll) azonosítottuk az LGL sejtek jelenlétét (2. ábra). Igen gyakran monocita mentesítettük ezt a réteget egy órán át inkubáltuk plastik Petri csészében, hogy az adherens sejtek kiüljenek. Az izolátum kontaminációját kis limfociták és trombociták okozták. Az LGL sejtekben feldúsított 60 %-os Percoll réteg interfázisa nem bizonyult citotoxikusnak a target sejtekkel szemben (3. ábra), míg a granulocita dús fázis elsősorban az LSCC-H32 target sejttel szemben kifejezetten citotoxikus volt (8 kísérlet átlaga). A granulociták sejttoxikus aktivitását a fáziskontraszt mikroszkóp alatt megfigyelt target sejtekkel való konjugátum képzés is igazolta. Az effektor és a target sejteket egy kémcső alján kis mennyiségű tápoldatban 10:1 arányban összekevertük majd 1/2-1 óra inkubáció után megfigyelhettük hogy a granulociták rozettaszerűen körül vették a target sejteket (4. ábra), majd további 1-2 óra eltelte után a target sejteket elpusztították (5. ábra). Az LGL sejtekben feldúsított frakció nem mutatott hasonló aktivitást (6. ábra). A monoklonális ellena-

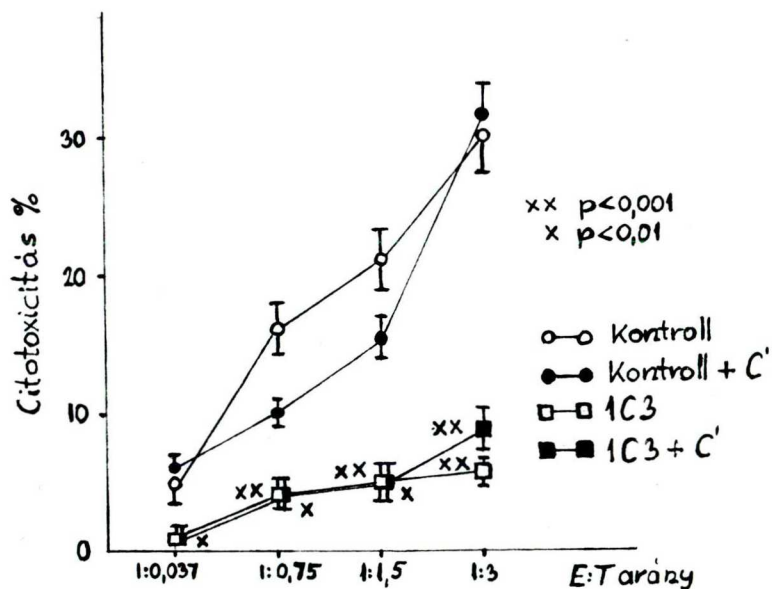
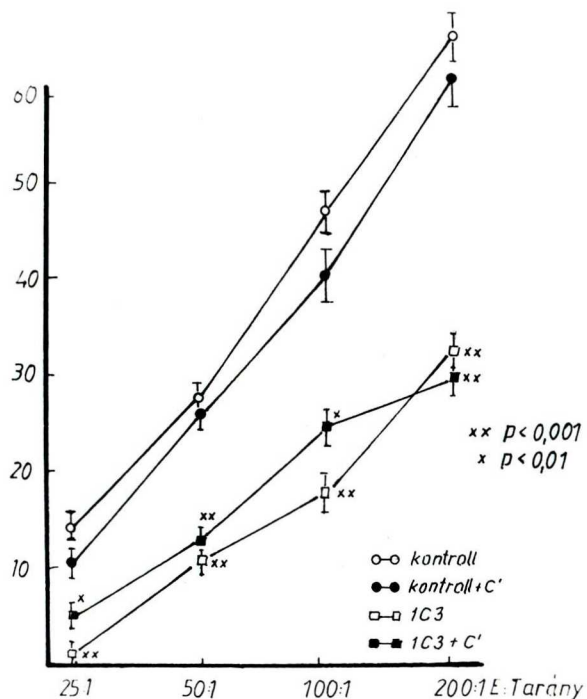
anyagokkal végzett vizsgálatok további bizonyítékot nyújtottak a granulociták spontán citotoxicitásban játszott szerepére. Az 1C3 jelű monoklonális ellenanyag, amely munkatársaink vizsgálata szerint (Mándi és mtsai 1987) a granulociták 93-97%-val reagált, bizonyult elsődlegesen alkalmasnak erre a célra. Az effektor sejtpopulációt előkezeltük az 1C3-as ellenanyaggal, majd komplement kezelés után LSCCH-32 target sejttel szembeni aktivitást vizsgáltuk (7. ábra). A kezelés hatására a citotoxicitás jelentősen csökkent a kontrollhoz viszonyítva. Az 1C3 a komplement hozzáadása nélkül is majdnem hasonló mértékű citotoxicitás csökkenést eredményezett (3 kísérlet eredményének átlag értékei $\pm$ SD). Ezt a hatást csak a granulocita specifikus 1C3 ellenanyag használatánál figyelhettük meg (az 1C3 granulocita specifikusnak bizonyult és nem reagált egyéb származású sejtekkel mint pl. mononukleáris, csontvelő, tímusz stb.).

2. A csirke granulociták szerepe az ADCC reakcióban

A csirke granulociták NK citotoxicitásban való szerepének tisztázása után kísérletet végeztünk arra vonatkozóan, hogy a granulociták szerepet játszanak-e az ADCC reakció mediálásában is. A citotoxicitás tesztelésére csirke hemolizinnel érzékenyített Bvvt-eket alkalmaztunk target sejtekként. A Ficoll-Uromiro gradiensen nyert fehérvérsejt frakció a 10-15 hetes állatoknál 20-30%-os, az 5-10 hetes állatoknál pedig 40-50 %-os értékeket mutatott.

7. ábra.

Granulocita specifikus monoklonális ellenanyag (1C3) hatása csirke fehérvérsejtek spontán citotoxicitására (target: LSCC-H32).

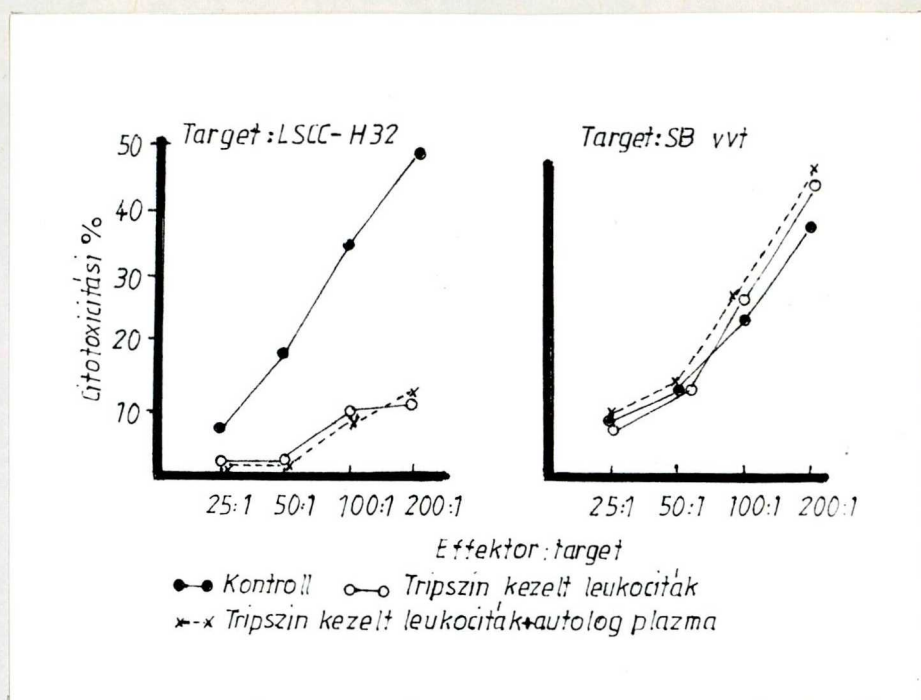


8. ábra. Az 1C3 monoklonális ellenanyag hatása a csirke granulociták ADCC aktivitására.

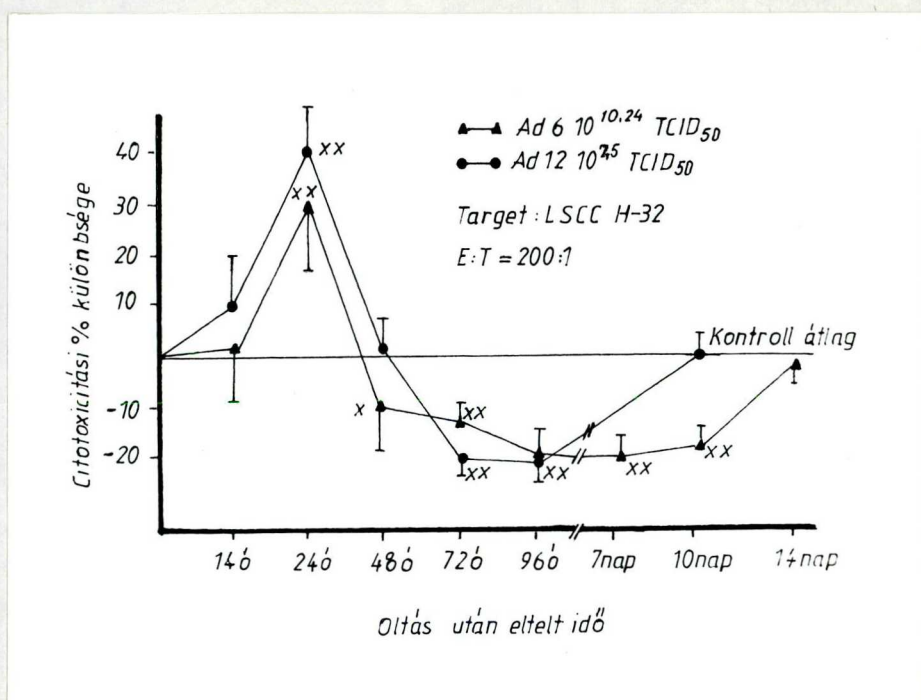
A fehérvérsejt frakció a Percoll gradiensen mononukleáris és granulocita frakciókra volt bontható. A mononukleáris sejtek plasztikra való kiültetésével az adherens sejteket (monocitákat) távolítottuk el. Az LGL sejteket a mononukleáris frakció Percoll gradiensen való tovább szeparálásával nyertük. A NK reakciót nem mutató LGL sejtek az ADCC reakcióban jelentős aktivitást mutattak, bár a legaktívabbnak a granulociták bizonyultak (8. ábra). Az 1C3-as ellenanyag felhasználásával a granulocita frakció ADCC aktivitása jelentősen csökkenthető volt ($p < 0,001$) mind komplemennt kezeléssel, mind anélkül (3 párhuzamos kísérlet eredményének átlagértékei $\pm$ SD).

3. Tripszin kezelés hatása a csirke granulociták ADCC és NK aktivitására

Az előzőekben leírtak alapján felmerülhet az a kérdés, hogy vajon amikor a granulociták NK aktivitását mértük, akkor nem egy esetleges ADCC reakcióról volt-e szó? Ennek a feltételezésnek az ellenőrzését a következő módon végeztük el: Az effektor sejteket 0,1%-os tripszin jelenlétében inkubáltuk 45 percig 37 °C-on, hogy a felületi, targethez kötődő receptor struktúrákat eltávolítsuk. Mivel az ADCC-ben részvevő Fc receptorok tripszin rezisztensek (Perussia és mtsai 1979), így az ADCC reakció nem, viszont az NK reakció jelentősen csökkent a kezelés hatására (9. ábra). A tripszin kezelés esetleg eltávolítja az effektor sejtekre passzívan adszorbeálódott ellenanyago-



9. ábra. Tripszin hatása a csirke spontán citotoxikus és ADCC aktivitásra. Autológ plazma hatása a tripszinezett sejtek citotoxicitására.



10. ábra. A humán adenovírus hatása a spontán citotoxicitásra csirkékben.

x= $p < 0,01$ xx= $p < 0,001$

kat. E feltételezés ellenőrzésére alkalmaztuk az effektor sejtek egyrészénél az utólagos autológ plazma kezelést. Megállapítható volt, hogy a tripszin kezelés hatása nem reverzibilis az autológ plazma alkalmazása esetén. Mindezek alapján valószínű, hogy nem ADCC specifikus citotoxikus mechanizmus zajlik le, hanem egy tényleges NK reakció.

4. Humán adenovírusok hatása a csirke NK aktivitásra

Az adenovírusok citotoxicitás moduláló hatását a következő módon vizsgáltuk: a 10-11 hetes csirkéket ip. oltottuk (6-6-ot egy csoportban) 6. ill. 12. típusú humán adenovírussal, majd a megfelelő inkubációs idő után szívpunkcióval vérmintát véve, a perifériás fehérvérsejtek citotoxicitását meghatároztuk (10. ábra) az érzékenyebbnek bizonyult LSCC-H32 target sejtet használva.

Mindkét vírusoltást követő 24 órán belül jelentős (az alapértéknél 30-40%-kal magasabb) citotoxicitás emelkedést észleltünk, amely azonban hamarosan lecsökkent a kontroll érték alá és csak a 10-14. napon érte el újból az eredeti alapértéket. A 12. típusú vírusból, lévén jobb interferon inducer (Mucsi és mtsai 1970) kevesebb is elég volt a citotoxicitás fokozódásának kiváltására. 8 órával a 12. típussal való oltás után az állatok szérumából átlagosan $0,5-1,2 \times 10^3$ NE/ml interferon mennyiséget tudtunk kimutatni. Ellenőriztük, hogy az adenovírusok okozta citotoxicitás növekedés valóban a granulocitáknak tulajdonít-

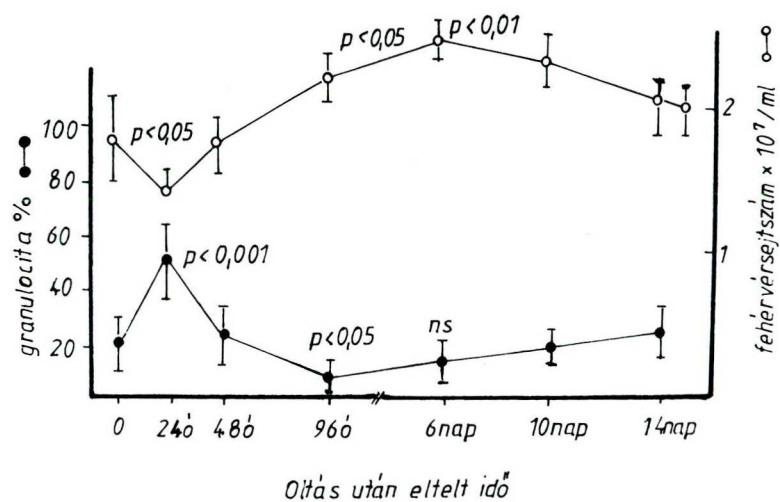
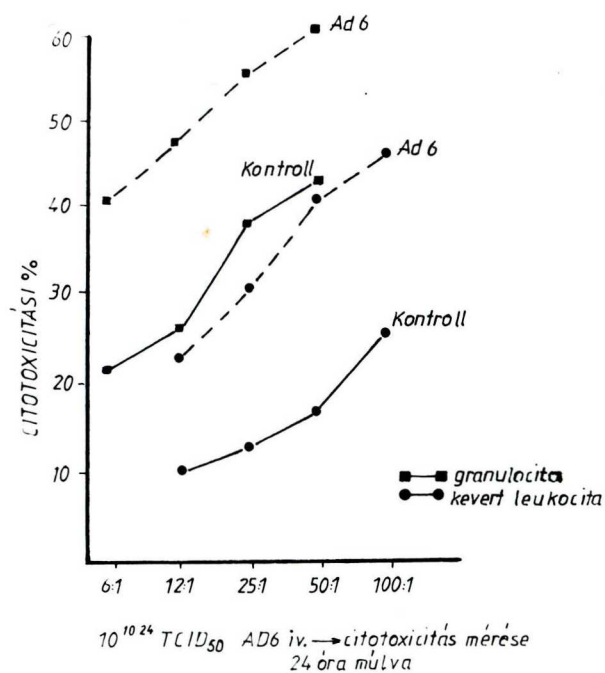
ható-e (11. ábra). Ezért összehasonlítottuk az ugyanabból a vérből nyert fehérvérsejtek és a további tisztításkor nyert granulociták aktivitását 6. típusúval való oltást követően. Látható, hogy az oltást követő 24. órára a citotoxicitás jelentősen emelkedik, de a granulocitáké lényegesen magasabb, mind a kontroll, mind az oltott állatok esetében. Megfigyelhető viszont, hogy a szeparálatlan fehérvérsejteknél is és a tisztított granulocitáknál is a stimulációnak a kontrollhoz viszonyított értéke közel azonos (3 kísérlet átlaga).

5. Az adenovírus fertőzés hatása a kvalitatív vérképre

Az ip. vírusoltást ($10^{7,5}$ TCDI₅₀ az adenovírus 12.-ből vagy $10^{10,5}$ TCDI₅₀ az adenovírus 6.-os vírusból) megelőzően, valamint az oltást követő napokban meghatározott időközökben az állatok szárnyvénájából vett néhány csepp vérből vizsgálatot végeztünk, hogy a vírusoltást milyen vérképbeli változások követik. A fehérvérsejteket Natt-Herrick festékkel festettük majd Bürker kamrában számláltuk, a kvalitatív vérképet pedig May-Grünwald Giemsa festéssel készített keneteken állapítottuk meg. Az oltást követő 3-4. naptól leukocitózist tapasztaltunk. Az oltást követő 24. órában granulocitózis következett be átmeneti limfocitopéniával, amely csak a 48. óra körül normalizálódott. Ezt azután limfocitózis követte, amely csak lassan tért vissza a normál állapotra (12. ábra). Az ábrán a 12. típusúval történt oltás utáni eredmények láthatók.

11. ábra.

Adenovírus hatása a spontán citotoxikásra különböző fehérvérsejtpopulációk alkalmazása esetén.



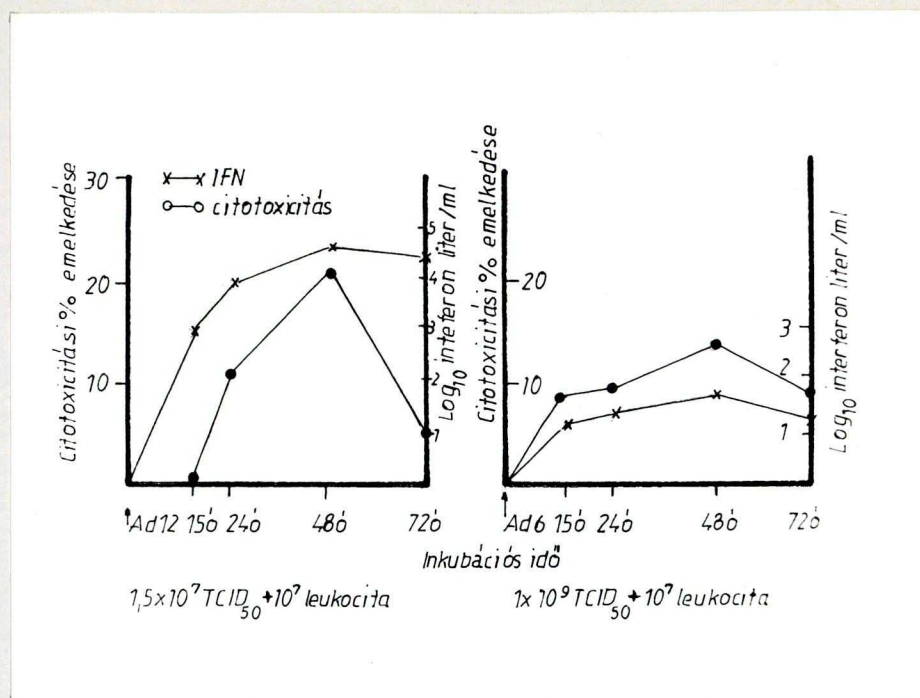
12. ábra. Humán adenovírus hatása a perifériás fehérvérsejtszámra csirkékben.

● granulocita % ○ fehérvérsejtek (n=8)

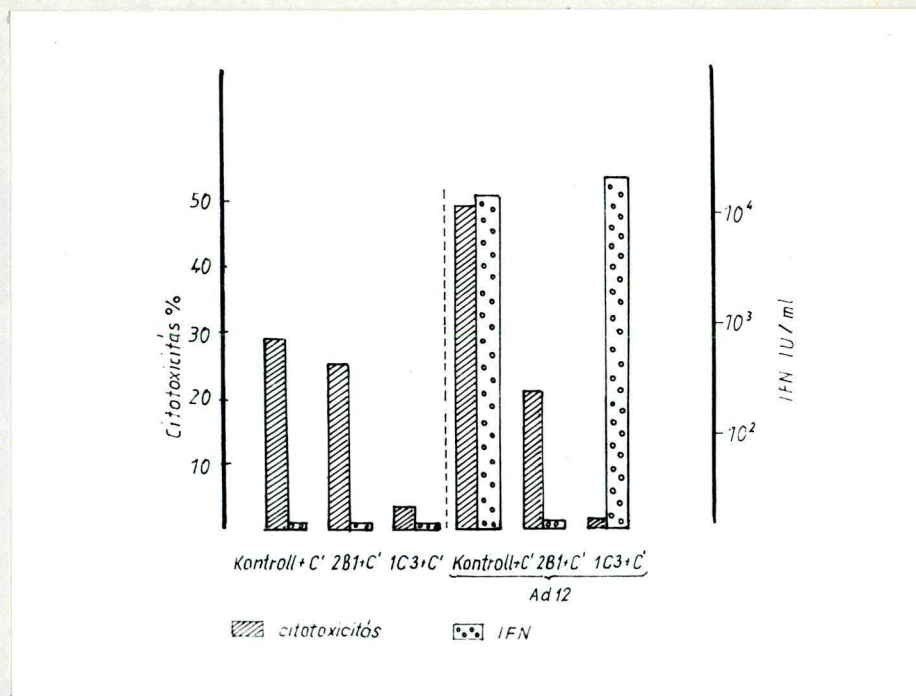
A 6.-os típusnál kisebb eltérésekkel hasonlóak voltak a tapasztalatok.

6. Az adenovírusok által kiváltott interferon indukció és a citotoxicitás stimulációjának összefüggése

Az adenovírusok okozta citotoxicitás növekedés feltehetően nem a vírus direkt hatása, hanem interferon indukción keresztül következik be. A stimuláció időrendileg jól követi az interferon szint maximumát, és nem véletlen, hogy a jobb interferon inducernek bizonyuló adenovírus 12. típus nagyobb mértékű stimulációt okoz. Mindezek tanulmányozására az *in vitro* körülmények bizonyultak a legmegfelelőbbnek. A perifériás vérsejteket *in vitro* körülmények között inkubáltuk tisztított adenovírus jelenlétében. Meghatározott (13. ábra) időközökben megállapítottuk a sejtek felülúszóinak interferon tartalmát, és a citotoxikus aktivitást. A vírus indukálta interferon mennyisége paralell növekedett a citotoxicitás mértékével. A 12. típusú humán adenovírus jobb interferon inducernek bizonyult, így feltehetően ennek tulajdonítható a magasabb szintű citotoxicitás stimuláció. A vírus valószínűleg a limfocitákat indukálja interferon termelésre, amely viszont pozitív irányba modulálja a granulociták citotoxicitását. Ezt látszik bizonyítani az a kísérlet is, amelyben az 1 percig 56 °C-on hőinaktivált adenovírus elveszítette interferont indukáló képességét és ezzel párhuzamosan a citotoxicitás stimulációja is elmaradt a kont-



13. ábra. Adenovírussal fertőzött fehérvérsejtek interferon termelése és természetes citotoxicitása.



14. ábra. Monoklonális ellenanyagok hatása a fehérvérsejtek citotoxicitására és az interferon termelésre adenovírus fertőzést követően.

roll értékekhez viszonyítva. A korábban leírt 1C3-as monoklonális ellenanyag és komplement segítségével a citotoxicitásért felelős granulocitákat ki lehetett zárni a rendszerből, de az adenovírusok hatására termelődő interferon szint változatlan maradt (14. ábra). A másik monoklonális ellenanyag (2B1) segítségével, amely monocita és burzális sejtekkel reagált, kizárhatók voltak az interferon termelésért felelős sejtek. A 2B1 és komplement toxikus hatásán keresztül eliminálta a interferont termelő sejtek így a granulociták stimulációja elmaradt a vírusfertőzés hatására (14. ábra). Ez bizonyította, hogy a granulociták a csirke esetében nem vesznek részt az interferon termelésben, a spontán citotoxicitásban viszont effektor sejként szerepet játszanak.

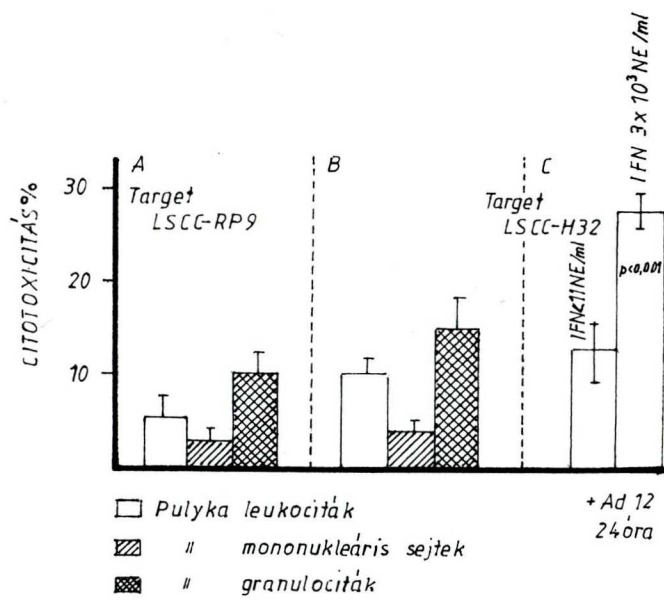
7. Pulykák natural killer aktivitásának vizsgálata

A csirke rendszer vizsgálata után kíváncsiak voltunk, vajon más szárnyas faj esetében is igaz, hogy a granulociták játsszák az effektor szerepet a natural killer aktivitásban. Ezért választottunk egy nagyobb testű szárnyast, a pulykát, amely bár a csirkékkel azonos rendbe (Galliformes) tartozik, de földrajzi elkülönülésük miatt jelentősen divergálódtak a törzsfejlődés folyamán. A csirkékhez hasonlóan ebben a rendszerben is összehasonlítottuk a granulociták és a mononukleáris sejtek citotoxikus aktivitását, valamint vizsgáltuk az humán adenovírusok *in vitro* stimuláló hatása és az interferon termelődés összefüggé-

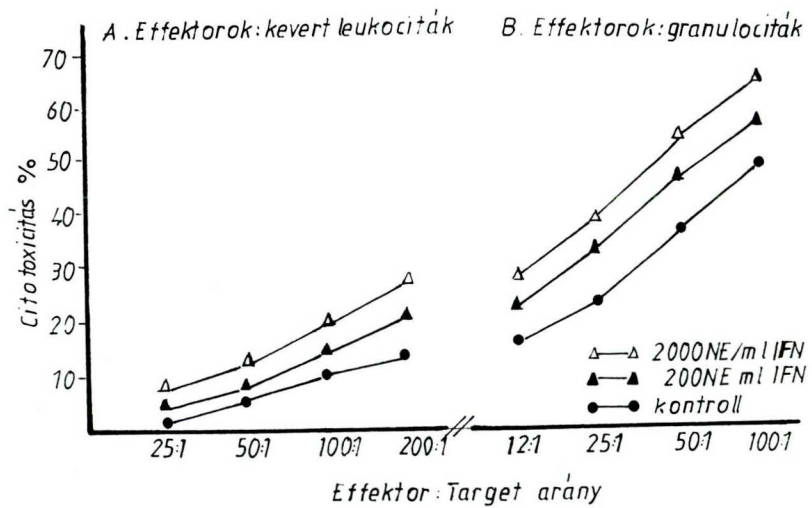
sét. A kapott eredményeket a 15. ábra mutatja. A csirke rendszerhez viszonyítva szerényebb citotoxicitást kaptunk, de itt kell megemlítenünk, hogy a target sejtként felhasznált sejtvonalak csirke eredetűek voltak. A két target sejt közül ezúttal is az LSCC-H32-es jelű bizonyult érzékenyebbnek, különösen a granulocitákban feldúsított frakcióval szemben. Az adeno 12. vírussal ($10^{7,5}$ TCDI₅₀) a csirkéhez hasonlóan 1×10^7 fehérvérsejt szuszpenziót fertőztünk, majd a meghatározott inkubációs idő után vizsgáltuk a citotoxikus aktivitást és a sejtek felülúszóinak interferon tartalmát. Megállapítottuk, hogy a citotoxicitás 24 órán belül jelentősen növekedett és ezzel párhuzamos interferon termelődés (átlagosan 3×10^3 NE/ml) indult meg (öt kísérlet átlageredményei).

8. Adenovírus fertőzés hatása a humán limfociták citotoxicitására

A humán rendszerben *in vitro* körülmények között vizsgáltuk az adenovírusok hatását a citotoxicitásra. A perifériás vérből mononukleáris sejteket izoláltunk, melyeket 1×10^7 /ml számban fertőztünk $10^{4,5}$ - $10^{7,5}$ TCDI₅₀ mennyiségű tisztított humán 12. adenovírussal 24-72 órán keresztül, majd meghatároztuk a felülúszók interferon tartalmát és a sejtek K562 target sejttel szembeni citotoxicitását. A vírus nem indukált interferont a humán mononukleáris sejtekben *in vitro*, és az NK aktivitást sem fokozta. A tisztítatlan (a fiberek és az irodalom szerinti interferon-



15. ábra. Pulyka leukociták természetes citotoxicitása. Humán adenovírus hatása a citotoxicitásra.



16. ábra. Csirke interferon hatása a spontán citotoxicitásra in vitro.

dependens citotoxicitást moduláló vírusspecifikus glikoproteidek nagyobb valószínűséggel épen maradtak) víruspreparátum felhasználásával ($1 \times 10^{2,5}$ – $1 \times 10^{4,5}$ TCDI₅₀ vírus 1×10^7 limfocitát fertőzve) nem kaptunk sem interferon indukciót, sem citotoxicitás növelő hatást. Így kimondhatjuk, hogy a humán adenovírus *in vitro* nem indukál interferont a humán mononukleáris frakciókban és NK aktivitásukat sem stimulálja.

9. Az interferonok hatása a csirke NK aktivitásra

Az interferonokat az emlős rendszerekben általánosan mint citotoxicitást stimuláló anyagokat írják le. Az előzőekben leírt kísérleteink során csirke rendszer esetében csak az adenovírusok által indukált interferon hatását vizsgáltuk. A következő fejezet az interferonok direkt hatásának kísérletei eredményeit mutatja be.

10. A csirke interferonok hatása az NK aktivitásra az effektor sejtek kezelése esetén

A szeparált csirke leukocitákat és a további szeparálás során nyert granulocitákat 5×10^6 sejt/ml-re állítottuk és 18 órán keresztül nyers csirke leukocita interferonnal kezeltük elő, majd teszteltük citotoxikus aktivitásukat. Az interferon kezelés az alkalmazott koncentrációtól függően a citotoxicitás emelkedéséhez vezetett (16. ábra). A citotoxicitás százalékos értékei a tisztított

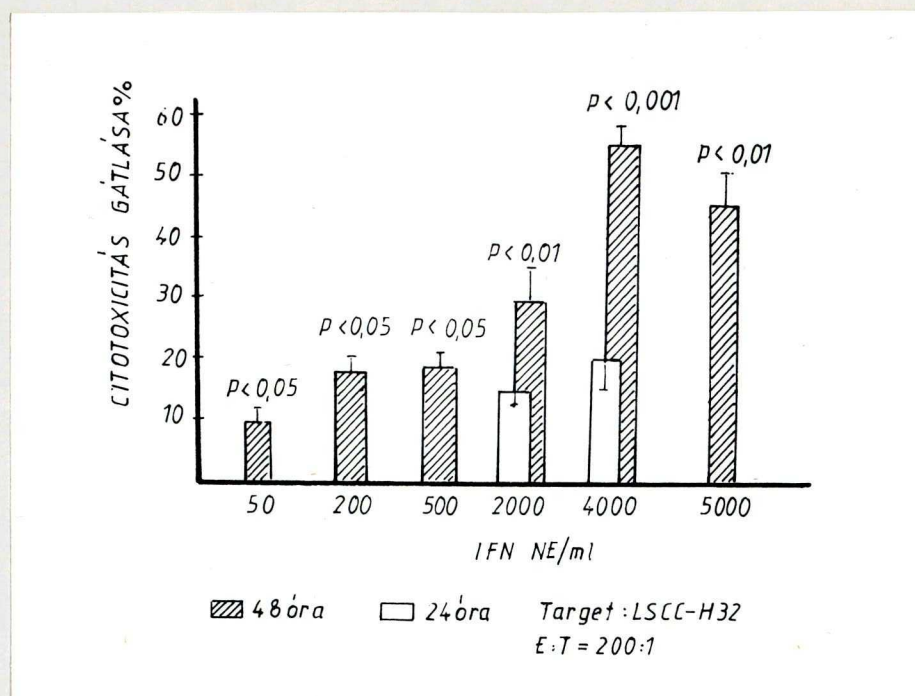
granulociták esetében természetesen magasabbnak bizonyult.

11. Az interferonok hatása az NK aktivitásra a csirke target sejt előkezelése esetén

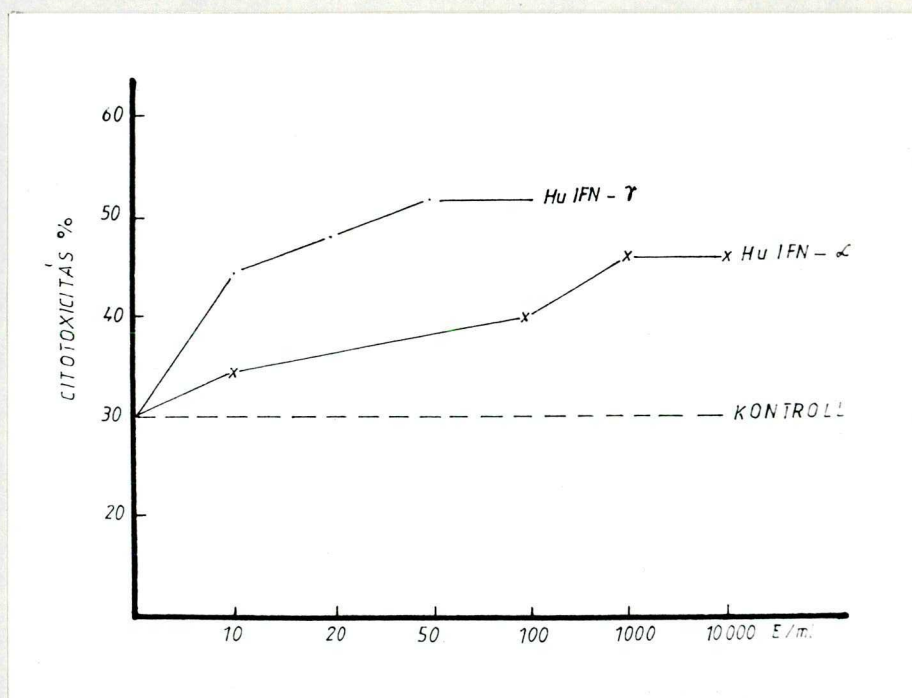
Azon irodalmi hivatkozások alapján, melyek szerint a humán rendszerben az interferon a target sejt előkezelésének hatására kevésbé válik érzékennyé az effektor sejtek által mediált citolízisre, felmerült a kérdés, vajon ez a tapasztalat érvényes-e a csirke rendszerben is. Az LSCC-H32 target sejtek passzálásakor a tripszinezés után 2×10^5 /ml-el újra indítottuk a tenyészeteket, amelyeket a későbbiekben különböző mennyiségű csirke leukocita interferon jelenlétében a meghatározott idejű előkezelés után target sejtként használtunk a citotoxikus reakcióban. Az 17. ábrán látható, hogy a 24 és 48 órás inkubáció után jelentősen csökkent a citotoxicitás szintje az interferon koncentrációtól függően.

12. Az interferonok in vitro hatása a humán NK aktivitásra

Az Intézetünkben előállított interferon készítmények (HuIFN- α és HuIFN- γ) felhasználásával az interferonoknak a humán NK aktivitásra in vitro kifejtett hatását tudtuk tanulmányozni. A tisztítatlan készítmények 18 órás előinkubációban való felhasználása esetén mindkét interferon



17. ábra. Csirke interferon hatása a target sejt érzékenységére spontán citotoxicitási reakcióban.

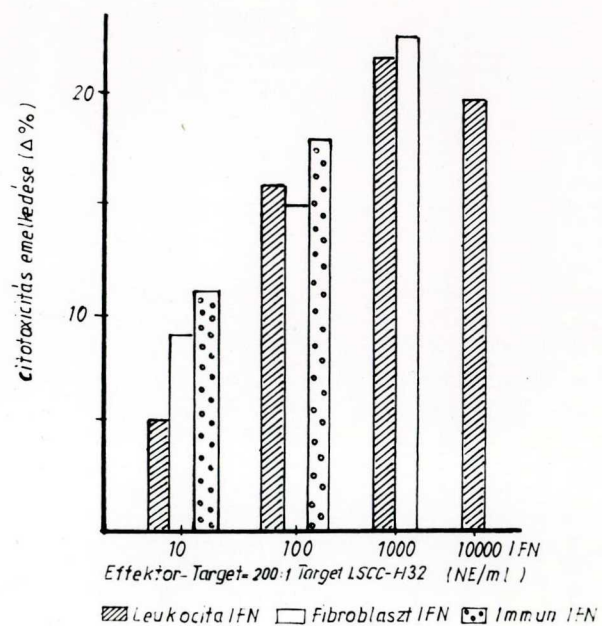


18. ábra. Humán IFN- α és IFN- γ hatása az NK aktivitásra.

típus jelentősen fokozta a human NK aktivitást, bár a HuIFN- γ stimuláló hatása kifejezettebb volt: ugyanolyan mértékű citotoxicitási % eléréséhez 100x több nyers HuIFN- α -át kellett a sejt szuszpenzióhoz adni, mint nyers HuIFN- γ -át. Az 18. ábrán látható eredmények 3 kísérlet átlagából származnak. Az Intézetünk munkatársai által kidolgozott interferon tisztítási eljárásoknak köszönhetően rendelkezésünkre álltak olyan tisztított készítmények, amelyek nagyobb specifikus aktivitással rendelkeztek. Az előkezelés hatására azt tapasztaltuk, hogy a 1×10^6 NE/mg fehérje aktivitású HuIFN- α és az 1×10^5 NE/mg fehérje specifikus aktivitású HuIFN- γ az antivirális egységekre vonatkoztatva közel azonos stimuláló hatást fejtett ki, tehát a nyers interferon készítményeknél tapasztalt különbség hozzávetőlegesen itt nem érvényesült (III. táblázat). A tisztított készítményeknél egy óra előinkubáció is elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy minden effektor:target arány esetén jól kimutatható stimuláció következzen be. Az 19. ábrán látható, hogy az interferonok stimuláló hatása koncentráció-dependens, de csak egy bizonyos koncentrációig, ahol már telítődés következik be. A kontroll értékeknél általában egy 33 %-os citotoxicitást 50:1 effektor:target aránynál tudtunk elérni, míg a 15 NE/ml HuIFN- α -val 12:1, az 1000 NE/ml HuIFN- α -val való előkezelésnél pedig 6:1 arány is elegendőnek bizonyult a kontroll értéknek megfelelő citotoxicitás eléréséhez (20. ábra). Az egészséges véradóktól származó vérmintáknál a citotoxicitás és az interferonra adott válasz természetesen egyedek

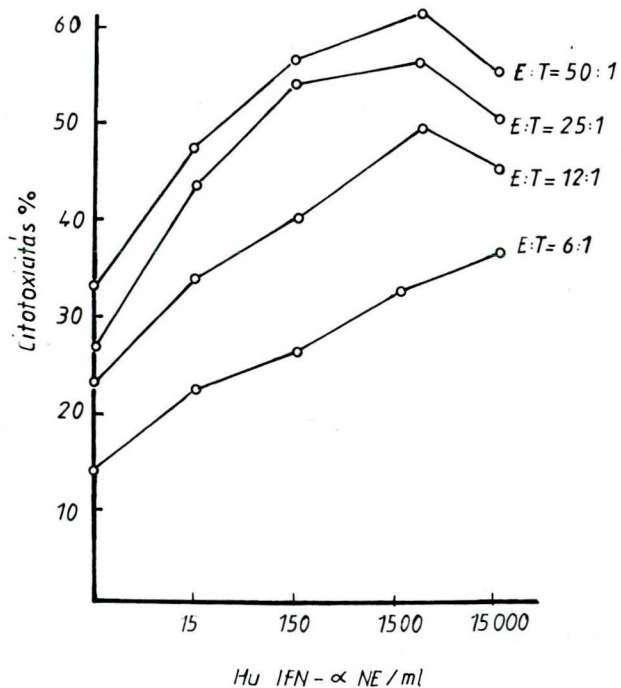
19. ábra.

Tisztított csirke interferonok hatása a spontán citotoxicitásra.



20. ábra.

Tisztított HuIFN- α hatása az NK aktivitásra.



III. Táblázat

HuIFN- α * és HuIFN- γ * hatása az NK akti-
vításra

Effektor előkezelés	Citotoxicitási %**	
	1 óra	18 óra
-	52	41
HuIFN- α	94	71
HuIFN- γ	90	64

* 200 NE/ml ** E:T=50:1

IV. Táblázat

Humán limfociták és granulociták spontán citotoxi-
kus aktivitásának vizsgálata 4 órás ^{51}Cr felszaba-
dulási tesztben.

Target sejt	Citotoxicitási %* E:T=50:1	
	Limfociták	Granulociták
K 562	33,0 $\pm$ 5,2	3,1 $\pm$ 0,6
HEp-2	29,0 $\pm$ 4,1	1,5 $\pm$ 0,9
293	28,0 $\pm$ 2,1	0,7 $\pm$ 0,2
YAC-1	2,8 $\pm$ 1,0	1,3 $\pm$ 0,3
LSCC-H32	0,7 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,4
LSCC-RP9	1,2 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,2

* Három kísérlet átlagértékei $\pm$ SD



szerinti eltérést mutatott az irodalomban leírtaknak megfelelően (Pross és Baines 1982)

13. A humán és a csirke granulocita funkciók összehasonlítása

Az előző eredmények alapján úgy tűnt számunkra, hogy a csirke granulociták az emlősökétől erősen eltérő funkciókkal rendelkeznek, hiszen az emlősöknél az LGL sejtek által mediált NK funkciót úgyszólván "átvállalták". A további kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy vajon az egyéb funkcióknál is tapasztalható-e a kétféle eredetű granulocita között eltérés. Először megvizsgáltuk, hogy a humán granulociták a rövid 4 órás citotoxicitási tesztben mutatnak-e aktivitást, majd mindkét rendszernél az oxidatív metabolizmus működését vizsgáltuk.

14. Humán granulociták NK aktivitásának vizsgálata

Az egészséges véradóktól nyert vérből mononukleáris sejteket és granulocitákat szeparáltunk két fázisú Percoll gradiensen, majd mindkét frakciót 4 órás ^{51}Cr release tesztben mint effektor sejtet felhasználtuk a IV. táblázatban látható target sejtekkel szemben. Az effektor sejtek egy részét előinkubáltuk 1000 NE/ml HuIFN- α vagy HuIFN- γ -val 1-18 óráig terjedő időtartamban. Az eredmények kiértékelésénél azt tapasztaltuk, hogy csak a humán mononukleáris sejtek bizonyultak aktívnak, és még az in-

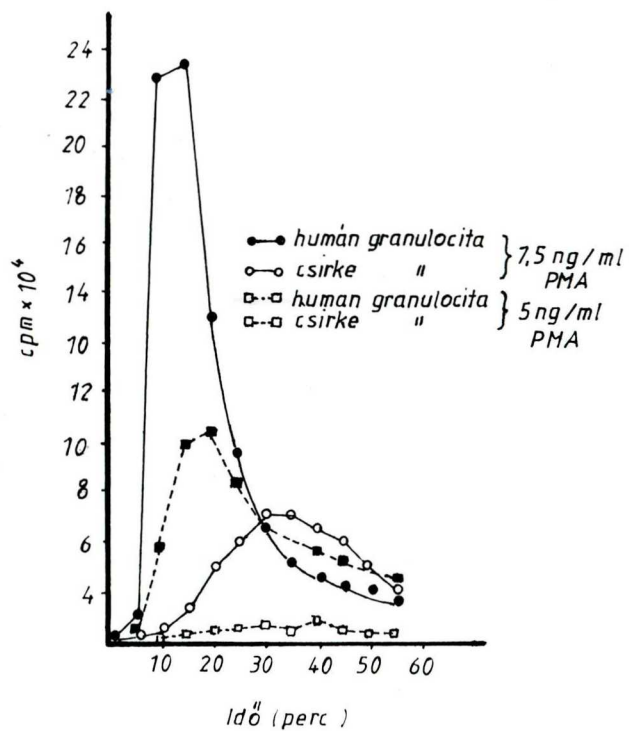
terferon előkezelés sem aktiválta az NK aktivitásban néma granulocitákat.

15. Humán és a csirke granulociták chemilumineszcenciájának összehasonlítása

Az emlősöknél a granulociták aktiválásakor az oxidatív metabolizmus termékei okozzák a citolízist. Ezek a termékek azonban eltérnek az emlős mononukleáris sejtek NK aktivitásának citolítikus mediátoraitól, amelyeknek egy része valószínűleg az arachidonsáv lebontásánál lipoxigenáz hatására alakul ki. Az LGL sejtek NK aktivitásában ugyanakkor nem vesznek részt az oxidatív metabolitok. Megvizsgáltuk, vajon a csirke granulocitáknál a citotoxikus folyamat kapcsolatba hozható-e az oxidációs folyamatokkal, és az egyéb funkciókban hűek maradnak-e a humán granulocitákhoz. A humán granulociták oxidatív metabolizmusának vizsgálatára a jól bevált chemilumineszcencia (CL) módszert alkalmaztuk. A granulociták mobilizálódásakor a hexóz monofoszfát shunt aktiválódik, reaktív gerjesztett oxigén metabolitok keletkeznek (H_2O_2 , O_2^- , OH^- , $\cdot O$), amelyek egy része alapállapotba jutásakor chemilumineszcenciás fényvillanásokat bocsát ki (Allen és mtsai 1972). A rendszerhez adott luminol fotonerősítő szerepet játszik, s így a CL jól mérhetővé válik. Az emlős granulociták oxidatív burstjének legjobb aktivátorai a tumor promoter phorbol-észterek (DeChatelet és mtsai 1976). Az aktiváció következtében keletkező aktív oxigén mediátorok elpusztít-

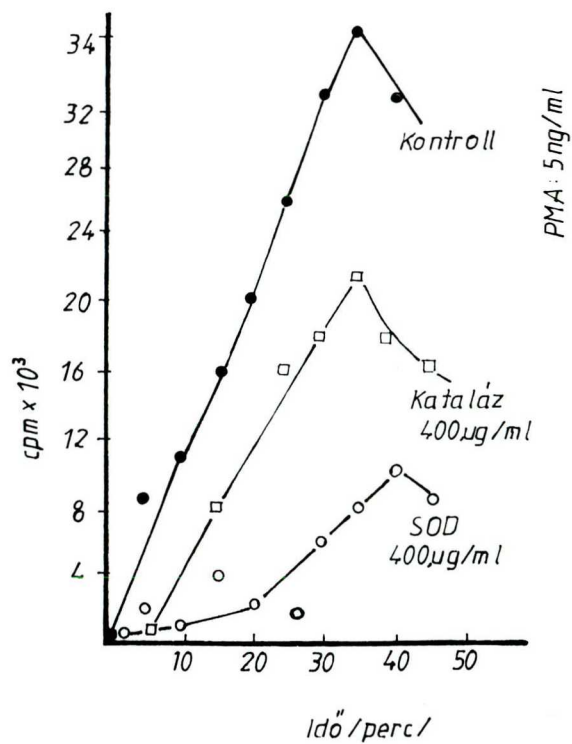
21. ábra.

Humán és csirke
granulociták ke-
milumineszcenciá-
jának összehason-
lítása .



22. ábra.

Kataláz és SOD
hatása a humán
granulociták PMA
(5 ng/ml) által
aktivált kemilu-
mineszenciájára.



ják a különböző target sejteket és a fagocitált partikulákat. Az oxidatív burst aktiválása igen rövid idő alatt következik be és a fent már említett gyökök felszabadulása miatt chemilumineszcenciával társul (Westrick és mtsai 1980, DeChatelet és Shirley 1982). A kísérletek folyamán a PMA-val stimulált csirke és humán granulociták CL aktivitását hasonlítottuk össze. Az 21. ábrán jól látható, hogy azonos mennyiségű (5×10^6 /ml) sejtet azonos koncentrációjú PMA-val aktiválva a csirke granulociták CL aktivitása jelentősen elmaradt a humán granulocitáké mellett. Az humán granulociták kinetikájának lefutása időben lényegesen lassúbb és elnyújtottabb volt. A PMA-val történő aktiválás nélkül a kontroll értékek a humán granulocitáknál néhány ezres, a csirke granulocitáknál csak egy-két száz cpm értéket mutatott. A csirke granulocita a target sejt ként használt LSCC-H32 hozzáadásával nem mutatott CL aktivitást.

16. A SOD, a kataláz, és a PMA hatása a csirke granulociták CL aktivitására

Kísérleteink során a csirke granulocitákkal végzett CL vizsgálatoknál kismértékű aktivitást tapasztaltunk, ezért megvizsgáltuk azt, hogy a CL-át okozó oxidatív gyökök szerepet játszanak-e a csirke granulocita mediálta NK aktivitásban. Az effektor sejteket a SOD (szuperoxid dizmutáz) 100-400 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációival előkezeltük. Megfigyelésünk szerint sem az 5 perces, sem az 1 órás előkezelés

nem okozott változást a citotoxicitás mértékében. A PMA 5, 10, és 100 ng/ml koncentrációi stimuláló hatást nem fejtettek ki, ennél nagyobb koncentrációkban pedig inkább csökkenést váltottak ki.

Mivel a csirke granulociták CL szintje igen alacsony volt az aktiválás hatására is, ezért a humán granulociták CL aktivitásában ellenőriztük az ágensek biológiai hatékonyságát. Kísérleteink eredményei szerint mind a SOD (70 %-ban), mind a kataláz (40 %-ban) nagy mértékben csökkentette a humán granulociták CL aktivitását (22. ábra). Ennek alapján úgy tűnik, hogy a szuperoxid anionnak nagyobb szerepe van a CL-ban, mint a H_2O_2 képződésnek.

A fenti kísérletekből bizonyosnak látszik, hogy a csirke granulociták NK-szerű citotoxicitása nem az oxidatív burst aktiválásán alapul. A humán granulociták semmiféle aktiválás (IFN és előinkubáció) hatására sem fejtettek ki ilyen rövid idő alatt érvényre jutó citotoxicitást, viszont igen aktív CL kibocsátására képesek, ami viszont a csirke granulocitáknál lényegesen gyengébb.

VII. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

1. A szárnyas periferiás granulociták citotoxicitása

A kísérletek folytán sikerült azonosítani a csirke natural killer aktivitás effektor sejtjeit, amelyek a humán rendszertől eltérően a granulocitáknak feleltek meg. A spontán citotoxikus reakcióban sem a limfociták, sem a további szeparálási folyamat után nyert izolált LGL sejtek nem bizonyultak citotoxikusnak a kísérletekben használt target sejtekkel szemben. A granulociták gyors, 4 óra inkubációs idő alatt lezajló aktivitása nem igényelt előzőleges stimulációt, hasonlóan az NK reakciókban tapasztaltakhoz. Bár a csirke granulociták ADCC reakciót is mediálnak, ez esetben nem erről a reakció típusról volt szó. Ennek kizárására kísérletek során foetalis borjuszavót használtunk, amelyben az előforduló ellenanyagok a faji restrikció miatt nem kötődnek az effektor sejtek Fc receptoraihoz (Imir és mtsai 1977). Más módon is igazolható volt ez a feltevés, ugyanis a humán kísérleti rendszerhez hasonlóan (Bundy és mtsai 1980; Perussia és mtsai 1979), csirkékben az effektor sejtek tripszin előkezelése az NK receptorokat eltávolítva csökkentette az NK aktivitást, ugyanakkor mivel az Fc receptorok tripszin rezisztensek ezért az ADCC reakciót nem befolyásolta. Így elmondható, hogy a csirke granulociták gyors spontán citotoxicitása a humán illetve az emlősök LGL sejtjeinek NK aktivitásához hasonlónak tűnik.

További bizonyítékot szolgáltatott a granulociták effektor mivoltához az 1C3-as jelű granulocita-specifikus monoklonális ellenanyag használata, amely szignifikánsan ($p < 0,001$) csökkentette az NK aktivitást, bár megjegyzendő, hogy nem 100%-os mértékben. Hasonló kísérleteknél az emlős rendszerben hasonló mértékű gátlást írtak le (Nieminen és mtsai 1982; Rumpold és mtsai 1982), ennek több magyarázata lehet: vagy sztérikus ok miatt a nagyobb sejtszám előkezelésénél (1×10^7 /ml sejtet kezelünk elő) az ellenanyag nem tudja befedni az összes sejtet, vagy pedig az effektor sejtek elpusztulásával sejttoxikus anyagok szabadulnak fel, elpusztítva a target sejtek egy részét. Ezen okok mellett természetesen a granulociták érettségi foka is eltérő lehet. Az ellenanyag komplement hozzáadása nélkül is képes volt a citotoxicitást blokkolni, ami valószínűsíti, hogy esetlegesen az NK aktivitásban fontos szerepet játszó receptorokhoz kötődnek.

A pulyka granulociták ugyancsak aktívnak bizonyultak a használt csirke target sejtekkel szemben, bár kisebb mértékben. Ennek oka egy bizonyos szintű faji inkompatibilitás lehet, hiszen az effektor és a target sejt azonos szárnyas családba tartozó két különböző fajból származik. Ebből az eredményből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy valószínűleg a granulociták spontán citotoxicitása nem csak egy-egy szárnyas fajra, hanem az egész Aves osztályra kiterjedhet.

Fleischer (1980) a spontán citotoxicitásban nagy fajszámú adherens sejteket tartott effektoroknak, de nem azonosította őket. Sharma és Okazaki (1981) LSCC-RP9 target sejtekkel szemben szeparált lépsejteket talált aktívnak. A szeparálást 1,090 sűrűségű Ficoll-Uromiron végezték, amely granulocitákkal kontaminált lehetett (1,085-ös réteg granulocitákkal kontaminált már!). Bár a granulociták aránya a lépben kisebb mint a perifériás vérben a 400:1 effektor:target arány kielégítő szintű citotoxicitást nyújtott.

2. Humán adenovírusok hatása a csirke natural killer aktivitásra

A humán adenovírus oltás csirkékben stimulálta az NK aktivitást, de a citotoxicitás emelkedése 24 órás időintervallumon belül lezajlott. A gyors alapszintre való visszatérés oka az lehet, hogy a humán adenovírusok nem szaporodnak szárnyasokban. Intézetünkben végzett korábbi munkákból (Pusztai és mtsai 1969; Béládi és mtsai 1979) ismeretes, hogy az adenovírus oltást követően az interferon szint az állatok szérumában az első 8-10 órában tetőzik. Valószínűleg az a tény, hogy a 12. típusú vírus a 6. típusúnál jobb inducernek bizonyult, annak tudható be, hogy a két vírus közül a 12. a jobb IFN inducer (Mucsi és mtsai 1970; Béládi 1979) Az oltási kinetikát követve azt tapasztaltuk, hogy a citotoxicitás az oltást követő 3-4 napon a kontroll szint alá csökkent és csak a

10-14. napon tért vissza az eredeti értékre. A szupresszált granulocita funkció az emlősökben megfigyelt mechanizmusokhoz hasonlít, amely szerint a vírus fertőzést egy idő után elégtelen granulocita működés követi. Az adenovírus maga is immunoszipresszívnek bizonyult csirkékben (Béládi és mtsai 1979; Béládi 1979), de lehetséges hogy ez az interferon hatásának tudható be. Einhorn IFN terápiát követően átmeneti granulocita aktiváció után egy visszaesésről számolt be (Einhorn és mtsai 1984). A csirke rendszerhez hasonlóan a humán granulociták is aktiválódnak átmenetileg, de citotoxikus hatásuk nincs. Jarstrand pl. influenza A fertőzés után közvetlenül fokozott NBT redukciót figyelt meg. *In vitro* ezt az IFN kezelés után is megfigyelték (Jarstrand és Einhorn 1983).

A citotoxicitás emelkedésének adenovírus oltást követően több oka is lehet. Az oltást követő 24 órában a perifériás vérképben jelentős granulocitózist figyelhető meg, de lehetséges, hogy a granulociták citotoxikus kapacitása növekedett, mivel az *in vitro* kísérletek eredményei azt mutatják, hogy azonos granulocita szám esetén is emelkedett citotoxicitás volt tapasztalható.

In vivo pedig valószínű, hogy az NK aktivitás emelkedése a két hatás együttes eredője lehet. Az IFN hatásánál leírták, hogy az LGL sejtek proliferációját okozza (Testi és mtsai 1986). A szupresszált citotoxikus állapot beállása előtt granulocitopéniát észleltünk, amely egyrészt lehet egyedüli okozója a szuppressziónak, vagy pedig a

vírus közvetlen, ill. a vírus által termelt IFN hatásának tudható be (megjegyzendő, hogy a kvalitatív vérkép változásai csak hosszabb idő alatt stabilizálódtak mint a csökkent citotoxikus funkció).

A vírusfertőzések legtöbbször limfocitózist okoznak, de egyes fertőzések korai szakaszában a perifériás limfocitaszám csökkenését írtak le (Nász és Kulcsár 1978). Azokban az esetekben, ahol a vírusfertőzés korai szakaszában limfocitopénia és granulocitózis következik be, ott valószínű, hogy ez a jelenség a vírus által indukált interferonnak köszönhető. Az interferon a vérképre kifejtett direkt hatását Degré 1974-ben írta le nem toxikus cirkulációs hatásként. Az adenovírus fertőzések esetében Dascomb és Hilleman (1956) átmeneti granulocitopéniát írt le.

3. Az interferonok szerepe a citotoxicitás fokozásában

Ismert tény, miszerint csirkékben a humán adenovírusok interferont indukáló hatással rendelkeznek, így ez igaz az általunk használt citotoxicitási rendszerben is. Ezt a két állítást az *in vivo* kísérletek kinetikája támasztja alá, valamint az a megfigyelés, hogy *in vitro* a hőinaktivált vírus nem indukált interferont, s nem vált ki ezzel együtt citotoxicitás emelkedést sem. A stimulációhoz szükséges interferon jelenlétét monoklonális ellenanyagok felhasználásával lehetne a legmeggyőzőbben bizonyítani. A kísérletek eredményei alapján megállapított-

tuk, hogy az adenovírus direkt módon nem, csak az indukált interferonon keresztül váltotta ki a granulociták stimulációját.

Az IFN-dependens hatás a pulyka citotoxicitásban szintén érvényesült. *In vitro* az adenovírus hatására kisebb mértékben ugyan de IFN termelődés indult meg, amely a citotoxicitás emelkedését is maga után vonta.

4. Az adenovírus hatása a humán limfociták NK aktivitására

A kísérletekben alkalmazott K562, jó target sejt lévén, igen érzékenynek bizonyult a humán NK effektor sejteket érő moduláló hatások kimutatására. Így állapítottuk meg pl. az *in vitro* IFN kezelés serkentő hatását. Az adenovírusok *in vivo* NK stimuláló hatásáról nincs irodalmi adatunk. *In vitro* körülmények között, mind az interferon indukció mind az NK stimuláció elmaradt. Az a tény, miszerint az interferon termelődés elmaradt, megerősíti azt az állítást, hogy a vírus direkt módon nem stimulálja az NK aktivitást. Azt a megállapítást, hogy a humán adenovírusok nem indukálnak az emlős sejtekben interferont korábban több szerző is leírta már (Béládi és Pusztai 1967; Armstrong 1968; Béládi és mtsai 1970; Béládi 1979).

5. Az interferon hatása az NK aktivitásra csirkékben

Tisztított interferon készítményeket használva, mind a fibroblaszt, mind a leukocita és a mitogén indukált interferon hasonló mértékű NK emelkedést váltott ki. Taródi (1989) feltételezte, hogy a csirkékben a három interferon típus nem különbözik olyan mértékben egymástól mint az emlős rendszerekben. Az interferon target sejt előkezelése, az emlős citotoxicitási rendszerben tapasztaltakhoz hasonlóan, csökkenti a target sejtek lízissel szembeni érzékenységét, így egyfajta targetvédő hatást fejtenek ki. Ez a jelenség a monocita citotoxicitás esetében nem jelentkezik, mivel az interferonnal történő target sejt előkezelés nem csökkentette a cél sejtek érzékenységét (Feinman és mtsai 1986). Ez az *in vitro* körülmények között az LGL és a granulociták esetében jelentkező protektív hatás *in vivo* érvényesülése nem ismert.

6. A humán és szárnyas NK aktivitás összehasonlítása

A két rendszer közötti alapvető különbséget az effektor populációkban tapasztaltuk. Míg az emlősöknél általános végrehajtó sejtekként az LGL sejtek váltak közismertté, így ezért meglepetést okozott az a felismerés, hogy a csirkékben és a pulykáknban (és talán egyéb madár fajokban is) ugyanezt a gyorsan lezajló, előzőleges aktivá-

lást nem igénylő funkciót a granulociták úgyszólván "átvállalták" az ADCC reakciót továbbra is nyújtó LGL sejtektől. A csirkékben a granulocita/mononukleáris sejt arány az emlősökétől jelentősen eltér, a granulociták a perifériás sejteknek csupán 20-25 %-át alkotják (Lucas és Jamroz 1961.). Az emlős granulocitákhoz viszonyítva bár fagocita funkciójukat továbbra is megőrizték- a csirke granulociták oxidatív folyamatokat támogató enzim-rendszere hiányosabb. Nincs mieloperoxidáz (MPO) rendszerük (Penniall és Spitznagel 1975), alkalikus foszfatázuk, hiányzik a kataláz aktivitásuk is (Bellavite és mtsai 1977), és csak kis mértékben termelnek H_2O_2 -ot (Dri és mtsai 1979.). A glükóz oxidációban kulcsszerepet játszó GAPD (glükóz-6-foszfát dehidrogenáz) koncentrációja magas, így a fagocitózis során a hexóz-monofoszfát sönt (HMP) aktiválódása továbbra is megfigyelhető. Valószínű, hogy az említett okok miatt alacsonyabb a csirke granulociták CL aktivitása a humán granulocitákéhoz képest. A PMA a csirke granulociták CL-t is aktiválta, bár lényegesen kisebb mértékben mint a humán PMN sejtekét, és a granulociták citototoxikus aktivitása a PMA kezelés hatására sem növekedett. Így valószínűnek látszik, hogy a citotoxikus folyamatban a reaktív oxidatív metabolitok nem játszanak szerepet.

A citotoxicitás a humán NK reakció klasszikus mechanizmusát követheti, mivel hogy a H_2O_2 és az O_2 stb. felszabadulás elhanyagolható (Goldfarb 1986).

A toxikus oxidatív metabolitok felszabadulása inkább az aktivált humán granulociták jellemzője. A granulociták citotoxicitásának NK-szerűségét bizonyítja, hogy az IFN-nal történő target sejt előkezelés (LSCC-H32) csökkentette a lítikus hatással szembeni érzékenységüket, hasonlóan a humán rendszerhez.

A humán adenovírusokkal végzett kísérletekben a vírus az általa indukált IFN-on keresztül stimulálta *in vivo* és *in vitro* az NK aktivitást, mivel a 2B1 ellenanyag eliminálta az interferon termelő sejteket és így a citotoxicitás stimulációja is elmaradt (14. ábra). Az emelkedett aktivitás főleg a megnövekedett citotoxikus kapacitásnak volt köszönhető, bár az átmeneti granulocitózist sem szabad figyelmen kívül hagyni. Emlőszőknél a limfocitózis jelensége és a limfociták antivirális védelmében betöltött szerepe jól ismert. Ezzel szemben a granulocitáknak viszonylag kevesebb figyelmet szenteltek (Faden és mtsai 1984; Szanton és Sarov 1985). A csirke rendszerben az LGL sejtek az ADCC funkciót az NK funkcióval szemben megtartották. Ebben a filogenetikailag alacsonyabb rendszerben egyéb effektor sejt funkciók is megfigyelhetők: így pl. a trombociták. Ezek a sejtek csirkékben az adherens sejtpopuláció 90 %-át alkotják (Grecchi és mtsai 1980), és a véralvadásban betöltött szerepük mellett fagocita funkcióval is rendelkeznek. Kísérleti rendszerünkben a trombocitákat nem találtuk citotoxikusnak. A perifériás limfocita frakcióban az LGL sejtek kis számban vannak jelen, mérsékelt ADCC funkciót fejtenek ki, morfo-

lógiaailag hasonló a humán LGL sejtekhez. A granulociták ADCC aktivitásban való részvételüket az Fc-receptor pozitivitásuk is igazolja: Így a szárnyas granulociták az emlős NK sejtekhez hasonló funkciót látnak el, ugyanakkor tipikus granulocita funkciókkal is rendelkeznek. Az emlős LGL sejteknél leírták, hogy mind T, mind mieloid eredetű felületi markereket hordoznak, így eredetükben sok a vitatott kérdés (Trinchieri és mtsai 1984).

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérleteink során megállapítottuk:

I. Szárnyas perifériás fehérvérsejtek citotoxikus aktivitása:

1. A spontán citotoxicitás effektor sejtjeinek az LGL sejtek populációi helyett mind csirkék mind pulykák esetében a granulociták bizonyultak.
2. A granulocita-specifikus monoklonális ellenanyaggal történő effektor előkezeléssel során a spontán citotoxicitás felfüggeszthető.

II. Humán adenovírusok hatása a csirkék NK aktivitására:

1. A vírus *in vivo* 24 órán belül jelentősen stimulálja a spontán citotoxicitást.
2. A citotoxicitás korai, átmeneti stimulációjáért a granulociták fokozott aktivitása a felelős.
3. A stimulációt hosszan tartó (10-14 napos) szuppresszált időszak követi, amelynek letelte után tér vissza az eredeti kontroll érték.
4. A vírusoltás átmeneti granulocitózis eredményezett, amely után közvetlenül granulocitopénia és limfocitózis következett.
5. A citotoxicitás növekedését nem az adenovírus direkt hatása okozza, hanem a vírus által indukált interferon immunomoduláns hatásának eredménye.

Az interferon termelő sejtek *in vitro* monoklonális ellenanyagokkal történő eltávolítása a citotoxicitás alapszinten maradásához vezetett a vírusfertőzés ellenére.

6. A humán adenovírus *in vitro* a pulyka leukocita citotoxicitást is fokozta, az aktivitás növekedését itt is interferon indukció előzte meg. Az effektor sejtek azonosításakor ebben az esetben is a granulocitákat találtuk aktívnak.

III. Az IFN előkezelés hatása a szárnyas NK aktivitásra:

1. A csirke leukocita interferon stimulálta a granulociták citotoxicitását.
2. A tisztított csirke leukocita-, fibroblaszt-, és mitogén-indukált interferonok azonos mértékben stimulálták a citotoxicitást.
3. A target sejtet (LSCC-H32) 24-48 órán keresztül csirke leukocita interferonnal előkezelve csökkenthető volt a target sejtek lízissel szembeni érzékenysége.
4. A humán limfociták NK aktivitását *in vitro* mind az α , mind a γ interferon stimulálta. A γ IFN abban az esetben bizonyult hatékonyabb aktivátornak, ha tisztítatlan készítményeket alkalmaztunk.

IV. Csirke és humán granulociták néhány funkciójának összehasonlítása:

1. A humán granulociták nem képesek a humán LGL sejtekhez és a csirke granulocitákhoz hasonló citotoxikus aktivitást kifejteni.

2. A csirke granulociták képesek CL kibocsátására PMA aktiváció hatására, de ennek mértéke jelentősen elmarad a humán granulociták hasonló képessége mellett.
3. A csirke granulociták citotoxikus funkciója, hasonlóan a humán LGL sejtekéhez, nem az oxidatív metabolizmus aktivációján alapul.

Végső konklúzióként elmondhatjuk, hogy a csirke granulociták amellet, hogy humán LGL sejtek spontán citotoxikus aktivitását mutatják, tipikus granulocita funkciókat is ellátnak, mégha kisebb mértékben is.

Az a felismerés, hogy egy phylogenetikailag alacsonyabb rendű rendszerben az NK effektor sejt szerepét a granulociták játsszák, talán hozzájárulhat az LGL sejtek mieloid eredetének bizonyításához.

IX. IRODALOM

- 1./ Abo T.; Balch C.M.: A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1).
J. Immunol. 127. 1024. 1981.
- 2./ Allen R.C.; Stjernholm P.L.; Steele R.H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47. 679. 1972.
- 3./ Allavena P.; Introna M.; Mangioni C.; Mantovani A.: Inhibition of natural killer activity tumor-associated lymphoid cells from ascites ovarian carcinomas.
J. Natl. Cancer Inst. 67. 319. 1981.
- 4./ Armstrong J.A.: Interferon induction by adenovirus type 12 and the effect of interferon on the cytopathic replicative, cell transforming and oncogenic activities of the virus.
Doctoral Dissertation, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, 1968.
- 5./ Ausiello C.; Valeri M.; Piazza A.; Antonelli G.; Adorno D.; Casciani C.U.: Augmentation of natural killer activity during cytomegalovirus infection in one renal transplant recipient and one uremic patient.
Transplant Proc. XV. 1793. 1983.
- 6./ Bellavite P.; Dri P.; Bisiacchi B.; Patriarca P.: Catalase deficiency in myeloperoxidase deficient polymorphonucleare leukocytes from chicken.
FEBS Lett. 81. 73. 1977.
- 7./ Benczur Gy.; Györffy Gy.; Garam T.; Varga M.; Medgyessy Gy.: Correlation between effector lymphocytes in natural and antibody-mediated cytotoxicity.
Immunobiology 156. 320. 1979.

- 8./ Béládi I.; Pusztai R.: Interferon-like substance produced in chick fibroblast cells inoculated with human adenoviruses.
Zeitschr. für Naturforsch. 22. 165. 1967.
- 9./ Béládi I.; Bakay M.; Puszai R.; Hidas G.: Induction of interferon in chick cells by adenovirus of different origin.
J. Gen. Virol. 8. 143. 1970.
- 10./ Béládi I.; Pusztai R.; Mucsi I.; Bakay M.; Bajszár G.: Effect of human adenoviruses on the response of chickens to sheep erythrocytes.
Infect. Immun. 7. 22. 1973.
- 11./ Béládi I.: Adenovírusok interferont indukáló és immunosuppresszív hatása.
Doktori értekezés. Szeged 1979.
- 12./ Béládi I.; Pusztai R.; Bakay M.; Mucsi I.; Taródi B.: Interferon induction by adenoviruses.
Postgrad. Med. J. 55. 128. 1979.
- 13./ Béládi I.; Tóth M.; Mécs I.; Tóth S.; Taródi B.; Pusztay R.; Koltay M.: Production and purification of human leukocyte interferon. In: proceeding of the International Congress on Clinical Potentials of Interferon in Viral Diseases and Malignant Tumors. (Ed.: Kono R. and Vilcek J.T.) Japan Medical Research Foundation No. 15, pp. 31-37. 1980.
- 14./ Bishop G.A.; Schwartz S.A.: Enhancement of human natural killer cells by interferon requires RNA and protein synthesis.
Clin. Immunol. Immunopathol. 25. 374. 1982.
- 15./ Bloom B.R.: Interferons and the immune system.
Nature 284. 593. 1980.
- 16./ Bloom B.R.: Natural killers to rescue immune surveillance ?
Nature 300. 214. 1982.
- 17./ Böyum A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21. Suppl. 97. 77. 1968.

- 18./ Brunda M.J.; Herberman R.B.; Holden T.H.:
Interferon-independent activation of murine natural
killer cell activity. In: Natural Cell-mediated
Immunity against Tumors. (Ed.: Herberman R.B.) Acad.
Press, New York, pp. 525. 1980.
- 19./ Brunda M.J.; Taramtelli D.; Holden H.T.; Varesio L.:
Suppression of murine natural killer cell activity
by normal peritoneal macrophages. In: NK Cells and
Other Natural Effector Cells; edited by Herberman
R.B. p. 535. New York, Academic Press 1982.
- 20./ Brunner K.T.; Manel I.; Cerottini J.C.; Chapuis B.:
Quantitative assay of the lytic action of immune
lymphoid cells on ^{51}Cr labeled allogeneic target
cells *in vitro*: inhibition by isoantibody and by
drugs.
Immunology 14. 181. 1968. .
- 21./ Bukowski J.F.; Biron C.A.; Welsh R.M.: Elevated
natural killer cell-mediated cytotoxicity, plasma
interferon, and tumor cell rejection in mice
persistently infected with lymphocytic
choriomeningitis virus.
J. Immunol. 131. 991. 1983.
- 22./ Bundy B.; Nelson D.: Human spontaneous cell mediated
cytotoxicity. In: Neoplasma Immunity, experimental
and clinical. (Ed.: Crispen A.) Elsevier. North
Holland Inc. pp. 443. 1980.
- 23./ Burns G.F.; Triglia T.; Barlett P.F.; Machay I.R.:
Human natural killer cells, activated lymphocyte
killer cells and monocytes posses similar cytotoxic
mechanisms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80. 7606. 1983.
- 24./ Cameron D.: A comparison of the cytotoxic potential
in polymorphonuclear leukocytes obtained from normal
donors and cancer patients.
Clin. Immunol. Immunopathol. 28. 115. 1983.
- 25./ Cameron D.: Inhibition of neutrophil-mediated cyto-
toxicity by exogenous adenosine 5'-triphosphate.
Clin. Immunol. Immunopathol. 37 230. 1985.

- 26./ **Cantell K.; Hirvonen S.; Mogensen K.E.; Pyala L.:** Human leukocyte interferon: production, purification, stability and animal experiments. In: The Production of and Use Interferon for the Treatment and Prevention of Human Virus Infections. (Ed.: Rockville C.) In Vitro Monograph No. 3. Tissue Culture Association, pp. 33-38. 1974.
- 27./ **Carpen O.; Virtanen I.; Saksela E.:** Ultrastructure of human natural killer cells: nature of the cytolytic contacts in relation on cellular secretion.
J. Immunol. 128. 2691. 1982.
- 28./ **Chai J.Y.; Lillehoj C.:** Isolation and functional characterization of chicken intestinal intra-epithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumor target cells.
Immunology 63. 111. 1988.
- 29./ **Chi D.S.; Thorbecke G.J.:** Cytotoxicity to allogeneic cells in the chicken.
Cell. Immunol. 64. 258. 1981.
- 30./ **Clark R.A.; Klebanoff S.J.:** Neutrophil-mediated tumoricid cytotoxicity: role of the peroxidase system.
J. Exp. Med. 141. 1442. 1975.
- 31./ **Cunningham-Rundles S.; Filippa D.A.; Braun D.W.; Antonelli P.; Ashikari H.:** Natural cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes and regional lymph node cells in breast cancer in women.
J. Natl. Cancer Inst. 67. 585. 1981.
- 32./ **Dallegri F.; Patrone F.; Bonvini E.; Gahrton G.; Holm G.; Sacchetti C.:** On erythrocyte cytotoxicity by phorbol myristate acetate-activated human neutrophils.
Scand. J. Immunol. 17. 109. 1983.
- 33./ **Dascomb H.E.; Hilleman M.R.:** Clinical and laboratory studies in patients with respiratory disease caused by adenoviruses (RI-APC-ARD agents).
Am. J. Med. 21. 161. 1956.



- 34./ DeChatelet L.R.; Shirley P.S.; Johnson R.B.: Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of the human polymorphonuclear leukocytes.
Blood. 47. 545. 1976.
- 35./ DeChatelet L.; Shirley P.: Chemiluminescence of human neutrophils induced by soluble stimuli: effect of divalent cations.
Infect. Immun. 35. 206. 1982.
- 36./ Degré M.: Influence of exogenous interferon on the peripheral white blood cell count in mice.
Int. J. Cancer 14. 699. 1974.
- 37./ Dri P.; Bellavite P.; Cramer R.; Bisiacchi B.; Cian F.; Patriarca P.: Evidence that phagocitosing chicken polymorphonuclear leukocytes generate hydrogen peroxide and superoxide anion.
Adv. Exp. Biol. 121. 111. 1979.
- 38./ Droller M.; Schneider M.; Perlmann P.: A possible role prostaglandins in the inhibition of natural killer and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against tumor cells.
Cell. Immunol. 39. 165. 1978.
- 39./ Einhorn S.; Jarstrand C.: Functions of human neutrophilic granulocytes after *in vitro* exposure to interferon alpha.
Infect. Immun. 43. 1054. 1984.
- 40./ Faden H.; Hong J.; Ogra P.L.: Interaction of polymorphonuclear leukocytes and viruses in humans: adherence of polymorphonuclear leukocytes to respiratory syntitial virus-infected cells.
J. Virol. 52. 16. 1984.
- 41./ Feinman R.; Siegel D.; Le J.; Vilcek J.: Interferon enhances target cell sensitivity to monocyte killing.
Cell Immunol. 99. 287. 1986.
- 42./ Fernandes G.F.; Caradente E.; Halberg F.; Halberg R.A.: Cirkadian rythm in activity of lympholitic Natural Killer cells from spleens of fisher rats.
J. Immunol. 123. 622. 1979.

- 43./ **Ferrarini M.; Cadoni A.; Franzi A.T.; Chigliotti C.; Leprini A.; Zicca A.; Grossi C.E.:** Ultrastructure and cytochemistry of human peripheral blood lymphocytes: similarities between the cells of the third population and T_G cells.
Eur. J. Immunol. 10. 562. 1980.
- 44./ **Fleischer B.:** Effector cells in the avian spontaneous and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity.
J. Immunol. 125. 1161. 1980.
- 45./ **Friedman R.; Vogel S.:** Interferons with special emphasis on the immun system.
Adv. Immunol. 34. 97. 1983.
- 46./ **Glassman A.B.; Bennet C.E.; Randale C.L.:** Effect of ethyl alcohol on human peripheral lymphocytes.
Arch. Path. Lab. Med. 109. 540. 1985.
- 47./ **Goldfarb R.H.; Herberman R.B.:** Natural killer cell reactivity: regulatory interactions among phorbol ester, interferon, cholera toxin, and retinoic acid.
J. Immunol. 126. 2129. 1981.
- 48./ **Goldfarb R.H.; Timonen T.; Herberman R.B.:** Mechanism of tumor cell lysis by natural killer cells.
In: Mechanism of cell mediated cytotoxicity. (Eds.: Clark W. and Goldstein P.) Plenum Press, N.Y.
London. pp. 403. 1982.
- 49./ **Goldfarb R.H.:** Cell mediated cytotoxic reactions.
Human Pathol. 17. 138. 1986.
- 50./ **Goto. T.; Herberman R.B.; Maluish A.; Strong D.M.:** Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity.
J. Immunol. 130. 1350. 1983.
- 51./ **Grecchi B.M.; Saliba M.; Mariano M.:** Morphological of changes surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes *in vivo* and *in vitro*.
J. Pathol. 130. 23. 1980.

- 52./ Grimm E.A.; Mazumder H.; Zhang H.; Rosenberg S.A.: Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J. Exp. Med. 155. 1823. 1982.
- 53./ Grossi C.E.; Cadoni A.; Zicca A.; Leprini A.; Ferrarini M.: Large granular lymphocytes in human peripheral blood: ultrastructural and cytochemical characterization of the granules. Blood 59. 277. 1982.
- 54./ Grossi C.E.; Ferrarini M.: Morphology and cytochemistry of human large granular lymphocytes. "NK cells and other Natural Effector cells." edited by Herberman R.B. p. 1. New York. Academic Press. 1982.
- 55./ Hansson M.; Beran M.; Andersson B.; Kiessling R.: Inhibition of in vitro granulopoiesis by autologous and allogeneic human NK cells. J. Immunol. 129. 126. 1982.
- 56./ Henney C.S.; Kuribayashi K.; Kern D.E.; Gillis S.: Interleukin-2 augments natural killer cell activity. Nature 291. 335. 1981.
- 57./ Herberman R.B.; Nunn M.E.; Holden H.T.; Staal S.; Djeu J.Y.: Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic target cells. Int. J. Cancer 19. 555. 1977.
- 58./ Herberman R.B.; Djeu J.Y.; Kay H.D.: Natural killer cells: Characterization and regulation of activity. J. Immunol Rev. 44. 43. 1979a.
- 59./ Herberman R.B.; Holden H.T.; Djeu J.Y.; Jerrels T.R.; Varesio L.; Tagliabue A.; White S.L.; Oehler J.R.; Dean J.H.: Macrophages as regulators of immune responses against tumors. Adv. Exp. Med. Biol. 121. 361. 1980.
- 60./ Herberman R.B.; Ortaldo J.R.; Bonnard G.B.: Augmentation by interferon of human natural and antibody-dependent cell mediated cytotoxicity. Nature 277. 221. 1979b.

- 61./ Herberman R.B.; Nunn M.E.; Lavin D.H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors.
Int. J. Cancer. 16. 216. 1975.
- 62./ Herberman R.B.; Nunn M.E.; Lavrin D.H.; Asofsky R.: Effect of antibody to theta antigen on cell mediated immunity induced in syngeneic mice by murine sarcoma virus.
J. Natl. Cancer Inst. 51. 1059. 1973.
- 63./ Herberman R.B.: Immunoregulation and natural killer cells.
Molec. Immunol. 19. 1313. 1982.
- 64./ Hjorth R.; Johnsson A.; Vretblad P.: A rapid method for purification of human granulocytes using Percoll. A comparison with dextran sedimentation.
J. Immunol. Methods 43. 95. 1981.
- 65./ Imir T.; Saksela E.; Makela O.: Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in various orders of vertebrates.
Scand. J. Immunol. 6. 827. 1977.
- 66./ Inoue T.; Sendo F.: In vitro induction of cytotoxic polymorphonuclear leukocytes by supernatant from a concanavalin A-stimulated spleen cell culture.
J. Immunol. 131. 2508. 1983.
- 67./ Jarstrand C.; Einhorn S.: Effect of interferon on human neutrophilic granulocytes.
Cancer Immunol. Immunother. 16. 123. 1983.
- 68./ Kaaden O.R.; Lange S.; Stiburek B.: Establishment and characterisation of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32.
In Vitro. 18. 827. 1982.
- 69./ Kadish A.S.; Doyle A.T.; Steinhauer E.H.; Ghossein N.A.: Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease.
J. Immunol. 127. 1817. 1981.

- 70./ Kay H.D.; Bonnard G.D.; West W.H.; Herberman R.B.: A functional comparison of human Fc-receptor-bearing lymphocytes active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity.
J. Immunol. 118. 2058. 1977.
- 71./ Kiessling R.; Klein E.; Pross H.; Wigzell K.:
"Natural " killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemic cells, characteristic of the killer cells.
Eur. J. Immunol. 5. 117. 1975.
- 72./ Korec S.; Herberman R.B.; Dean H.; Cannon G.B.:
Cytostasis of tumor cell lines by human granulocytes.
Cell. Immunol. 53. 104. 1980.
- 73./ Koren H.S.; Williams M.S.: Natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity are mediated by different mechanisms and by different cells.
J. Immunol. 121. 1956. 1978.
- 74./ Köhler G.; Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 256. 495. 1975.
- 75./ Kupfer A.; Dennert G.: Reorientation of the microtubule-organizing center and Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding the lysable target cells.
J. Immunol. 133. 2762. 1984.
- 76./ Lanier L.L.; Le A.M.; Phillips J.H.; Warner N.L.; Babcock G.F.: Subpopulations of human natural killer cells defined by expressions of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens.
J. Immunol. 131. 1789. 1983.
- 77./ Lozzio C.B.; Lozzio B.B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with pozitiv Philadelphia chromosome.
Blood 45. 321. 1975.
- 78./ Lucas A.M.; Jamroz C.: Atlas of avian haematology. Agriculture monograph 25. United States Dept. of Agriculture, Washington DC, p. 216. 1961.

- 79./ Lukács K.; Roth J., Kaeberle M.: Activation of neutrophils by antigen-induced lymphokine, with emphasis on antibody-independent cytotoxicity. *J. Leukocyte Biol.* 38. 552. 1985.
- 80./ Lundgren G.; Zukoski C.F.; Möller G.: Differential effects of human granulocytes and lymphocytes on human fibroblasts *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* 3. 817. 1968.
- 81./ Marx J.L.: How killer cells kill their targets. *Science* 231. 1367. 1986.
- 82./ Mándi Y.; Veromaa T.; Baranji K.; Miczák A.; Béládi I.; Toivanen P.: Granulocyte-specific monoclonal antibody inhibiting cytotoxicity reactions in the chicken. *Immunobiol.* 174. 292. 1987.
- 83./ Morikawa K.; Kamaegaya S.; Yamazaki M.; Mizuno D.: Hydrogen peroxide as a tumoricidal mediator of murine polymorphonuclear leukocytes induced by a linear B-1,3 glucan and some other immunomodulators. *Cancer Res.* 45 3482. 1985.
- 84./ Mucsi I.; Pusztai R.; Béládi.; Bakay M.: Production of high titres of interferon in chicken leukocyte cultures inoculated with human adenoviruses type. *Acta Virol.* 14. 453. 1970.
- 85./ Natt M.; Herrick C.: A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Sci.* 31. 735. 1952.
- 86./ Nász I.; Kulcsár G.: A vírusok és a lymphoid rendszer.
In: Az orvosi virológia aktuális kérdései (Szerk.: Lapis K.) Medicina, Budapest p. 71. 1978.
- 87./ Nelson D.L.; Bundy B.M.; Strober W.: Spontaneous cell-mediated cytotoxicity by human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *J. Immunol.* 119. 1401. 1977.
- 88./ Nieminen P.; Paasivuo R.; Saksela E.: Effect of monoclonal anti-large granular lymphocyte antibody on the human NK activity. *J. Immunol.* 128. 1097. 1982.

- 89./ Ng A-K.; Indiveri F.; Pellegrino M.A.; Molinaro G.A.; Quaranta V.; Ferrone S.: Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human lymphocytes depleted on HLA-DR bearing cells with monoclonal HLA-DR antibodies.
J. Immunol. 124. 2336. 1980.
- 90./ Ortaldo J.R.; Sharrow S.O.; Timonen T.; Herberman R.B.: Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies.
J. Immunol. 127. 2401 1981.
- 91./ Ortaldo J.R.; Timonen T.T.; Herberman R.B.: Inhibition of activity of human NK and K cells by simple sugars: discrimination between binding and postbinding events.
Clin. Immunol. Immunopathol. 31. 430. 1984.
- 92./ Ostensen M.E.; Thiele D.L.; Lipsky P.E.: Tumor Necrosis Factor- enhances cytolytic activity of human natural killer cells.
J. Immunol. 138. 4185. 1987.
- 93./ Patek P.Q.; Collins J.L.: Tumor surveillance revisited: Natural cytotoxic (NC) activity deters tumorigenesis.
Cell. Immunol. 116. 240. 1988.
- 94./ Pati A.K.; Florentin I.; Chung V.; Sousa M.D.; Levi F.; Mathe G.: Circannual rhythm in natural killer activity and mitogen responsiveness of murine splenocytes.
Cell. Immunol. 108. 227. 1987.
- 95./ Penniall R.; Spitznagel J.: Chicken neutrophils: oxidative metabolism in phagocytic cells devoid of myeloperoxidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72. 5012. 1975.
- 96./ Perussia B.; Trinchieri G.; Cerottini J.: Functional studies of Fc receptor bearing human lymphocytes, effect of treatment with proteolytic enzymes.
J. Immunol. 123. 681. 1979.

- 97./ Perussia B.; Acuto O.; Terhost C.; Faust J.; Lazarus R.; Fanning V.; Trinchieri G.: Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane.
J. Immunol. 130. 2142. 1983.
- 98./ Perussia B.; Fanning V.; Trinchieri G.: A human NK and K cell subsets shares with cytotoxic T cell expression of the antigen recognized by antibody OKT8.
J Immunol. 131. 223. 1983.
- 99./ Perussia B.; Starr S.; Abraham S.; Fanning V.; Trinchieri G.: Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1.
J. Immunol. 130. 2133. 1983.
- 100./ Perussia B.; Trinchieri G.; Cerottini I.: Functional studies of Fc receptor bearing human lymphocytes, effect of treatment with proteolytic activity.
J. Immunol. 123. 681. 1979.
- 101./ Perussia B.; Trinchieri G.; Lebman D.; Jankiewicz J.; Lange B.; Rovera G.: Monoclonal antibodies that detect differentiation surface antigens on human myelomonocytic cells.
Blood 59. 382. 1982.
- 102./ Petrányi G.; Kiessling R.; Klein G.: Genetic control of "natural" killer lymphocytes in the mouse.
Immunogenetics 2. 53. 1975.
- 103./ Petrie H.T.; Klassen L.W.; Klassen P.S.; O'Dell J.R.; Kay H.D.: Selenium and the immune response: 2. Enhancement of murine cytotoxic T-lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity in vivo.
J. Leukocyte Biol. 45. 215. 1989.
- 104./ Pontremoli S.; Melloni M.; Sacco O.; Sparatore B.; Salamino F.; Damiani G.; Horecker L.: Cytolytic effects of neutrophils: role for a membrane-bound neutral proteinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83. 1685. 1986.

- 105./ Pross H.; Baines M.: Studies of human natural killer cells. I. In vitro parameters effecting normal cytotoxic function.
Int. J. Cancer 29. 383. 1982.
- 106./ Pusztai R.; Bakay M.; Mucsi I.; Béládi I.: Interferon induction by human adenovirus in vivo.
Acta Virol. 13. 71. 1969.
- 107./ Pusztai R.; Taródi B.; Béládi I.: Production and Characterization of interferon induced in chicken leukocytes by concanavalin A.
Acta Virol. 30. 131. 1986.
- 108./ Reynolds C.W.; Ortaldo J.R.: Natural killer activity: The definition of a function rather than a cell type.
Immunol. Today 8. 172. 1987.
- 109./ Rosenberg E.B.; McCoy J.L.; Green S.S.; Donelly F.C.; Siwarski D.F.; Levine P.H.; Herberman R.B.: Destruction of human lymphoid tissue-culture cell lines by human peripheral lymphocytes in ⁵¹Cr-release cellular cytotoxic assays.
J. Natl. Cancer Inst. 52. 345. 1974.
- 110./ Rumpold H.; Kraft D.; Obexer G.; Böck G.; Gebhardt W.: A monoclonal antibody against a large granular lymphocytes and granulocytes.
J. Immunol. 129. 1458. 1982.
- 111./ Santoli D.; Trinchieri G.; Zmijewski C.M.; Koprowski H.: HLA-related control of spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in humans.
J. Immunol. 117. 765. 1976.
- 112./ Senik A.; Stefanos S.; Kolb J.P.; Lucerno M.; Falcoff E.: Enhancement of mouse natural killer cell activity by type II. interferon.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 131. C. 349. 1980.
- 113./ Sharma J.M.; Coulson B.D.: Presence of natural killer cells in specific pathogen-free chickens.
J. Natl. Cancer Inst. 63. 527. 1979.

- 114./ Sharma J.M.; Okazaki W.: Natural killer cell activity in chickens: Target cell analysis and effect of antithymocyte serum on effector cells. *Infection and Immunity* 31. 1078. 1981.
- 115./ Steinbeck M.J.; Roth J.A.; Kaeberle M.L: Activation of bovine neutrophils by recombinant interferon-gamma. *Cell. Immunol.* 98. 137. 1986.
- 116./ Stewart W.E.; Blalock J.E.; Burke D.C.; Chany C.; Dunnick J.K.; Fa4coff E.; Friedman R.M.; Galasse G.J.; Joklik W.K.; Vilcek J.T.; Younger J.S.; Zoon K.C.: Interferon nomenclature. *Eur. J. Immunol.* 10. 660. 1980.
- 117./ Szanton E.; Sarov J.: Interaction between polymorphonuclear leukocytes and varicella-zoster virusinfected cells. *Intervirology* 24. 119. 1985.
- 118./ Takasugi M.; Mickey M.R.; Terasaki R.I.: Reactivity of lymphocytes from normal persons in cultured tumor cells. *Cancer Res.* 33. 2898.1973.
- 119./ Takasugi M.; Akira D.; Kinoshita K.: Granulocytes as effectors in cell-mediated cytotoxicity of adherent target cells. *Cancer Res.* 35. 2169. 1975.
- 120./ Takasugi M.; Ramseyer A.; Takasugi J.: Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. *Cancer Res.* 37. 413. 1977.
- 121./ Taródi B.; Metz D.H.; Douglas A.; Russel W.C.: A study of events in chick cells infected with human adenovirus type 5 and their relationship to the induction of interferon. *J. Gen. Virol.* 36. 425. 1977.
- 122./ Taródi B.: Interferon képződés adenovírussal fertőzött csirke sejtekben. A csirke interferonok fizikai-kémiai tulajdonságai. Kandidátusi disszertáció. 1989.

- 123./ Testi R.; Galli M.C.; Picolli M.; Herberman R.B.; Frati L.; Santoni A.: Sequential metabolic events and morphological changes during *in vivo* large granular lymphocyte activation and proliferation.
Cell. Immunol. 102. 78. 1986.
- 124./ Timonen T.; Saksela E.: Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation.
J. Immunol. Methods 36. 285. 1980.
- 125./ Timonen T.; Ortaldo J.; Herberman R.B.: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells.
J. Exp. Med. 153. 569. 1981.
- 126./ Tóth M.; Endrész V.; Tóth S.; Béládi I.: Human interferon alpha and beta have more potent priming activities than interferon gamma.
J. Gen. Virol. 66. 893. 1985.
- 127./ Trinchieri G.; Santoli D.: Enhancement of natural killer cell activity by IFN.
J. Immunol. 120. 1845. 1978a.
- 128./ Trinchieri G.; Santoli D.: Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus transformed cells. Enhancement of natural killer cell activity by IFN and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis.
J. Exp. Med. 147. 1314. 1978b.
- 129./ Trinchieri G.; Santoli D.; Dee R.R.; Knowles B.B.: Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus transformed cells. Identification of the antiviral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte population.
J. Exp. Med. 147 1299. 1978.
- 130./ Trinchieri G.; Perussia B.: Biology of disease: Human Natural Killer Cells: Biologic and Pathologic Aspects.
Lab. Investigation. 40. 489. 1984.

- 131./ Weiss S.J.; Slivka A.: Monocyte and granulocyte-mediated tumor cell destruction.
J. Clin. Invest. 69. 255. 1982.
- 132./ West W.H.; Cannon G.B.; Kay H.D. Bonnard G.D.; Herberman R.B.: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells.
J. Immunol. 118 355. 1977.
- 133./ Westrick M.A.; Shirley P.S.; DeChatelet L.R.: Generation of chemiluminescence by human neutrophils exposed to soluble stimuli of oxidative metabolism.
Infect. Immun. 30. 385. 1980.
- 134./ Wright S.C.; Bonavida B.: Studies on the mechanism of natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity (CMC). I. Release of cytotoxic factors specific for NK-sensitive target cells (NKCF) during co-culture of NK effector cells with NK target cells.
J. Immunol. 129. 433. 1982.
- 135./ Young J.D.; Liu C.; Persechini P.M.; Cohn Z. A.: Perforin-dependent and -independent pathways of cytotoxicity mediated by lymphocytes.
Immunol. Rev. 103. 161. 1988.
- 136./ Zalman L.S.; Brothers M.A.; Chin F.J.; Müller-Eberhard H.J.: Mechanism of cytotoxicity of large granular lymphocytes: relationship of the cytotoxic lymphocyte protein to the ninth component (C9) of human complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83. 5262. 1986.

X. ELŐADÁSOK, KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1./

Seprényi Gy.; Mándi Y.; Pusztai R.; Béládi I.: Humán adenovírus hatása az NK aktivitásra egérben.

MMT Nagygyűlése, Nyíregyháza, 1984.

2./

Y. Mándi; **Gy. Seprényi**; R. Pusztai; I. Béládi : Are granulocytes the main effector cells of natural cytotoxicity in chicken?

Immunbiol. 170. 284. 1985.

3./

Y. Mándi; **Gy. Seprényi**; R. Pusztai: Effect of human adenovirus on natural killer cell activity in mice.

Acta Mikrobiol. Hung. 32(4). 373. 1985.

4./

Mándi Y.; **Seprényi Gy.**, Pusztai R., Béládi I.: Granulocyták természetes cytotoxikus aktivitása szárnyasokban.

Magyar Immunológiai Társaság Tudományos Gyűlése, Eger, 1985.

5./

Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Pusztai R., Béládi I.: The effect of interferon on the granulocyte cytotoxicity in chicken.

Abstract of Immunobiologics and their application
International Congress, Budapest, 1985.

6./

Baranji K.; Miczák A.; Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Béládi I.: Csirke granulocytákkal reagáló monoklonális ellenanyagok /Abstract/.

Magyar Immunológiai Társaság Tudományos Nagygyűlése, Eger, 1985.

7./

Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Pusztai R.; Béládi I.: Granulocyták természetes cytotoxikus aktivitása szárnyasokban /Abstract/.

Magyar Immunológiai Társaság Tudományos Nagygyűlése, Eger, 1985.

8./

Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Pusztai R.; Bakay M.; Béládi I.:
Humán adenovirus hatása a természetes cytotoxicitásra
csirkében /Abstract/.

MMT Nagygyűlése, Kecskemét, 1985.

9./

I. Béládi; Y. Mándi; **Gy. Seprényi** ; R. Pusztai; A.
Veckenstedt: The effect of flavonoids on the natural
killer activity of human lymphocytes.

Flavonoids and Bioflavonoids /Eds: Farkas L., Gábor M.,
Kállay F./ pp. 325. Szeged, 1985.

10./

Béládi I.; Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Pusztai R.: The
effect of adenoviruses and that of interferon on the
natural cytotoxicity of chickens.

Scientific Session of International Editorial Board of
"Acta Virologica" Bucharest, Románia 1985.

11./

Béládi I.; Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Pusztai R.; Taródi
B.: Effect of interferon on granulocyte functions in
avian and human system.

Yugoslave Colloquim on IFN. /Ed: Filipic B./ pp. 17.
Slovenian Microbiological Society, Ljubljana, 1986.

12./

Béládi I.; Mándi Y.; Baranji K.; Pusztai R.; **Seprényi
Gy.**; Bakay M.: The effect of monoclonal antibody on cyto-
toxicity of IFN-stimulated chicken granulocytes.

9th Regional Conferences of the Socialist Countries on
Interferon. Jéna, DDR. 1986.

13./

Mándi Y.; Baranji K.; **Seprényi Gy.**; Pusztai R.; Miczák
A.; Béládi I.: Monoklonális ellenanyagok hatása az adeno-
vírussal fertőzött csirke fehérvérsejtek működésére.

MMT Nagygyűlése, Gödöllő, 1986.

14./

Béládi I.; Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Baranji K.; Miczák
A.; Taródi B.: The effect of interferon and viruses on
the function of chicken granulocytes /Abstract/.

J. Interferon Res. 6(1). Suppl. 93. 1986.

15./

Y. Mándi; R. Pusztai; K. Baranji; **Gy. Seprényi**; B. Taródi; M. Bakay; I. Béládi: The role of interferon in the adenovirus-induced augmentation of granulocyte-mediated cytotoxicity in chicken.

Immunbiol. 174. 210. 1987.

16./

Béládi I.; Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Pusztai R.; Taródi B.: Effect of interferon on the activity of human and chicken granulocytes.

10th Congress of the Hungarian Society of Microbiology with International Participation, Szeged, 1987.

17./

Béládi I.; Mándi Y.; **Seprényi Gy.**; Baranji K.; Pusztai R.; Taródi B.: Modulation of granulocyte function by interferons /Abstract/.

J. Interferon Res. 7/6. 80. 1987.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr.Béládi Ilona egyetemi tanár-
nak, hogy az immunológiának ezt az érdekes területét je-
lölte ki kutatási területnek, és számos tanáccsal, ötlet-
tel segítette munkámat. Őszinte köszönettel tartozom
Dr.Mándi Yvette egyetemi adjunktusnak aki bevezetett az
immunológiai módszerekbe és közvetlen támogatást és se-
gítséget nyújtott a témához. A munkához nagy segítséget
nyújtottak az intézet többi munkatársai: Dr.Bakay Mártá-
nak, Dr.Berencsi Klárának, Dr.Pusztai Rozáliának és
Dr.Taródi Bélának a csirke interferonért; Dr.Tóth Miklós-
nak, Dr.Tóth Sándornak és Edrész Valériának a humán in-
terferonokért tartozom köszönettel.

Külön köszönetet mondok Baranji Katalinnak aki rendelke-
zésünkre bocsátotta a monoklonális ellenanyagokat.

A lelkiismeretes, segítőkész asszisztensi munkáért Hege-
dűs Katalinnak tartozom sok köszönettel.

Legvégül köszönetet mondok az Intézet összes munkatársá-
nak a sok segítségért és támogatásért, amivel munkámat
támogatták.

