

GRAFT-VERSUS-HOST BETEGSÉG ELŐIDÉZÉSÉNEK ÉS
PREVENCIÓJÁNAK LEHETŐSÉGEI EGEREKBEN

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

VIZLER CSABA



SZEGED

1993

Tartalomjegyzék

oldal

Az ábrák jegyzéke.....	IV
1. BEVEZETÉS.....	1
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	5
2.1. Kísérleti állatok.....	5
2.1.1. Egerek.....	5
2.1.2. Nyulak.....	6
2.2. Sejtszuszpenziók készítése.....	6
2.3. Újszülöttkori transzplantációs tolerancia indukciója.....	7
2.4. Farokbőr allotranszplantáció.....	7
2.5. Antithymocytá savó előállítás és tesztelése....	8
2.6. A recipiensek irradiálása.....	9
2.7. Szisztémás GVHD indukciója.....	9
2.8. Lokális GVHR indukciója.....	9
2.9. A vizelet proteintartalmának meghatározása.....	9
2.10. Hybridomafelülűzők előállítása.....	10
2.11. Indirekt immunfluoreszcenciás jelölés és flow cytometria.....	10
2.12. Az <i>in vitro</i> proliferációs kapacitás mérése timidininkorporációs tesztben.....	11
2.13. Lépsejtek tenyésztése citokintermelésük meghatározására.....	11
2.14. TNF- α meghatározás WEHI164 tesztel.....	12

2.15. IFN-gamma, IL-10 és IL-4 meghatározás	
ELISA-val.....	12
2.16. Statisztikai analízis.....	13
3. EREDMÉNYEK.....	13
3.1. Az A-CBA PT recipiensek érzékenyek, míg	
a (CBAXA)F ₁ recipiensek rezisztensek az	
A lépsejtek GVHD-t okozó hatásával szemben.....	13
3.2. A GVHD mechanizmusának <i>in vitro</i> vizsgálata.....	17
3.2.1. A GVHD során a lép magvas sejtszáma esett.....	17
3.2.2. A lépben a CD8+ sejtek átmeneti	
felszaporodását követően a lymphoid (T+B)	
sejtek aránya csökkent.....	18
3.2.3. A reakció során csökkent a lépsejtek	
<i>in vitro</i> proliferációs kapacitása.....	18
3.2.4. A lépsejtek cytokintermelése a GVHD során.....	26
3.3. A toleráns és az F ₁ hibrid állatokban azonos	
intenzitású lokális GVHR volt kiváltható.	27
3.4. Az F ₁ hibrid recipiensek immunszuppressziója	
a GVHD-vel szembeni rezisztenciájukat nem	
befolyásolta.....	27
3.5. Az F ₁ recipiensek GVHD-vel szembeni	
rezisztenciáját lépsejtek transzferével	
nem tudtuk a toleráns állatokba átvinni.....	34
3.6. Az <i>in vivo</i> ATS-előkezelt A donorok	
lépsejtjei nem váltottak ki GVHD-t	
A-CBA PT recipiensekben.....	34
3.7. Az ATS-előkezelt donorok lépsejtjei (B10xA)F ₁	
recipiensekben is inaktívak voltak.....	38

3.8. A donorok in vivo ATS-előkezelése a lépsejtek haemopoietikus repopuláló aktivitását fokozta.....	38
4. DISZKUSSZIÓ.....	41
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	51
6. IRODALOM.....	52
A publikációk listája.....	60
Köszönetnyilvánítás.....	62

Az ábrák jegyzéke

	oldal
1. GVHD okozta súlycsökkenés A lépsejtekkel oltott A - CBA PT és (CBAXA) F_1 egerekben.....	15
2. GVHD okozta elhullások A lépsejtekkel oltott A - CBA PT és (CBAXA) F_1 egerekben.....	16
3. A lép magvas sejtszámának változása 50 millió A lépsejttel oltott egerekben.....	19
4. A lép sejtösszetételének változása a GVHD folyamán A - CBA PT egerekben.....	20
5. A lép sejtösszetételének változása a GVHD folyamán (CBAXA) F_1 recipiensekben.....	21
6. A lépsejtek Con A indukálta proliferációjának csökkenése A - CBA PT egerekben.....	22
7. A lépsejtek Con A indukálta proliferációjának csökkenése (CBAXA) F_1 egerekben.....	23
8. A lépsejtek spontán proliferációjának csökkenése A - CBA PT egerekben.....	24
9. A lépsejtek spontán proliferációjának csökkenése (CBAXA) F_1 egerekben.....	25
10. A lépsejtek in vitro IFN-gamma termelésének csökkenése a GVHD kiváltása után.....	28
11. A lépsejtek in vitro IL-4 termelése a GVHD kiváltása után.....	29
12. A lépsejtek in vitro IL-10 termelésének változása a GVHD kiváltása után.....	30

13. A lépsejtek in vitro TNF- α termelése a GVHD kiváltása után.....	31
14. A szérum TNF- α szintje a GVHD kiváltása után..	32
15. Lokális GVHR kiváltása popliteális nyirokcsomó-megnagyobbodási tesztben.....	33
16. A (CBAXA) F_1 recipiensek ATS-előkezelése nem befolyásolja a GVHD súlyosságát.....	35
17. Súlycsökkenés A és (CBAXA) F_1 sejtekkel egyidejűleg oltott A - CBA PT egerekben.....	36
18. A - CBA PT egerekben a GVHD nem védhető ki (CBAXA) F_1 lépsejtek egyidejű bevitelével.....	37
19. ATS-előkezelt A donorok lépsejtjei nem váltanak ki GVHD-t A - CBA PT egerekben.....	39
20. ATS-kezelt szemiallogén donorok sejtjei nem okoznak GVHD-t (B10xA) F_1 egerekben.....	40
21. ATS-kezelt donorok lépsejtjei a sugárbetegséget is kivédi (B10xA) F_1 egerekben...	42

1. BEVEZETÉS

Graft-versus-host reakció (GVHR) akkor lép fel, ha egy immunológiailag válaszképtelen egyedbe egy másik egyed immunkompetens (lymphoid) sejtjeit visszük be és a donor és a recipiens között hisztokompatibilitás áll fenn (1). Ha a graft-versus-host reakció betegséget okoz, graft-versus-host disease-ről (GVHD) beszélünk. Bár egyéb sejtpopulációk szerepe is ismeretes, a GVHR (és a GVHD) kiváltásában a donor T-sejtjei játsszák a legfontosabb szerepet (2). A recipiens válaszképtelenségének sokféle oka lehet: 1. A hisztokompatibilitási antigének kodomináns módon öröklődnek, vagyis az F_1 hibrid állatok sejtjein mindkét szülő hisztokoimpatibilitási antigénjei megjelennek. Emiatt homozigóta szülők F_1 hibrid utódai nem képesek immunológiailag felismerni a parentális sejteket. Ha F_1 hibrid recipienseket parentális lymphoid sejtekkel oltunk, a GVHD egyik formája, az úgynevezett *F_1 hibrid betegség* lép fel. 2. Egyes fajok esetében az újszülöttek immunrendszere funkcionálisan éretlen, válaszképtelen. Ilyen faj az egér és a patkány is. Ha újszülött egerekbe allogén lymphoid sejteket viszünk be, a recipiensekben letális GVHD, az úgynevezett *runt disease* fejlődik ki. 3. Az immunológiai válaszképtelenséget okozhatja immunszuppresszió vagy immundeficiencia. Ha a GVHD-t irradiált egyedekben indukáljuk, másodlagos betegségről - *secondary disease* - beszélünk; az elsődleges betegség (*primary disease*) itt maga a sugárbetegség. 4. A recipiens válaszképtelenségét okozhatja a donor transzplantációs antigénjeivel szembeni specifikus transzplantációs tolerancia.

Kísérleteink első csoportjában a letális graft-versus-host betegség kiválthatóságának feltételeit vizsgáltuk nem irradiált egerekben. A nem irradiált modellek használata mellett szól, hogy így elkerülhetjük a recipiensek irradiáció által okozott, a GVHD hatásait nehezen értékelhetővé tevő és a kísérlet reprodukálhatóságát rontó aspecifikus károsodásait (3).

Sikeres újszülöttkori transzplantációs toleranciakeltést követően a felnőtt recipiensek válaszképtelenek a donor transzplantációs antigénjeivel szemben, így az azokat hordozó lymphoid sejtekkel szemben is, ami miatt érzékenyek lehetnek a donor sejtek által okozott GVHD-re. Ez az elméleti lehetőség a transzplantációs immunológia alaptörvényeinek megismerése után nem sokkal felmerült, ennek ellenére egérmodellben csak kevés, egymásnak ellentmondó adat látott napvilágot (4, 5). Mi az A egértörzs transzplantációs antigénjeivel szemben permanensen toleránssá tett CBA törzsű egerekben - a továbbiakban: A-CBA PT - kíséreltük meg a szisztémás GVHD indukcióját A donor lépsejtekkel. Ez a törzskombináció korábbi vizsgálatainkban igen alkalmasnak bizonyult az újszülöttkori transzplantációs tolerancia hatékony indukciójára: a toleranciakeltést követően az A farokbőrrel allotranszplantált recipiensek 95%-a viselte a transzplantátumot korlátlan ideig, vagyis vált permanensen toleránssá, míg a kezeletlen recipiensek esetében a grafttúlélés körülbelül 12 nap volt (6). A toleráns recipiensek GVHD-vel szembeni szenzitivitását az ugyanebben a törzskombinációban létrehozott (CBAXA)F₁ hibrid recipiensekével hasonlítottuk össze. Az A és a CBA törzs egymástól a H-2D első osztályú fő hisztokompatibilitási antigénjében (MHC), az MIs allélben és egyéb minor hisztokompatibilitási antigénjeiben is különbözik. A (CBAXA)F₁ recipiensek az újszülöttkori toleráns állatokhoz hasonlóan elvileg válaszképtelenek az A sejtekkel szemben, továbbá a GVHD kialakulását lehetővé tevő hisztokompatibilitási antigénkülönbség szintén azonos a két esetben. Ennek ellenére az újszülöttkori toleráns recipiensekben az A lépsejtek súlyos, letális GVHD-t váltottak ki, míg a (CBAXA)F₁ hibridek gyakorlatilag rezisztensnek bizonyultak e sejtek letális GVHD-t okozó hatásával szemben. A kétféle recipiensben indukálható GVHD-t *in vitro* és *in vivo* kísérletekben elemeztük. Tanulmányoztuk a lép sejtösszetételének, a lépsejtek proliferációs kapacitásának és citokintermelésének változását a GVHD indukcióját követően. *In vivo*

sejttranszferen alapuló kísérletekben vizsgáltuk, hogy az F₁ hibrid egerek nehezen megmagyarázható rezisztenciájában recipiens lymphoid sejtek játszanak-e szerepet.

A graft-versus-host betegség tanulmányozásának elméleti jelentősége mellett fontos klinikai vonatkozásai is vannak. Egyes esetekben GVHD léphet fel teljes vértranszfúzióját követően, főleg (de nem kizárólag) immunszupprimált vagy immundeficiens betegekben. Ha a vér immunkompetens sejtjeit eltávolítjuk, illetve elpusztítjuk (például irradiációval), a betegség megelőzhető. Az immunkompetens sejteket szintén tartalmazó vékonybél transzplantációja is okozhat GVHD-t. Ezeknél azonban sokkal nagyobb jelentőségű a klinikai csontvelőtranszplantációt kísérő GVHD. A graft-versus-host betegség a klinikai csontvelőtranszplantáció sikerét veszélyeztető talán legsúlyosabb szövődmény. A probléma súlyossága vitathatalan, figyelembe véve, hogy világszerte évente több mint 4000 allogén csontvelőtranszplantációt végeznek (7, 8), főleg malignus vérképzőrendszeri betegségek, aplasztikus anémia, öröklött immundeficienciák és anyagcserebetegségek esetében. A GVHD a donorok leggondosabb szelekciója és az alkalmazott folyamatos immunszuppressziós kezelés ellenére az esetek nagy százalékában lép fel; a már kifejlődött betegség visszaszorítása az immunszuppresszió drasztikus fokozásával kísérrelhető meg, ez a kezelés azonban nem mindig hatékony, továbbá fogékonyá teszi a recipienst az opportunistafertőzésekkel szemben.

Az akut GVHD kivédhető a donor sejtszuspenzió *in vitro* T-sejtmentesítésével. Ez a kezelés azonban egyéb, súlyos szövődmények előfordulási gyakoriságát növeli: gyakoribbá válik a csontvelőtranszplantátum kilökődése és a másodlagos fertőzések, főleg a cytomegalovírus által okozott interstitialis pneumonia. A T-sejteket tartalmazó transzplantátum a graft-versus-host aktivitás mellett graft-versus-lymphoma, illetve -leukémia aktivitással is rendelkezik, vagyis a donor sejtek a reakció fő célpontját jelentő normális recipiens vérképzőrendszeri sejtek mellett a recipiens malignus sejtjeivel szemben is képesek immunológiai

válaszra. A T-sejt depletált csontvelő transzplantációja során - valószínűleg a graft-versus-lymphoma aktivitás csökkenése miatt - gyakoribb a relapszus. Mindezen okok együttes hatása miatt a T-sejtmentesített csontvelőt kapott betegek összesített túlélése nem szükségképpen jobb, mint a kezeletlen csontvelőt kapottaké (9).

Ismervén GVHD kivédésére alkalmas egyetlen igazán hatékony eljárás, az *in vitro* T-sejt depléción ezen hátrányait, kísérleteink egy csoportjában a GVHD megelőzésének egy más elven alapuló módszerével próbálkoztunk. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a nyúlban termelt egér ellenes antithymocytin savó (ATS) rendkívül hatásos immunszuppresszívum egér allo- és xenotranszplantációs modellekben (10, 11, 12, 13). Megállapítottuk, hogy két héttel a kiváltás előtt *in vivo* ATS-sel előkezelt egerek lépsejtjei többféle, sejtttranszferen alapuló kísérletes rendszerben inaktívak: a kezeletlen lépsejtekkel ellentétben nem képesek szingén, újszülöttkori toleráns recipiensekben a transzplantációs toleranciát felfüggeszteni, továbbá nem képesek nyirokcsomómegnagyobbodást kiváltani a lokális graft-versus-host reaktivitás mérésére szolgáló popliteális nyirokcsomó-megnagyobbodási tesztben. Mindezekre alapozva megvizsgáltuk, hogy az ezen protokoll szerint előkezelt donor állatok lépsejtjeivel kiváltható-e szisztémás GVHD. Kísérleteinkben többek közt az általunk leírt és a letális GVHD indukciójára különösen alkalmasnak talált újszülöttkori toleráns recipienseket használtuk. Ezen kívül itt olyan F₁ hibrideket választottunk, amelyek a GVHD indukciójára érzékenyek: (B10xA)₁F₁ recipiensekben váltottunk ki letális GVHD-t mind B10, mind A törzsű parentális lépsejtek oltásával. Eredményeink szerint az *in vivo* ATS-előkezelt donorból származó lépsejtek sem az újszülöttkori toleráns, sem az F₁ hibrid recipiensekben nem váltottak ki GVHD-t. A klinikai csontvelőtranszplantáció esetében a recipiens saját vérképzőrendszeri sejtjeit a transzplantációt megelőzően letális dózisu irradiálással és/vagy citosztatikumokkal elpusztítják. Itt kulcsfontosságú a csontvelőtranszplantátum vérképzőrendszert repopuláló aktivitása. Ennek

vizsgálatára a donorok ATS-előkezelésének hatását letálisan irradiált F₁ hibrid recipiensekben is tanulmányoztuk. Hogy a donor sejtek haemopoietikus repopuláló és GVHD-t indukáló hatását külön tanulmányozhassuk, az allogén donorok mellett itt kezeletlen és ATS-előkezelt színgén - (B10xA)F₁ - donorokat is használtunk. A donorok ATS-előkezelése nemcsak a transzplantátum GVHD-indukáló kapacitását eliminálta, hanem a haemopoietikus repopuláló képességet is előnyösen befolyásolta, ezzel a T-sejt depléciónál előnyösebbnek bizonyult.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Kísérleti állatok

2.1.1. Egerek

Kísérleteinkben az A/J, a CBA/Ca és a C57BL/10ScSn (a továbbiakban: A, CBA, és B10) izogén egértörzseket és ezek F₁ hibrid utódait /(CBAxA)F₁ illetve (B10xA)F₁/ használtuk. A kísérletekben használt izogén egértörzsek H-2 haplotípusát és Mls genotípusát a következő táblázat tartalmazza:

H-2 allélek:									
Törzs	haplotípus	K	A β	A α	I β	I α	S	D	Mls
A	H-2 ^a	k	k	k	k	k	d	d	b
CBA/Ca	H-2 ^k	k	k	k	k	k	k	k	c
B10	H-2 ^b	b	b	b	b	b	b	b	b

Valamennyi egértörzset a SZOTE Kísérletes Sebészeti Intézetének állatházában tenyésztettük. Az állatok a LATI (Gödöllő) által forgalmazott konvencionális egértápot és csapvizet fogyasztottak *ad libitum*. A törzsek izogenitását a Silvers-féle körbegráftolási módszerrel kétévente ellenőriztük.

2.1.2. Nyulak

Az ATS előállítására használt 2-4 kg súlyú újjélandi fehér nyulakat egy helyi tenyésztőtől vásároltuk; az immunizálás előtt legalább tíz napon át megfigyelés alatt tartottuk őket. A nyulak a LATI (Gödöllő) által forgalmazott nyúltápot és csapvizet fogyasztottak *ad libitum*.

2.2. Sejtszuspenziók készítése

A donor állatok elvéreztetése után a lymphoid szerveket aszeptikus körülmények között eltávolítottuk, néhány csepp M199 tápfolyadékban (Gibco, Paisley, Anglia) ollóval apró darabokra vágtuk és hajlított üvegbottal szétnyomkodtuk. A szervdarabokat Pasteur-pipettával homogenizáltuk. A szuszenziót négyrétegű gézen szűrtük, majd centrifugálással (350 g, 10 perc) üleptítettük, végül reszuszendáltuk. A szuszenziót két további centrifugálással és reszuszendálással mostuk. A sejtkoncentrációt Bürker-kamrában való számolással állapítottuk meg. A vitalitást tripánkék festékkizárási teszttel ellenőriztük. A kísérletekhez csak olyan sejtszuspenziókat használtunk fel, amelyek vitalitása meghaladta a 85%-ot.

2.3. Újszülöttkori transzplantációs tolerancia indukciója

Az újszülöttkori transzplantációs toleranciát Billingham kissé módosított módszere szerint indukáltuk (5). Hím és nőstény (CBA $\times$ A) F_1 hibrid egerek lépéből sejtuszpenziót készítettünk. A sejt koncentrációt 4×10^8 /ml-re állítottuk be. A legfeljebb 24 órája született CBA újszülötteket a *vena facialis anterior*-on keresztül 2×10^7 lépsejttel oltottuk. A toleranciakeltés hatékonyságát a kéthónapos recipiensek A farokbőr allografttal való transzplantációjával ellenőriztük. A recipiensek 95 %-a permanensen toleránsnak bizonyult: transzplantátumukat a négy hónapos megfigyelési idő alatt a rejekció jelei nélkül viselték.

2.4. Farokbőr allotranszplantáció

A bőralлотranszplantáció a Billingham és Medawar által kifejlesztett technikán alapult (14, 15). Az általában kéthónapos recipienseket 77 mg/testsúlykilogramm pentobarbital (Nembutal, Serva, Heidelberg, Németország) *i.p.* oltásával narkotizáltuk. Az állatokat nyírógéppel megnyírtuk, a műtéti területet 70%-os alkohollal, majd jóoldattal dezinficiáltuk. Steril, hajlított szemészeti ollóval 1-1,5 cm²-es, négyzet alakú graftágyat készítettünk a hátbőrbe, ügyelve, hogy a *panniculus carnosus* a benne futó erekkel meg ne sértsük. A cervikális diszlokációval megölt donorok farkát alkoholos, majd jódos lemosással dezinficiáltuk. A fark tövéénél és a fark végétől 1 cm-re körkörös metszést ejtettünk, majd köztük egy hosszanti metszéssel végigvágtuk a bőrt. A felpreparált farokbőrt csipesszel lerántottuk, steril fiziológiás sóoldattal megnedvesített szűrőpapírra helyeztük és négyzet alakú darabokra vágtuk. A graftot a graftágyba illesztettük, majd kiszáradásának megelőzésére a recipiensek törzsét 2 rész szilárd paraffin, 3 rész méhviasz, 4 rész lanolin és 4 rész folyékony paraffin megolvasztott keverékébe mártott kalikópólyába burkoltuk; a kalikó fölé gipszpólyát helyeztünk.

Hogy az állatokat a narkózis okozta lehűléstől megóvjuk, ébredésig infravörös lámpa alatt melegítettük őket. A védőkötetést a 8. napon távolítottuk el, a transzplantátumot hajlított szemészeti csipesszel megtisztítottuk a pörktől és az elhalt hámtól, majd bőrpuhító krémmel kentük be. A graftokat a kilökődésig naponta ellenőriztük. Az akut kilökődés időpontjának azt a napot tekintettük, amikor a transzplantátum teljes felülete vörösesbarna színűvé, kemény, száraz tapintatúvá vált. A krónikus kilökődést akkor tekintettük lezajlottnak, mikor a sorozatos, kis nekrosisok nyomán a farokbőr szőrzete maradéktalanul eltűnt, jellegzetes szerkezete felismerhetelenné vált és sima, fénylő, zsugorodó hegyszövet maradt vissza a helyén.

2.5. Antithymocyta savó előállítása és tesztelése

Az antisavókat Levey és Medawar módszerét (16) Végh szerint módosítva (17) állítottuk elő. Thymocyta donorként 3-6 hetes, vegyes nemű CBA egereket használtunk. A thymusok kipreparálása után a leírt módon sejtszuspenziót készítettünk. A nyulakat 3×10^7 thymocyta/kg intravénás oltásával immunizáltuk. Az immunizálást 14 nap múlva megismételtük, majd további 7 nap múlva a nyulakat elvéreztettük. A vért két órán át szobahőn, utána egy éjszakán át 4°C -on állni hagytuk, a savót leszívtuk és centrifugálással tisztítottuk, 56°C -on 30 percig tartva dekomplementáltuk, majd a felhasználásig -20°C -on tároltuk. A savók immunszuppresszív aktivitásának meghatározásához allogén (A) farokbőrrel transzplantált normál CBA hím egereket oltottunk $2 \times 0,5$ ml ATS-sel a transzplantációt követő 2. és az 5. napon. Az így kapott grafttúlélés a fenti recept szerint készített savók esetében 30-40 nap volt, szemben a kezeletlen állatokban mérhető 12 nappal.

2.6. A recipiensek irradiálása

A recipiensek irradiálása ^{60}Co gamma sugárforrással, 1 Gy/perc dózisteljesítménnyel történt. A dózis 10 Gy volt.

2.7. Szisztémás GVHD indukciója

A szisztémás GVHD indukciójához a recipienseket a farokvénán keresztül 0.5 ml megfelelő sejtkoncentrációjú donor lépsejtsuszpenzióval oltottuk. A GVHD kifejlődésének jeleit ("kuporgó" testtartás, szőrborzolódás, az állatok csökkent aktivitása, egyes törzskombinációkban bőrtünetek) naponta regisztráltuk, a recipiensek testsúlyát heti egyszer mértük. Az elhullott állatokat felboncoltuk. A megfigyelési idő a legtöbb kísérletben hat hónap volt.

2.8. Lokális GVHR indukciója

A lokális graft-versus-host reaktivitást popliteális nyirokcsomó-megnagyobbodási tesztben mértük. A donor lépsejtsuszpenziót a recipiensek bal lábfejebe oltottuk s.c. A kilencedik napon az állatokat megöltük, mindkét oldali popliteális nyirokcsomót eltávolítottuk, megtisztítottuk a kötőszövettől és analitikai mérleggel lemértük. Kontrollként az oltatlan jobb oldali nyirokcsomó szolgált.

2.9. A vizelet proteintartalmának meghatározása

A vizelet fehérjetartalmát Medi-Test Combi 9 humán diagnosztikus csíkkal (Macherey-Nagel, Düren, Németország) vizsgáltuk.



2.10. Hybridomafelülűszók előállítása

A használt hybridomavonalakat (felsorolásuk a 2.11. pontban) komplett RPMI tápfolyadékban (RPMI 1640 tápfolyadék + 10% magzati borjúsavó (Gibco, Paisley, Anglia) + 10 mol HEPES (N-[2-hydroxietyl]piperazin-N'-[2-etánszulfonsav], Sigma, St. Louis, MO, USA) + 5×10^{-5} mmol 2-merkaptotanol (Sigma) + 2 g/l NaHCO_3 + 10^5 IU/l penicillin + 0.1 g/l streptomycin) CO_2 termosztátban, 5% CO_2 -tartalom mellett tenyésztettük. A felülűszókat centrifugálással választottuk el a sejtektől, majd a felhasználásig -20°C -on tároltuk őket.

2.11. Indirekt immunfluoreszcenciás jelölés és flow cytometria

Az első lépésben használt ellenanyagok a következők voltak: anti-Thy-1 (59-AD-2.2 klón), anti-L3T4 (CD4, H129.19 klón), anti-Lyt 2 (CD8, 53-6.7 klón), anti-B220 (CD45R, RA3-6B2 klón) (18). Az immunfluoreszcenciás jelölés és az azt követő analízis van Ewijk módszerével történt (19). Gömbölyű fenekű mikrotitráló lemez lyukaiba $25 \mu\text{l}$ 10^7 sejt/ml koncentrációjú sejtszuspenziót és $25 \mu\text{l}$ higítatlan hybridomafelülűszót mértünk. 30 perc 4°C -on történő inkubálás után a sejteket háromszor mostuk $200 \mu\text{l}$ 5% FCS-t és 0.1 % NaN_3 -ot tartalmazó, foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS). A mosás úgy történt, hogy a lemezt 350 g centrifugális gyorsulás mellett egy percre centrifugáltuk, a felülűszót eltávolítottuk és a sejteket a lemez kocogtatásával a maradék tápfolyadékban felfuszpendáltuk. Ezután a sejtekre $50 \mu\text{l}$ kétszázszoros hígítású fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) konjugált anti-patkány IgG-t mértünk (Sigma, St. Louis, MO, USA), amihez a B-sejteken levő egér IgG-vel való keresztreakció által okozott háttérfluoreszcencia csökkentésére 2% normál egérsavót adtunk. Negatív kontrollként normál patkánysavó ezerszeres hígítását és az előhívóellenanyagot

használtuk. A lemezeket ismét 30 percig inkubáltuk 4 C⁰-on. Három újabb mosás után a sejteket 200 µl FCS-mentes médiumban felfuszpendáltuk. A flowcytometriás analízis Becton Dickinson Facstar Plus készülékkel történt.

2.12. Az *in vitro* proliferációs kapacitás mérése timidininkorporációs tesztben

A lépsejtek tenyésztése gömbölyű fenekű mikrotitráló lemezen (Greiner, Frickenhausen, Németország) történt. Lyukanként 2×10^5 sejtet vittünk be 200 µl komplett RPMI tápfolyadékban. Minden mintából öt párhuzamos készült. A sejteket concanavalin A-val (Con A, Pharmacia, Uppsala, Svédország) stimuláltuk, a Con A koncentráció 5 µg/ml volt. A lemezeket 72 órán át CO₂ termosztátban inkubáluk 37 C⁰-on, 5% CO₂ koncentráció mellett. Nyolc órával az inkubációs idő lejárta előtt a mintákat lyukanként 1 µCi aktivitású ³H-metil-timidinnel jelöltük (UVVR, Prága, Csehország). Az inkubációs idő leteltével a sejteket Titertek sejtharveszterrel üvegszálas filterpapírra vittük. A filtert 110 C⁰-n történt 15 perces hevítéssel víztelenítettük és fixáltuk, majd a filterkorongokat Wheaton szcintillációs küvetákba tettük. A mérés általunk készített szcintillációs koktélaban /0.5 g/l 1,4 di(2-(5-fenil)-oxazoil)benzol (POPOP) és 5 g/l 2,5 difenil oxazol (PPO) toluolos oldata/, Beckman LS-100C folyadékszcintillációs spektrofлуoriméterrel történt.

2.13. Lépsejtek tenyésztése citokintermelésük meghatározására

A lépsejtszuszenziókat lapos fenekű mikrotitráló lemezben (Greiner), 5 µg/ml Con A koncentráció mellett, komplett RPMI tápfolyadékban, CO₂ termosztátban 24 órán át tenyésztettük. Lyukanként 5×10^5 sejtet mértünk be 200 µl tápfolyadékban. Minden szuszenzióból hat párhuzamos minta készült, ezeket az inkubálási idő letelte után egyesítettük, lecentrifugáltuk, a felülúszókat lefagyasztottuk és a további felhasználásig -70 C⁰-on tároltuk (20).

2.14. TNF- α meghatározás WEHI164 tesztel

A TNF- α citotoxikus hatására érzékeny WEHI164 sejteket lapos fenekű mikrotitráló lemezen (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) komplett RPMI tápfolyadékban, CO₂ termosztátban egy éjszakán át inkubáltuk (lyukanként 5×10^4 sejt 100 μ l térfogatban). A sejtek letapadását és vitalitását inverz mikroszkóppal ellenőriztük. Ezután hozzáadtuk a standard TNF- α hígítást és a mintákat (50 μ l hígítatlan felülúszót, illetve ötszörösére hígított savót), valamint 50 μ l 20 μ l/ml-es actinomycin D (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatot. Újabb 24 óra eltelte után a sejtek vitalitását MTT tesztel határoztuk meg: A lyukakba 30 μ l 5 mg/ml koncentrációjú MTT reagenst (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium bromid, Sigma, St. Louis, MO, USA) mértünk. 3,5 óra eltelte után a lemezeket lecentrifugáltuk, a felülúszót leszívtuk, majd a sejtekből a redukált MTT reagenst 100 μ l DMSO-val (dimetilszulfoxid, Sigma) szabadítottuk fel. Az optikai denzitást Titertek Multiskan ELISA readerrel, 510 nm hullámhosszon mértük le.

2.15. IFN-gamma, IL-10 és IL-4 meghatározás ELISA-val

Valamennyi ELISA tesztet aktivált PVC mikrotitráló lemezen (Flow laboratories, Irvine, Anglia) "szendvics ELISA" technikával végeztük. A következő monoklonális ellenanyagokat használtuk: Az IFN-gamma meghatározáshoz: XMG 1.2, 2 μ g/ml; biotinnal konjugált R46-A2, 1 μ g/ml. Az IL-4 meghatározáshoz: 11B11, 5 μ g/ml; biotinnal konjugált BVD24G2.3, 0.25 μ g/ml. Az IL-10 meghatározáshoz: SXL-1, 1 μ g/ml; biotinnal konjugált SXL-2, 1 μ g/ml (21, 22, 23). Az első ellenanyaggal történt bevonást egy éjszakán át, 4 °C-on végeztük. Ezt 2% marha szérumalbumin (BSA) tartalmú PBS-sel történő telítés követte (1 óra, szobahőmérsékleten), majd a vizsgálandó hígítatlan felülúszók

hozzáadása (2 óra, szobahőmérsékleten). Ezután a lemezeket 1% BSA-t és 0,02% Tween 20 detergenst tartalmazó PBS-sel mostuk, majd a biotinnal jelölt második ellenanyaggal inkubáltuk. Az inkubációs idő az IL-10 és az IL-4 mérése esetében 1 óra, az IFN mérés esetében 12 óra volt. Mosások után a streptavidin-tormaperoxidáz konjugátum (Jackson, West Grove, PA, USA) hozzáadása következett (1 óra szobahőmérsékleten), majd újabb mosások után 100 μ l ABTS szubsztrát - 0,025 M NaH_2PO_4 -ot, 0,05 M citromsavat és 3×10^{-5} M H_2O_2 -ot tartalmazó pufferben feloldott 1 mg/ml ABTS /2,2-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-szulfonát), Sigma, St. Louis, MO, USA/ - hozzáadása következett. A reakció leállítására 50 μ l 0,2 M-os citromsavat használtunk. Az optikai denzitást Titertek Multiskan ELISA leolvasóval mértük le 405 nm hullámhossznál.

2.16. Statisztikai analízis

A számításokhoz a Graphpad Instat statisztikai programot használtuk. Az adatok összehasonlítása t próbával, Mann-Whitney statisztikával illetve Fisher Exact teszttel történt. A különbségeket $p < 0,05$ esetében tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

3. EREDMÉNYEK

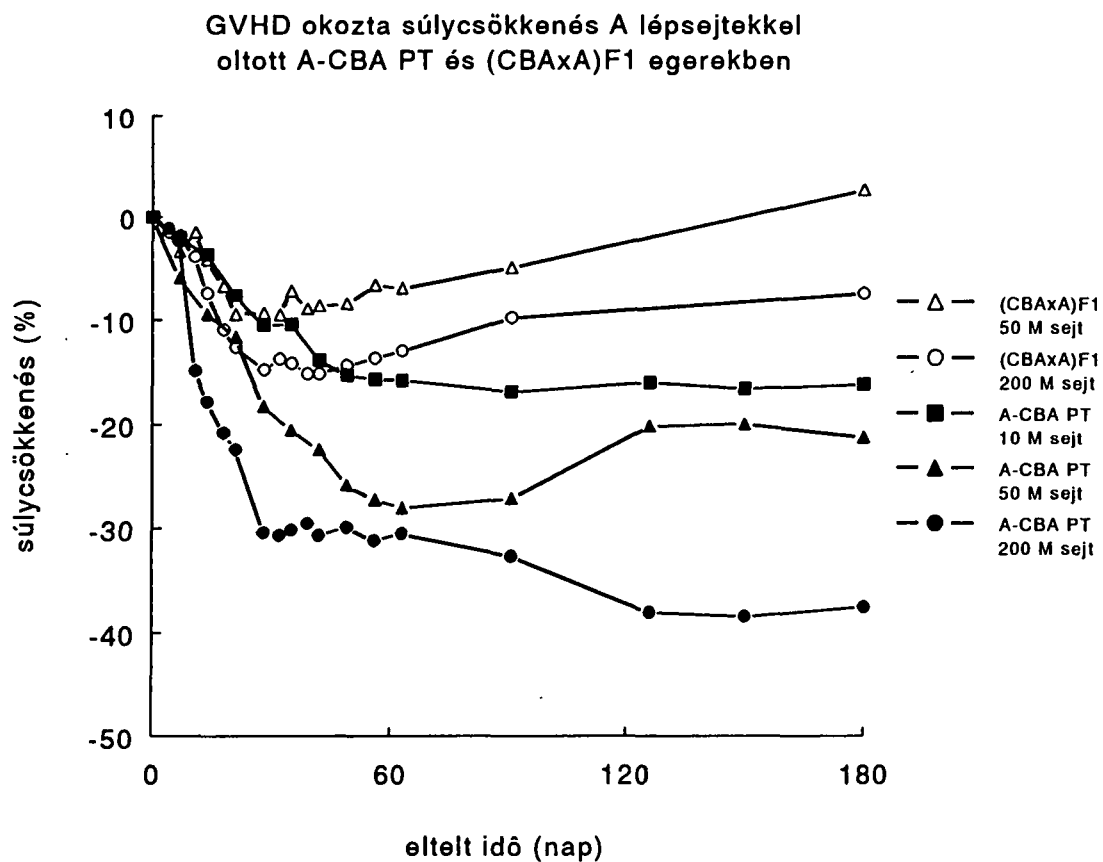
3.1. Az A-CBA PT recipiensek érzékenyek, míg a (CBxA)F₁ recipiensek rezisztensek az A lépsejtek GVHD-t okozó hatásával szemben

Az A transzplantációs antigénekkal szemben újszülöttkori toleráns CBA és a (CBxA)F₁ hibrid recipiensek elvileg egyaránt érzékenyek az A lépsejtek által kiváltható GVHD-re. A kétféle recipiens GVHD-vel szembeni szenzitivitásának összehasonlítására az egereket A lépsejtek különböző dózisaival oltottuk

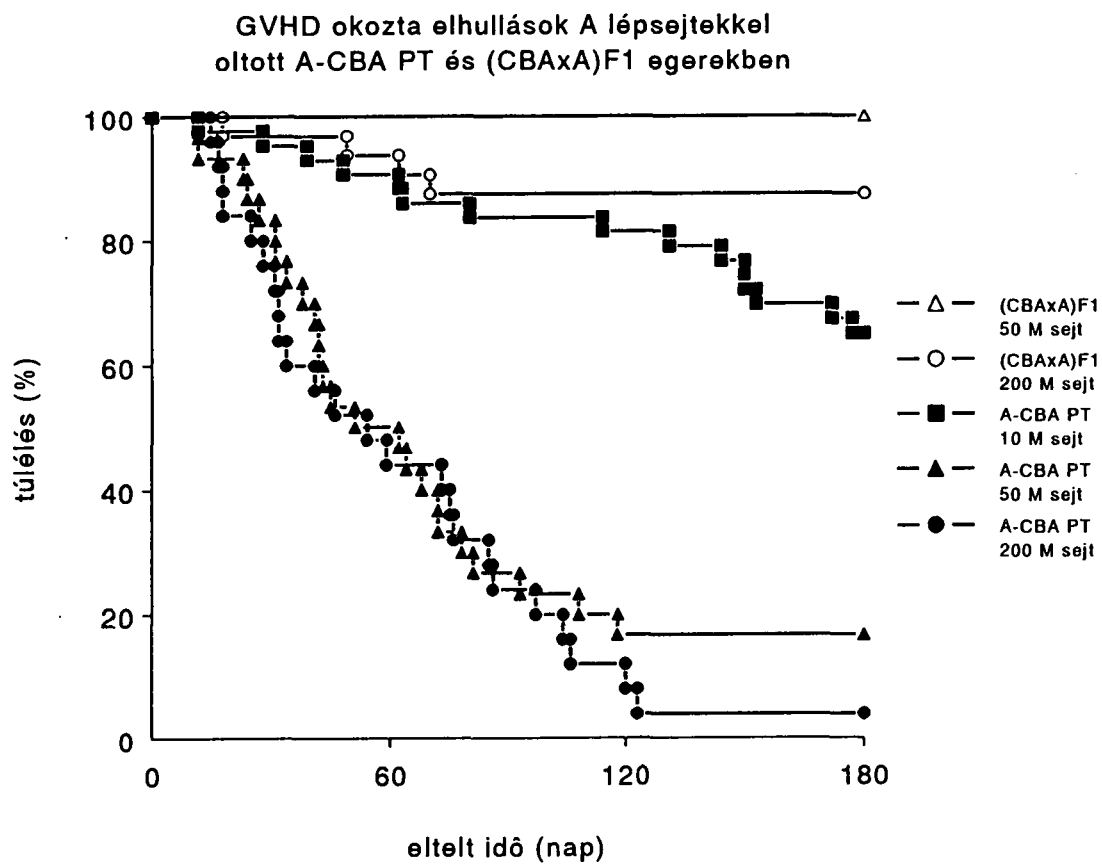
intravénásan. A toleráns recipiensekben a súlyos GVHD tünetei alakultak ki: fogyás, szőrborzolódás, kuporgó testtartás. Az átlagos súlycsökkenés már a legalacsonyabb sejtdózissal, 10^7 lépsejttel oltott toleráns recipiensekben is elérte a 15%-ot, míg 5×10^7 , illetve 2×10^8 donor sejt esetében megközelítette, illetve meghaladta a 30%-ot (1. ábra). A toleráns túlélők testsúlya még hat hónappal a GVHD-indukció után sem normalizálódott. A mortalitás a 10^7 sejttel oltott állatokban elérte a 35%-ot (15/43), az 5×10^7 lépsejttel oltott állatok esetében a 83%-ot (25/30), míg 2×10^8 donor sejt esetében a 96%-ot (24/25) (2. ábra). Az elhullott és felboncolt állatok lymphoid szervei enyhén zsugorodottak voltak. Ezzel szemben az F₁ recipienseket gyakorlatilag rezisztensnek találtuk a letális GVHD-val szemben. Itt 5×10^7 A lépsejt 10%-os, míg 2×10^8 sejt is csak 15%-os átmeneti súlycsökkenést okozott. A betegségnek egyéb látható tünete nem volt. Az alacsonyabb sejtdózis esetében egy recipiens sem pusztult el (0/10). A 2×10^8 lépsejttel oltott állatoknak is mindössze 12%-a (4/32) hullott el. A GVHD okozta esetleges vesekárosodást vizsgálva az indukció után három hónappal megállapítottuk a recipiensek vizeletének proteintartalmát. A vizelet fehérjetartalma mind a toleráns, mind az F₁ hibrid egerek esetében 300 - 1000 mg/l körül mozgott, ez megegyezik a kezeletlen kontroll egerekben talált értékkel. Megjegyzendő, hogy a kezeletlen állatok vizeletének fehérjetartalma minden egértörzs esetében magasabb az emberi normál értéknél.

Anak eldöntésére, hogy a toleráns recipiensek GVHD-val szembeni szenzitivitását valóban az A lépsejtekkel szembeni specifikus válaszképtelenség okozza-e, az A-CBA PT recipiensek egy részét 5×10^7 'third party' - B10 - lépsejttel oltottuk, ebben az esetben nem lépett fel GVHD (0/7, nem ábrázoltuk).

1. ábra



2. ábra



3.2. A GVHD mechanizmusának *in vitro* vizsgálata

A két rendszerben kiváltott GVHD összehasonlító vizsgálatához toleráns és F₁ hibrid recipienseket oltottunk egyidejűleg 5×10^7 A lépsejttel. A kiváltás után 1, 2, 4 és 8 héttel csoportonként három-három egeret kiemeltünk és feldolgoztunk. Savójukat a későbbi vizsgálatokhoz egyedileg gyűjtöttük és -20 C⁰-on tároltuk. Három egymástól független kísérletet végeztünk, ezek adatait később összevontuk. A recipiensek lépéből steril egyedi sejtszuszpenziókat készítettünk, majd a következő vizsgálatokat végeztük el: 1. Megállapítottuk a lép magvas sejtszámát. 2. Hogy a graft-versus-host reakcióban részt vevő sejtekről kapjunk információkat, flow cytometriás módszerrel megvizsgáltuk a lépét alkotó lymphoid sejtszubpopulációk arányát. 3. Annak vizsgálatára, hogy rendszereinkben fellép-e a GVHD-t gyakran kísérő immunszuppresszió, 72 órás timidininkorporációs tesztben mértük a lépsejtek spontán és Con A indukálta proliferációs kapacitását. 4. Annak megállapítására, hogy a reakció kialakulásában mely citokineknek lehet szerepe, a lépsejteket Con A jelenlétében 24 órán keresztül tenyésztettük, majd a felülúszókat a citokintermelés meghatározására összegyűjtöttük. A celluláris és humorális immunválasz szabályozásában fontos szerepet játszó citokinek (IL-4, IL-10 és IFN-gamma) *in vitro* termelődését vizsgáltuk, valamint a GVHD kialakulásában számos esetben ismert szerepű nekrozis faktor- α szintjét mértük mind a felülúszókban, mind a recipiensek vérsavójában. Az IL-4, az IL-10 és az IFN-gamma meghatározása ELISA módszerrel történt. A TNF- α szint mérésére a TNF citotoxikus hatására érzékeny WEHI168 sejtvonalra épülő tesztet használtuk.

3.2.1. A GVHD során a lép magvas sejtszáma esett

A GVHD kiváltása utáni hetedik napra a lép magvas sejtszáma átmenetileg mind a toleráns, mind az F₁ hibrid recipiensekben kevéssel emelkedett. Az

átmeneti felszaporodást követően a magvas sejtszám körülbelül a kiindulóérték felére esett le. A változások kinetikája a két rendszerben hasonló volt (3. ábra). A magvas sejtszám csökkenése ellenére a lép mérete a megnövekedett vörösvértesttartalom következtében nem csökkent jelentősen (nem ábrázoltuk).

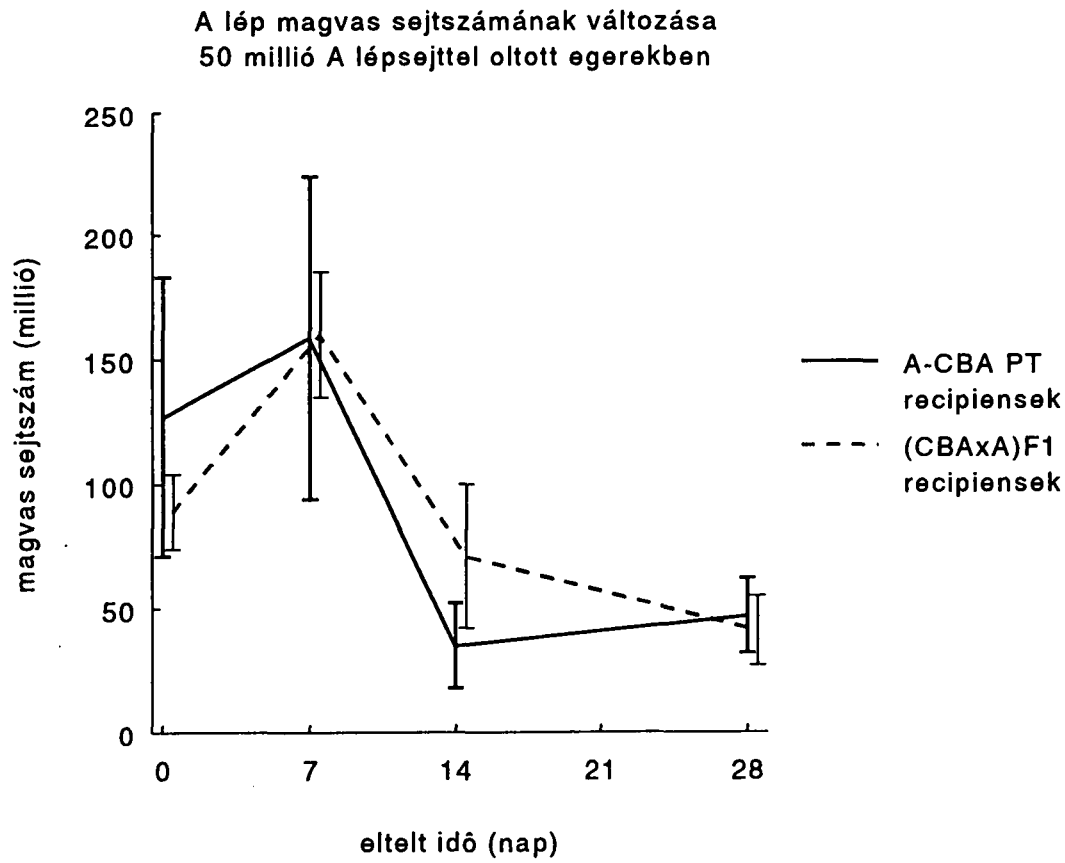
3.2.2. A lépben a CD8+ sejtek átmeneti felszaporodását követően a lymphoid (T+B) sejtek aránya csökkent

A lép sejtösszetétele a toleráns és az F₁ hibrid recipiensekben hasonló változásokat mutatott, de a változások kinetikája a két rendszerben különböző volt. A reakciót mindkét rendszerben a CD8+ sejtek százalékos arányának kezdeti megnövekedése kísérte (4. és 5. ábra). A CD8+ sejtek felszaporodása a toleráns recipiensekben az első héten, míg az F₁ hibridekben a második héten érte el csúcspontját. A magvas sejtek számára és a sejtszubpopulációkra vonatkozó adatokat összevetve látható, hogy a CD8+ sejtek kezdeti felszaporodása nem csak arányuk, hanem számuk megnövekedésével is járt. A CD4+ és a B-sejtek aránya (és ezzel együtt abszolút számuk) a kiváltástól kezdve folyamatosan csökkent. A negyedik hétre a lymphoid (B220+, CD4+ és CD8+) sejtek aránya körülbelül a kiinduló érték harmadára esett le.

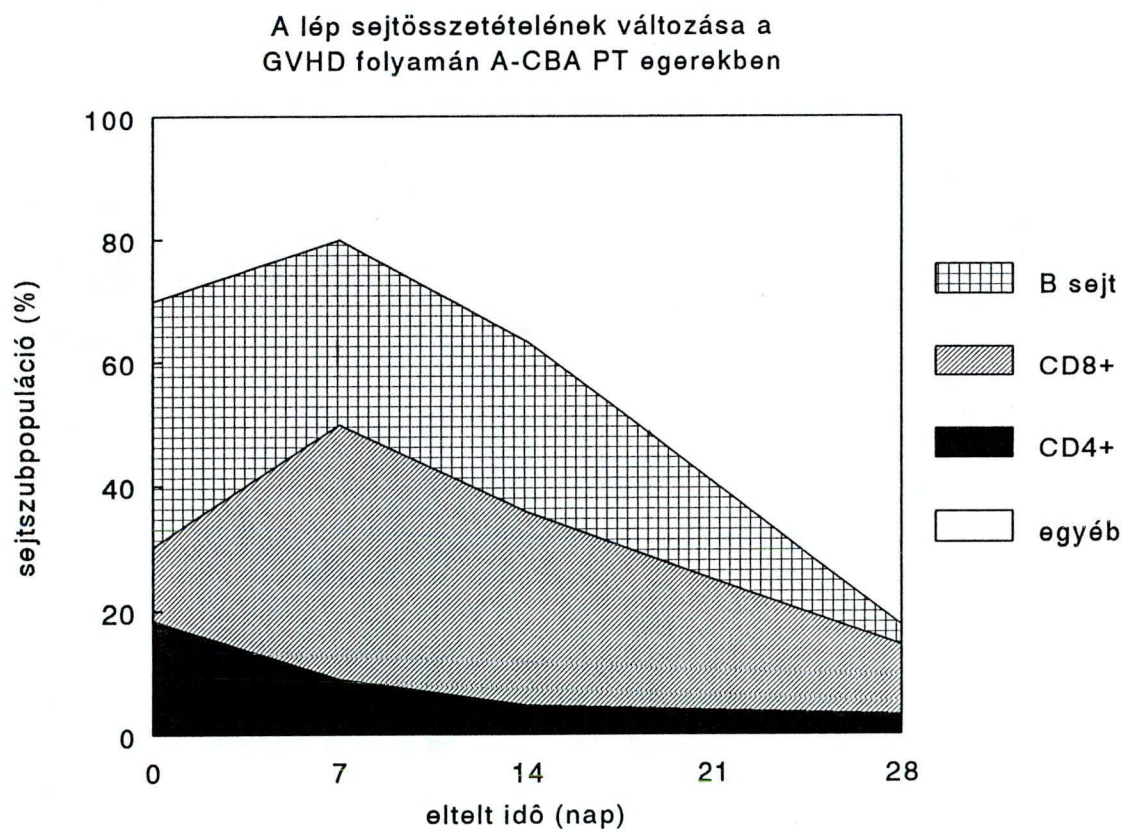
3.2.3. A reakció során csökkent a lépsejtek *in vitro* proliferációs kapacitása.

A toleráns recipiensek esetében a lépsejtek 72 órás tesztben mért Con A indukálta proliferációja már a kiváltás utáni első héttől csökkenni kezdett (6. ábra). Az F₁ hibrid recipiensekben ez a csökkenés csak a negyedik héten következett be (7. ábra). A spontán proliferáció mindkét rendszerben gyakorlatilag az első héttől megszűnt (8. és 9. ábra). A Con A a T-sejtekre ható mitogén. A GVHD során a

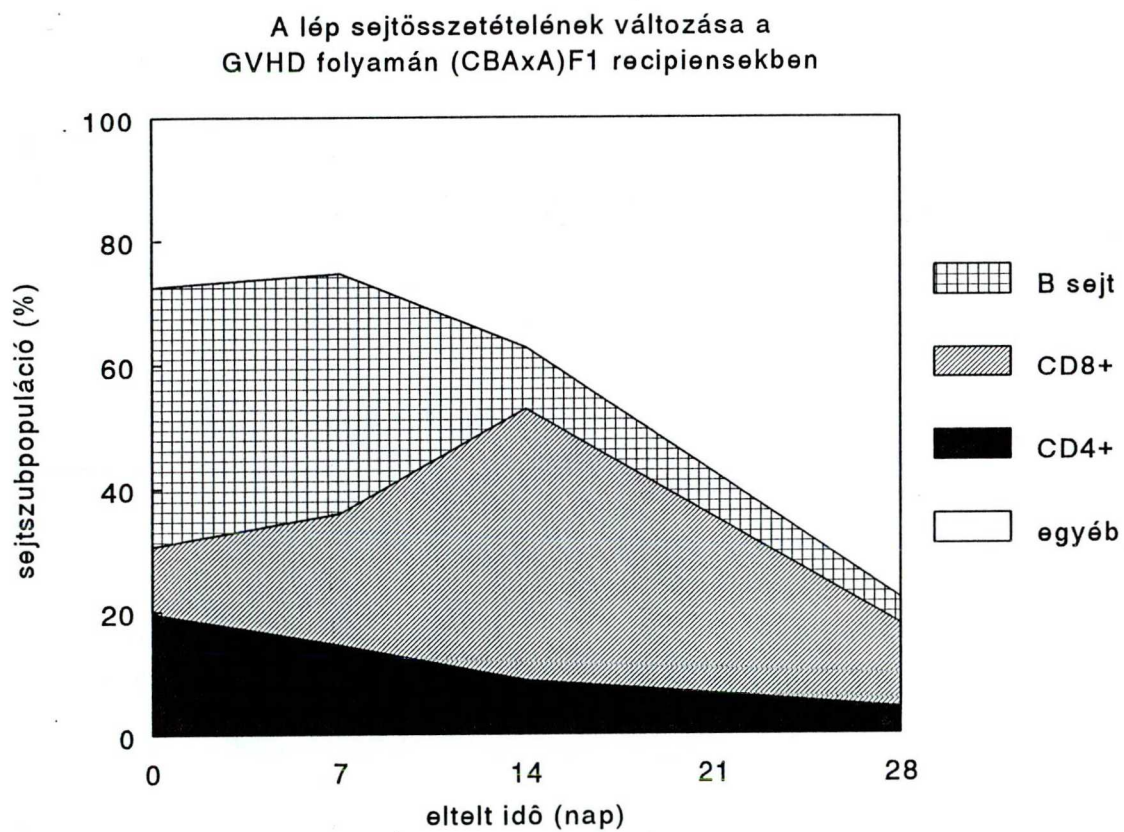
3. ábra



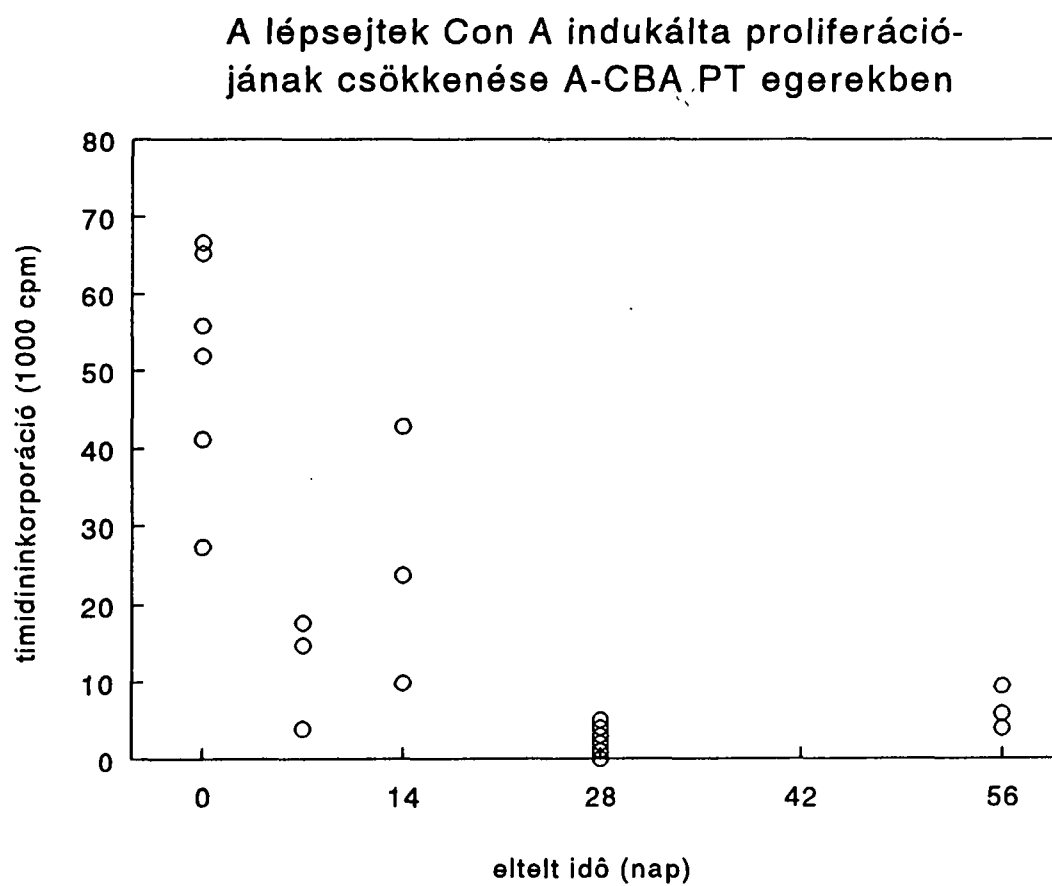
4. ábra



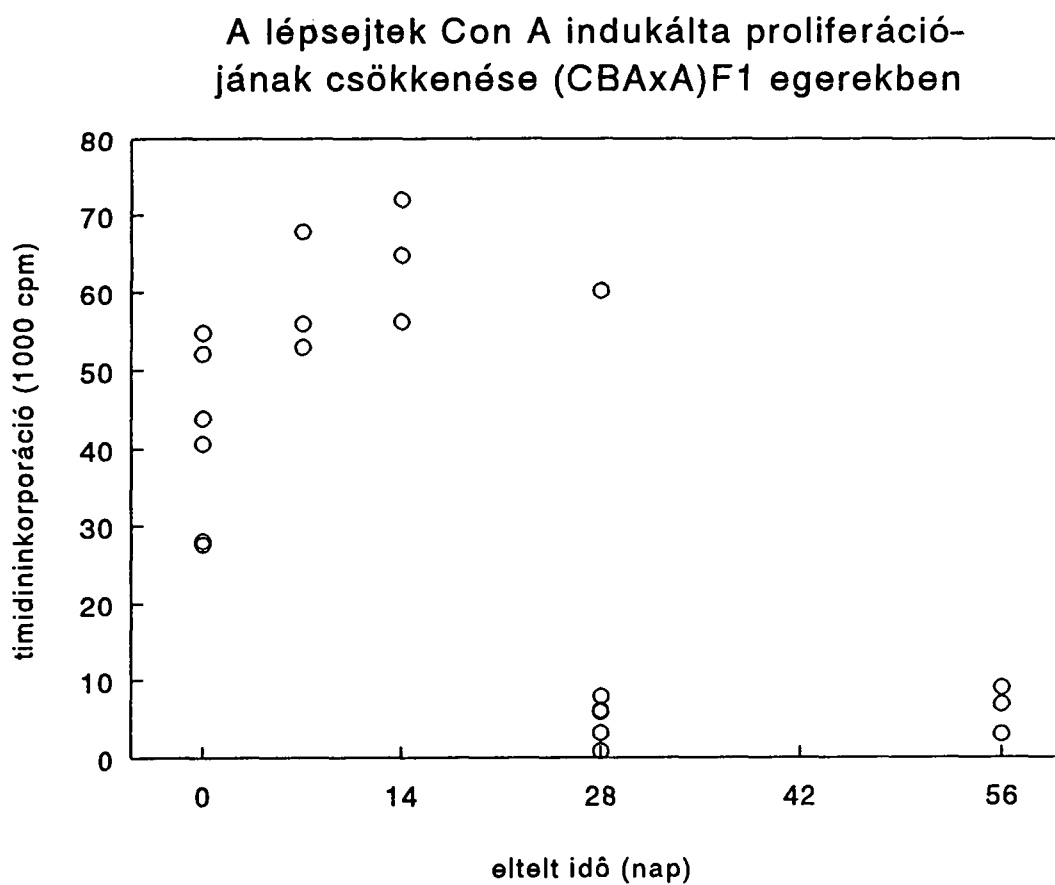
5. ábra



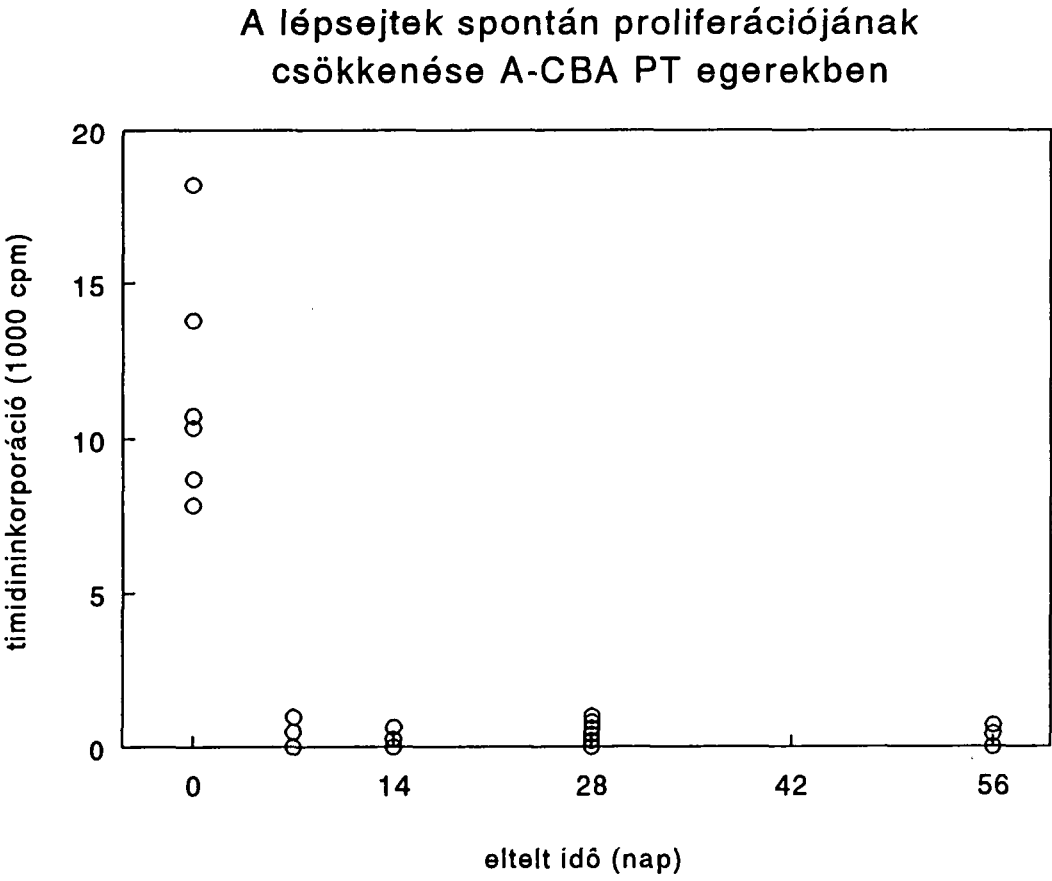
6. ábra



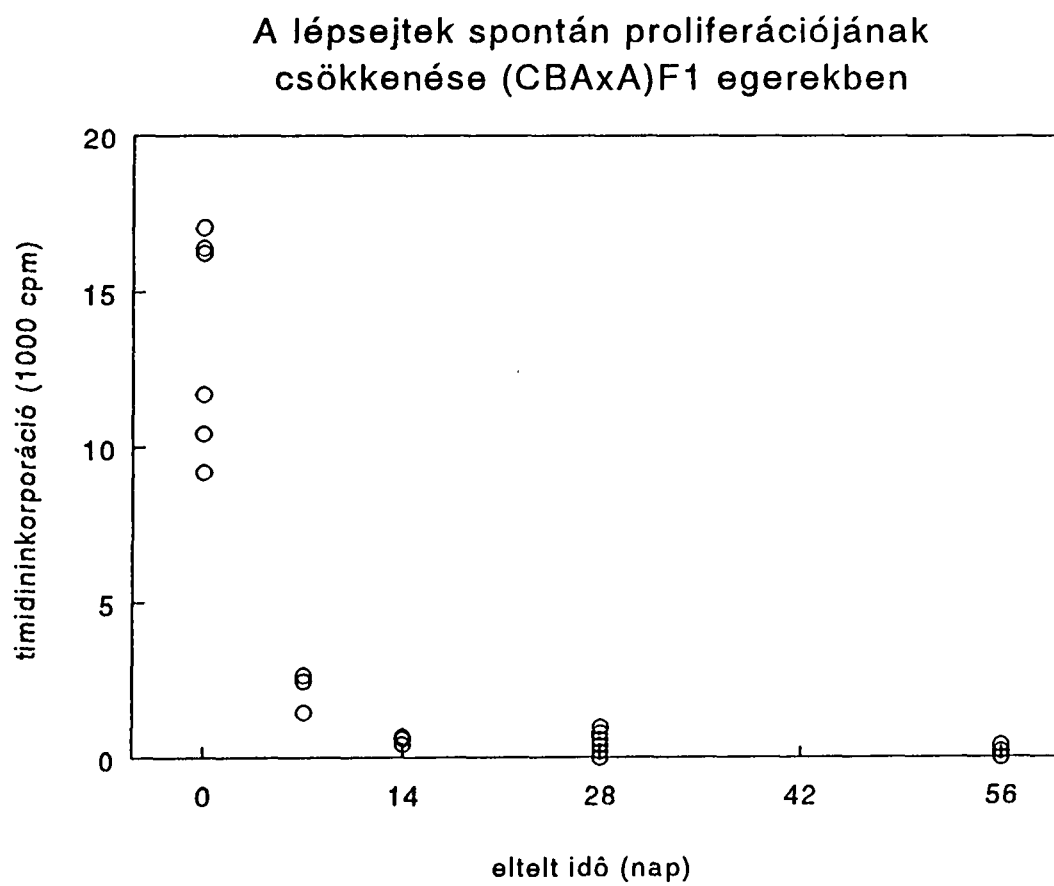
7. ábra



8. ábra



9. ábra



lép T-sejt számában a flow cytometriás vizsgálatok során (4. és 5. ábra) nem találtunk olyan mértékű változást, amely akár a proliferációs kapacitás drasztikus csökkenését, akár a két rendszerben lezajló változások kinetikája közti különbséget önmagában megmagyarázná.

3.2.4. A lépsejtek citokintermelése a GVHD során

A lépsejtszuspenziók *in vitro* citokintermelését 24 órás, Con A jelenlétében történt tenyésztés után mértük. A IL-4, az IL-10 és az IFN-gamma esetében a kiváltás után 7 és 14 nappal (vagyis a Con A indukálta proliferáció gyakorlatilag teljes megszűnte előtt) vizsgáltuk a termelt mediátorok szintjét, míg a TNF- α esetében a reakció negyedik hetében is elvégeztük a feldolgozást, továbbá a szérum TNF- α szintjét is meghatároztuk.

A lépsejtek IFN-gamma termelése mindkét rendszerben esett a reakció során, a változás a kiindulóértékhez képest szignifikáns volt. A toleráns és az F₁ hibrid állatok lépsejtjeinek IFN-gamma termelése között nem volt különbség (10. ábra).

Az IL-4 termelés kiindulóértékét a kezeletlen F₁ hibridek esetében a toleránsokénál szignifikánsan magasabbnak találtunk. A GVHD során az F₁ lépsejtek által termelt IL-4 szintje esett, ez a változás az egyedi értékek nagy szórása miatt nem volt szignifikáns. A reakció során a toleráns és az F₁ hibrid recipiensek IL-4 termelése közti különbség csökkent (11. ábra).

Az IL-10 termelés kiindulószintje az IL-4-ével ellentétben a toleráns állatok esetében volt szignifikánsan magasabb. A toleránsokban a magas IL-10 termelés a reakció során szignifikánsan csökkent, míg az F₁ hibridekben változatlan IL-10 termelést mértünk. A második hétre a két rendszer közti különbségek itt is kigyenlítődték (12. ábra).

A lépsejtek *in vitro* TNF- α termelésénben az egyedi különbségek mind a kezeletlen állatok, mind a GVHD-ben szenvedő recipiensek esetében igen nagyok

voltak. Az első és a második héten gyakorlatilag nem észleltünk mérhető TNF- α termelést, majd a negyedik héten ismét detektálható mennyiségű TNF- α jelent meg a szupernatánsokban. A toleráns és az F₁ hibrid recipiensek között különbséget nem találtunk (13. ábra). A TNF- α szérum szintje gyakorlatilag nem változott a reakció során, a toleráns és az F₁ hibrid recipiensek értékei közt itt sem volt szignifikáns különbség (14. ábra).

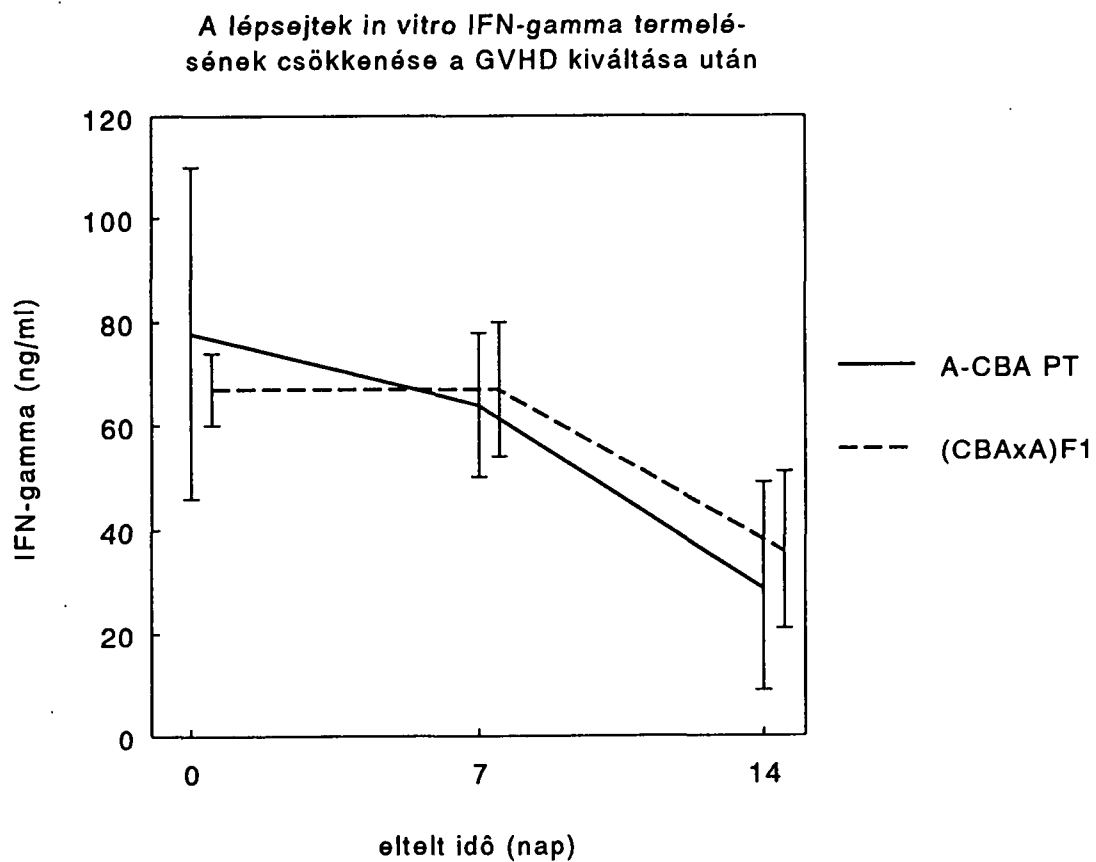
3.3. A toleráns és az F₁ hibrid állatokban azonos intenzitású lokális GVHR volt kiváltható

Az F₁ recipiensek szisztémás GVHD-vel szembeni rezisztenciájának magyarázatát keresve a toleráns és az F₁ hibrid állatok lokális graft-versus-host reaktivitását is összehasonlítottuk. A lokális GVHR mérésére a kiváltó A lépsejtek különböző dózisait oltottuk a lábfej bőre alá. A popliteális nyirokcsomó-megnagyobbodást dózisonként öt-öt recipiensben indukáltuk. A szisztémás GVHD-vel szembeni különböző érzékenységek ellenére a kétféle recipiensben azonos intenzitású lokális GVHR-t mértünk (15. ábra). A nyirokcsomó-megnagyobbodás mértéke megegyezett más, a szisztémás GVHD-re érzékeny szülő -> F₁ hibrid rendszerekben találttal (saját eredmények, nem ábrázoltuk).

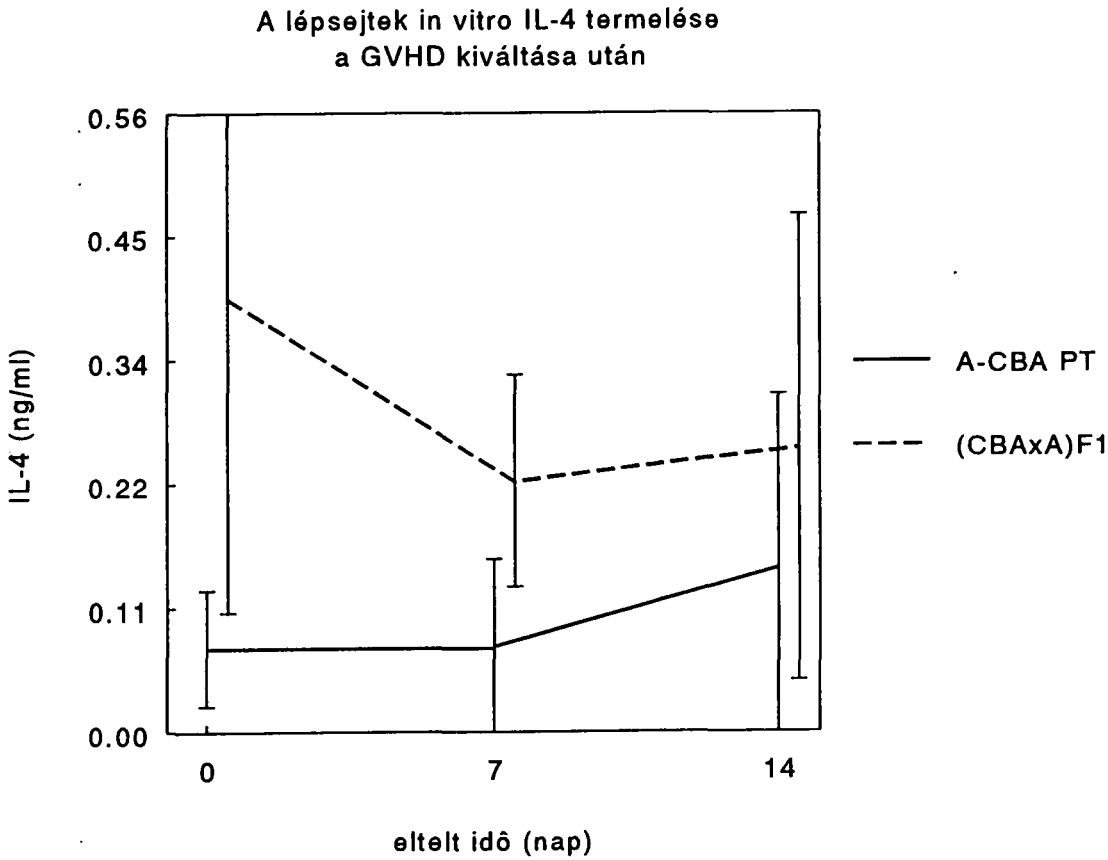
3.4. Az F₁ hibrid recipiensek immunszuppressziója a GVHD-vel szembeni rezisztenciájukat nem befolyásolta

Felmerült annak az elméleti lehetősége, hogy az F₁ hibridek GVHD-vel szembeni rezisztenciájában recipiens eredetű T-sejtes mechanizmusok játszanak szerepet. Ennek vizsgálatára ATS-sel immunszupprimált (2x0.5 ml ATS a kiváltás előtti -14 és -11 napon) F₁ recipienseket oltottunk A lépsejtekkel. Ezt a kísérletet az általunk használt legmagasabb sejtdózissal, 2×10^8 lépsejttel végeztük.

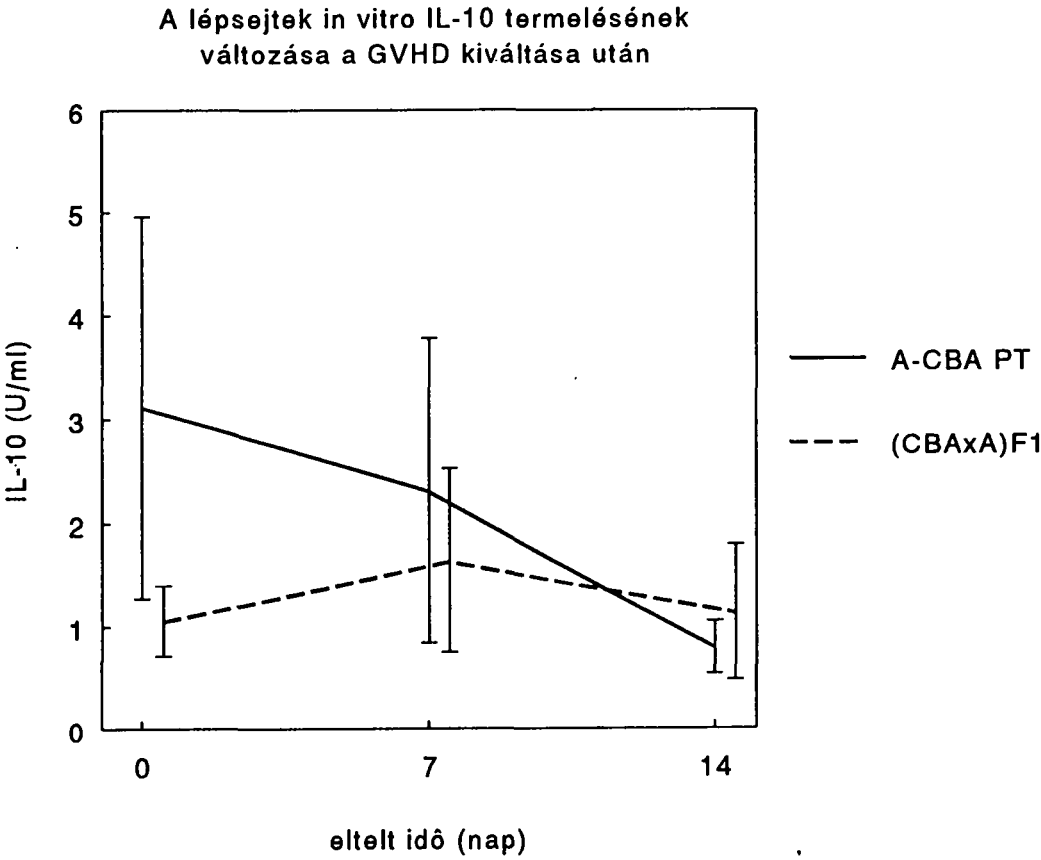
10. ábra



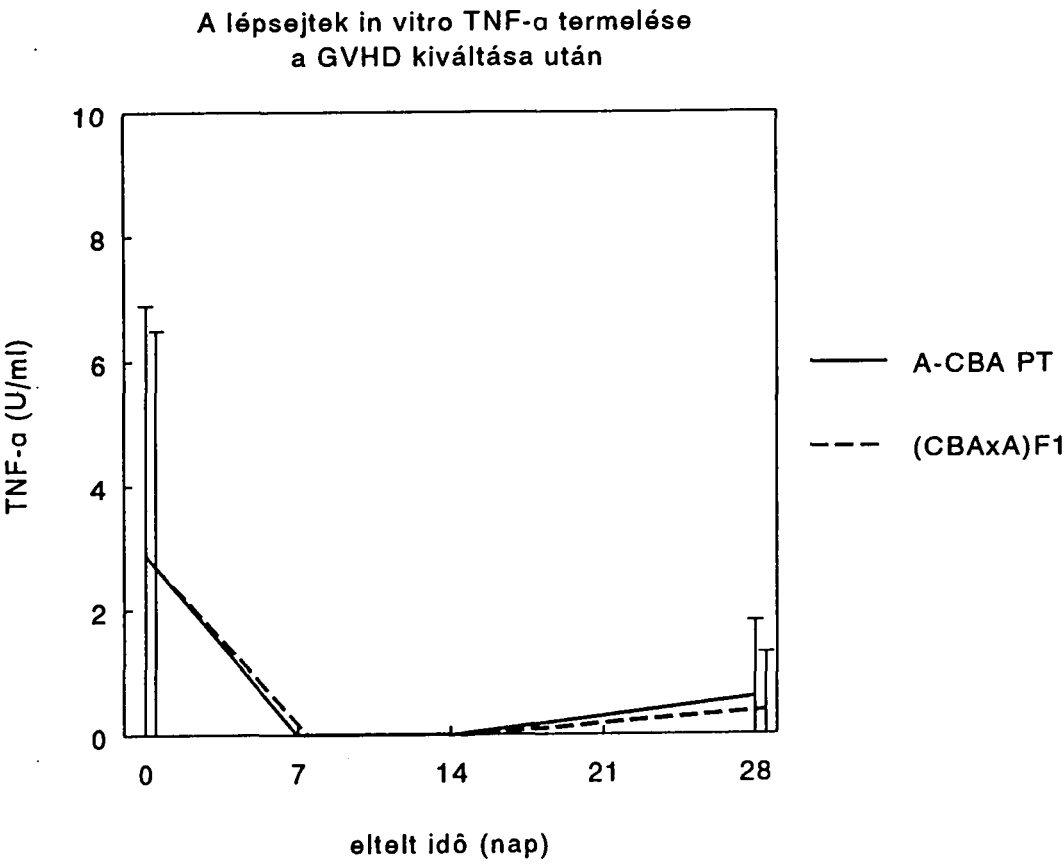
11. ábra



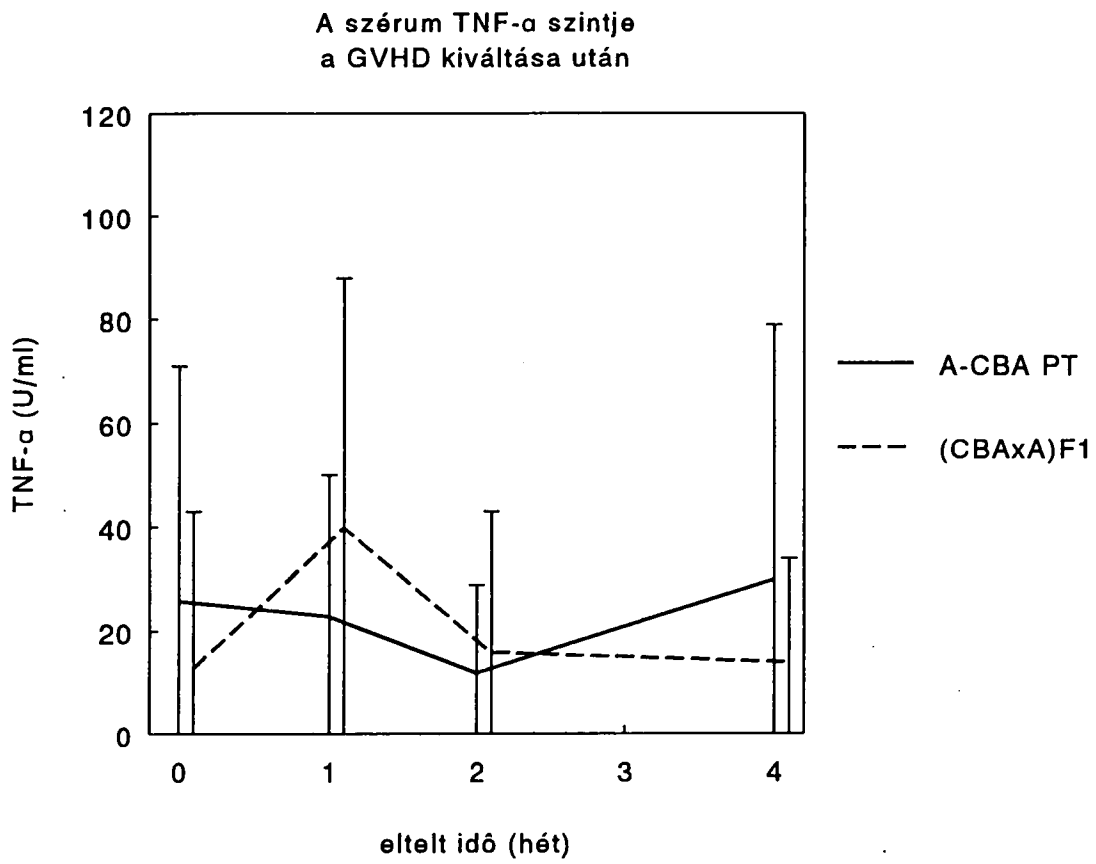
12. ábra



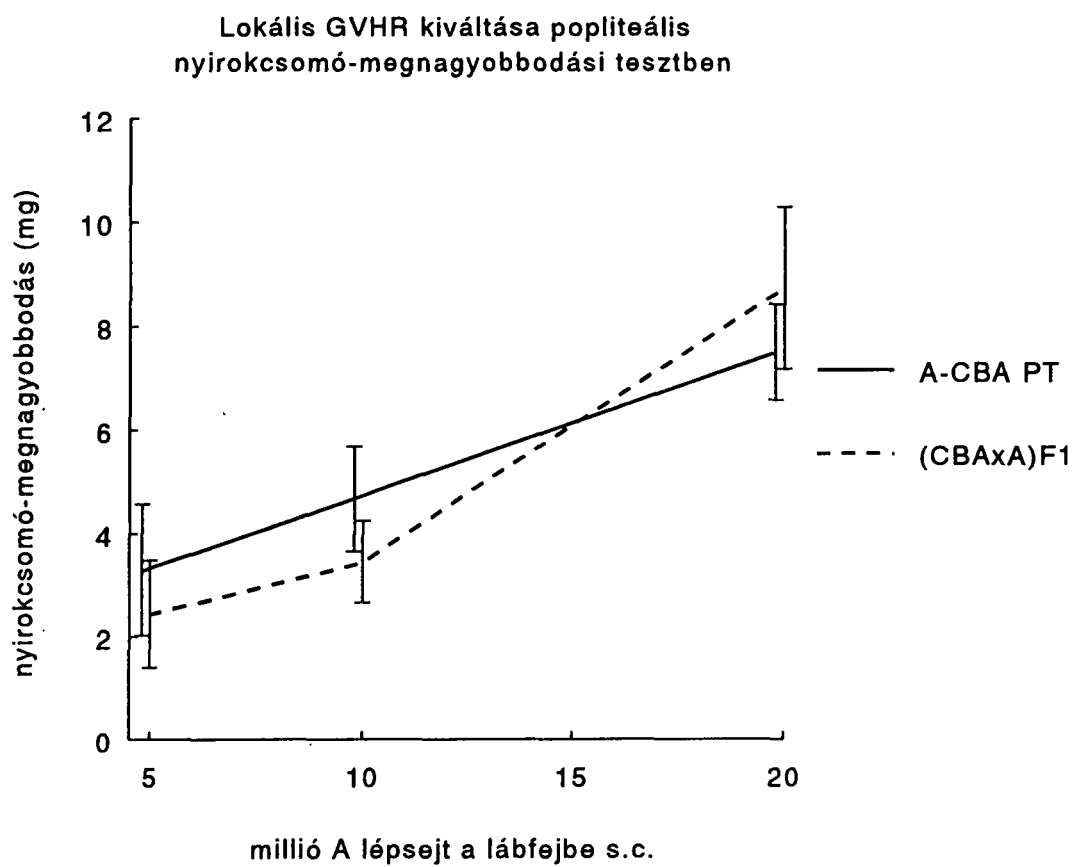
13. ábra



14. ábra



15. ábra



Előző kísérleteinkben ez a sejtdózis az F_1 hibrid recipiensekben nemcsak súlycsökkenést, hanem szórványos elhullásokat is okozott. Az F_1 recipiensek ATS-előkezelése nem befolyásolta a GVHD által előidézett súlycsökkenést (16. ábra), sem az elhullást: ez 1/15 volt az ATS-előkezelt és 1/16 a velük egyidejűleg oltott kezeletlen recipiensek esetében.

3.5. Az F_1 recipiensek GVHD-vel szembeni rezisztenciáját lépsejtek transzferével nem tudtuk a toleráns állatokba átvinni

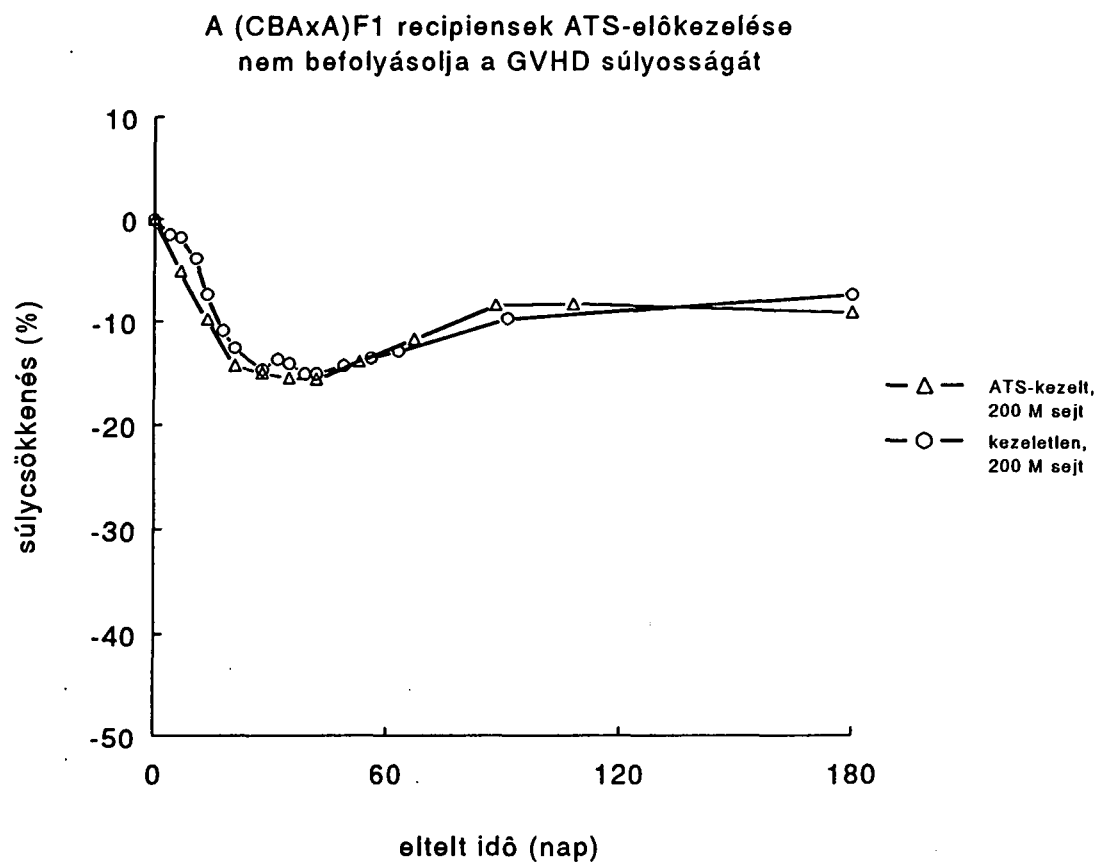
Az esetleges recipiens eredetű, aktív sejtes védekező mechanizmusok vizsgálatára az F_1 recipiensek GVHD-vel szembeni rezisztenciáját lépsejtek transzferével próbáltuk meg a toleráns állatokba átvinni. Az újszülöttkori toleráns recipienseket 5×10^7 A lépsejt és 2×10^8 (CBA $\times$ A) F_1 lépsejt keverékével oltottuk intravénásan. Az így kezelt állatokban fellépő GVHD során mért súlycsökkenés (17. ábra) és mortalitás (11/12, 18. ábra) nem különbözött szignifikánsan a csak 5×10^7 A lépsejttel oltottakban mérttől, vagyis az F_1 állatok rezisztenciáját ezzel a módszerrel nem tudtuk a toleráns recipiensekbe átvinni.

3.6. Az *in vivo* ATS-előkezelt A donorok lépsejtjei nem váltottak ki GVHD-t A-CBA PT recipiensekben

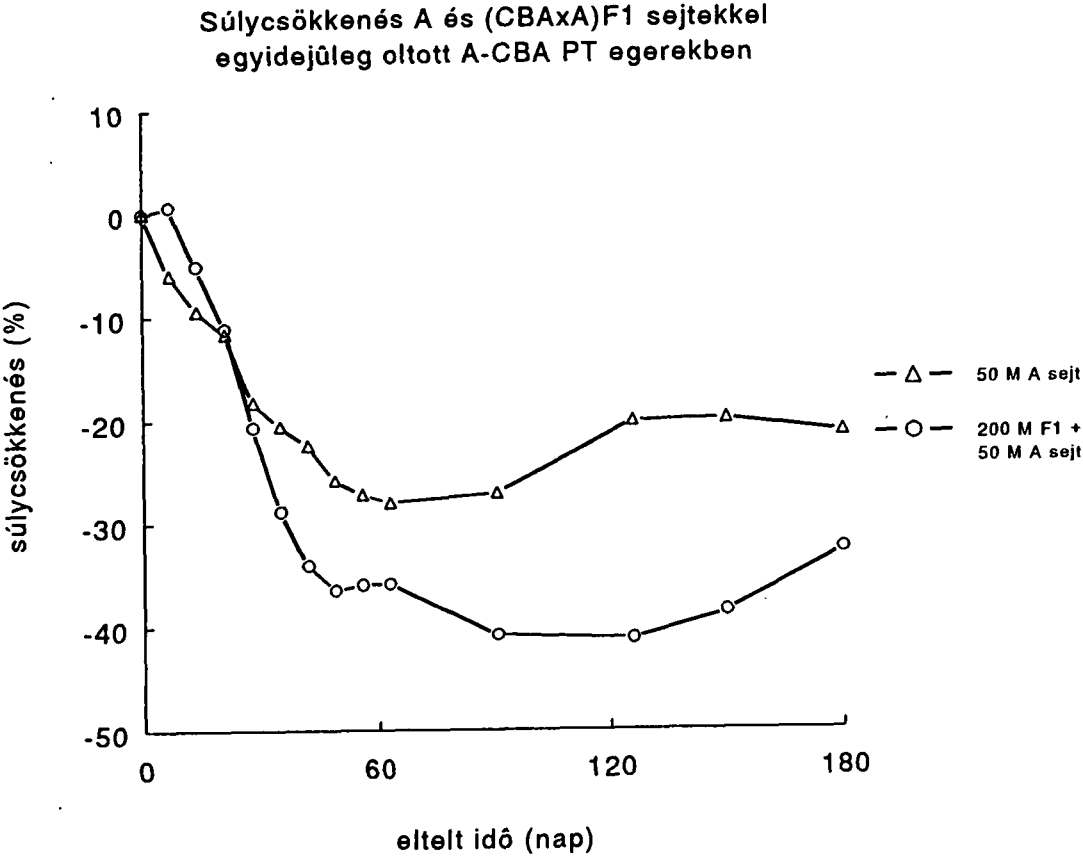
Korábbi kísérleteinkben az *in vivo* ATS-előkezelt donorokból származó lymphoid sejteket többféle sejtranszferen alapuló rendszerben immunológiailag inaktívnak találtuk. Most azt vizsgáltuk meg, hogy ugyanezen kezelés után az állatok lépsejtjei rendelkeznek-e szisztémás GVHD-indukáló aktivitással. Ehhez kísérleteink első csoportjában az általunk leírt és a szisztémás GVHD indukciójára igen alkalmasnak talált A-CBA újszülöttkori toleráns állatokat használtuk. A recipienseket 50 millió normál, illetve ATS-előkezelt donorból származó lépsejttel



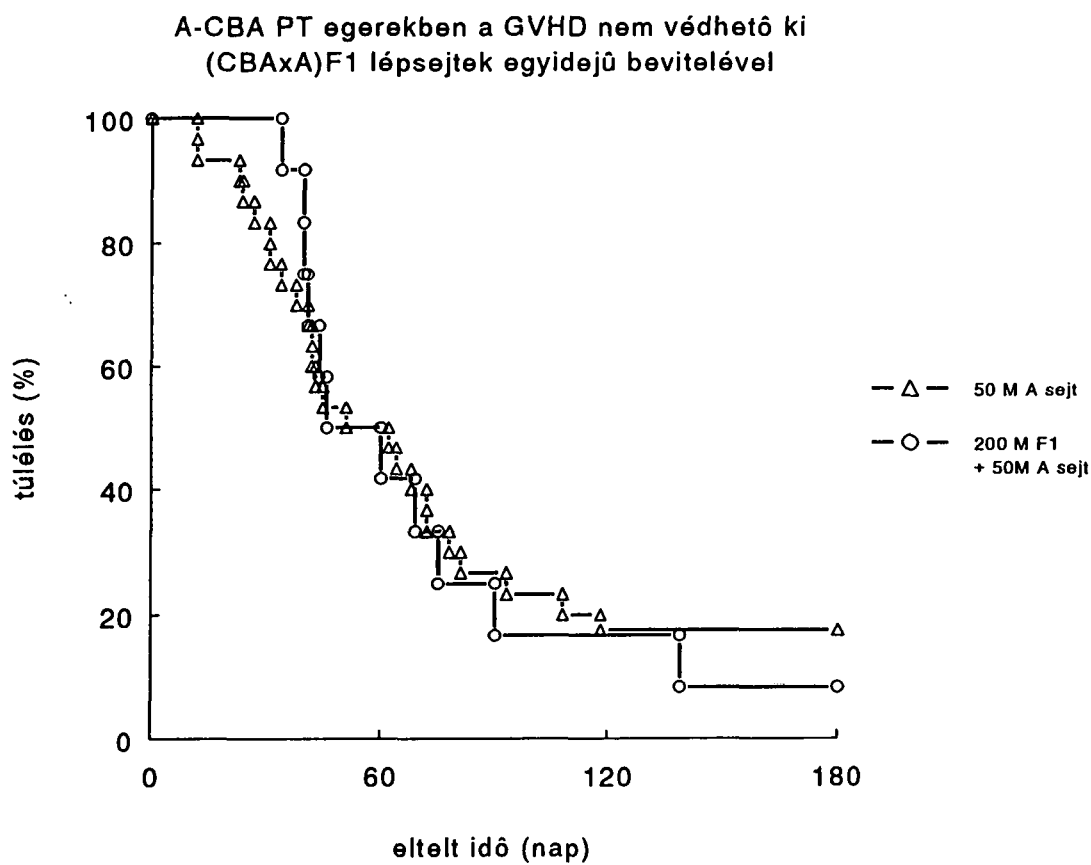
16. ábra



17. ábra



18. ábra



oltottuk. A nyolcadik hétre az átlagos súlycsökkenés a kezeletlen állatok lépsejtjeivel oltott egerekben elérte a 30%-ot. A mortalitás 83% (25/30) volt. Ezzel ellentétben az ATS-kezelt donorból származó sejtekkel oltott toleráns recipiensek esetében súlycsökkenést nem észleltünk és mindössze egy állat hullott el (1/20), tehát az ATS-kezelt donorból származó lépsejtek gyakorlatilag nem váltottak ki GVHD-t (19. ábra).

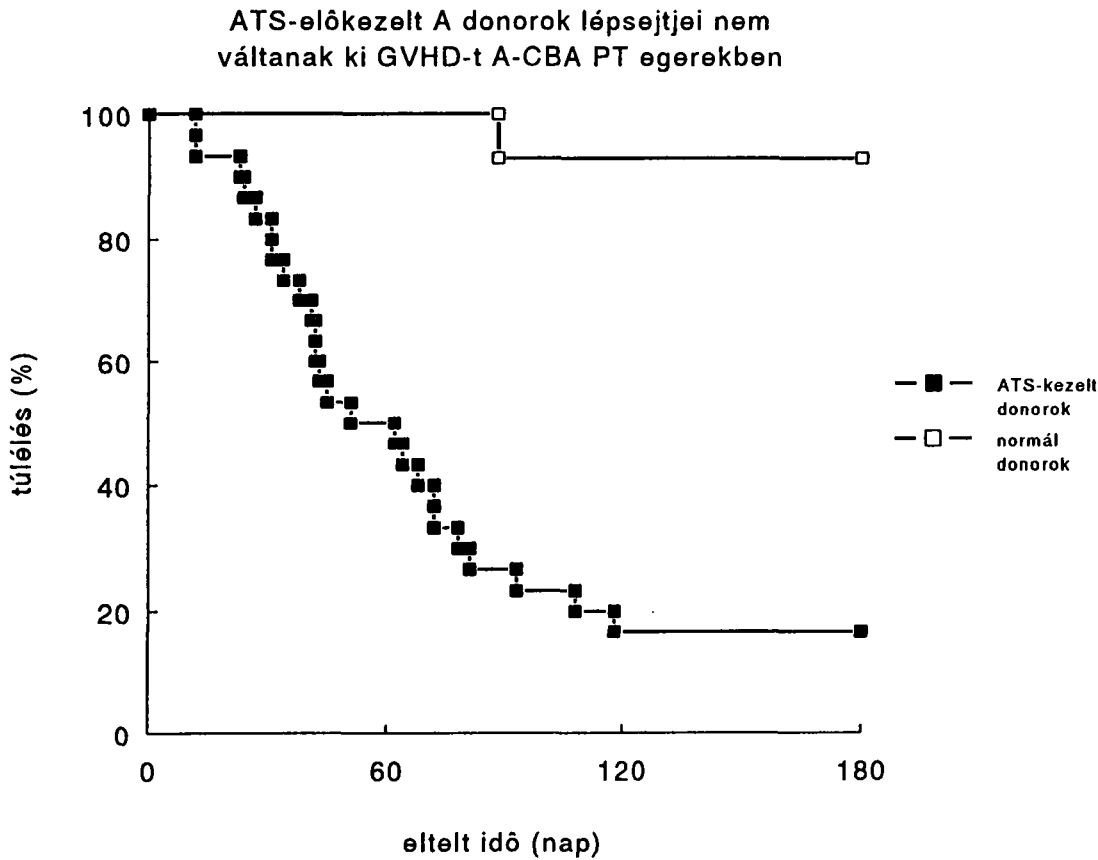
3.7. Az ATS-előkezelt donorok lépsejtjei (B10xA)F₁ recipiensekben is inaktívak voltak

Az ATS-kezelt donorból származó lépsejtek GVHD-indukáló aktivitását egy letális GVHD-re érzékeny F₁ hibrid rendszerben is teszteltük: (B10xA)F₁ hibrid recipienseket oltottunk 50 millió A, illetve B10 parentális donor lépsejttel. Az újszülöttkori toleráns rendszerhez hasonlóan az átlagos súlycsökkenés itt is elérte a 30%-ot. Ebben a törzskombinációban bőrtüneteket (kopaszodás, a bőr kifehélyesedése) is észleltünk. A mortalitás az A és a B10 sejtekkel oltott (B10xA)F₁ hibridekben 91% (10/11), illetve 100% (10/10) volt (20. ábra). Ezzel szemben sem az ATS-kezelt A, sem az ATS-kezelt B10 sejtekkel oltott F₁ hibridekben nem fordult elő megbetegedés. Ezekben a csoportokban nem volt elhullás (A donorok esetében: 0/6, B10 donorok esetében: 0/12).

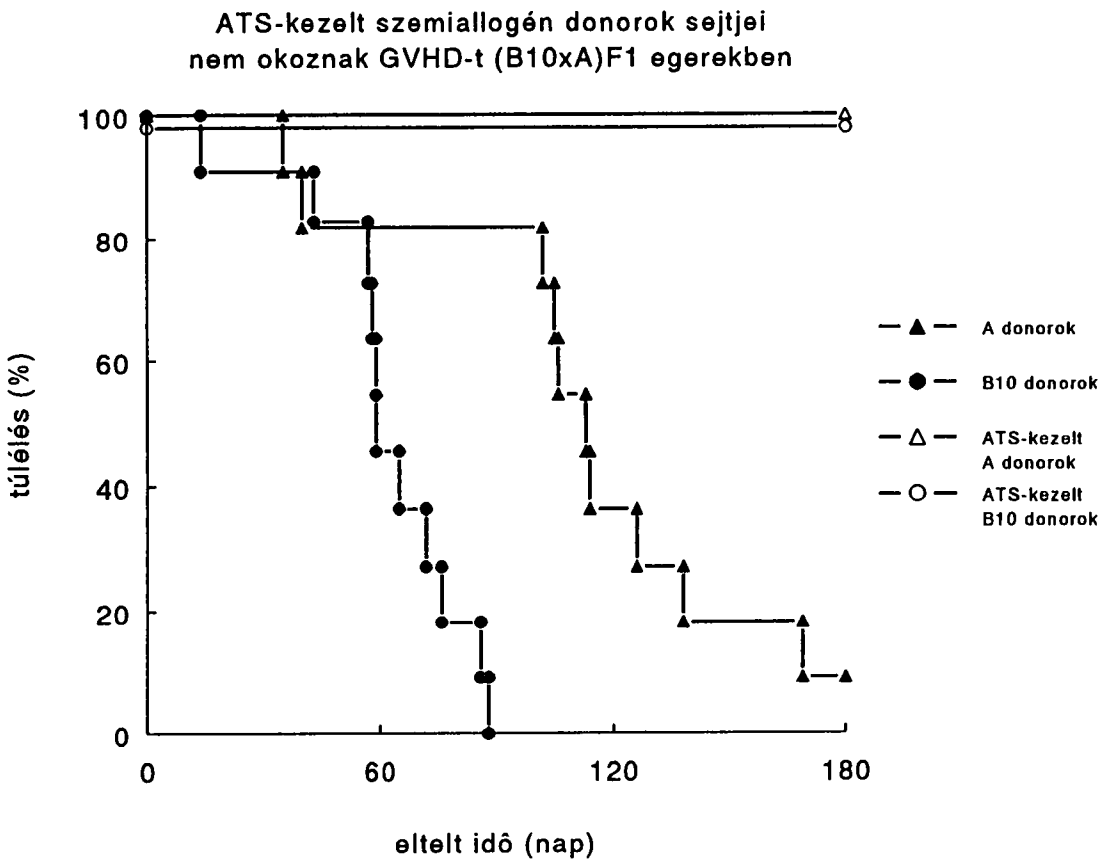
3.8. A donorok *in vivo* ATS-előkezélése a lépsejtek haemopoietikus repopuláló aktivitását fokozta

Miután megállapítottuk, hogy az ATS-előkezelt donorokból származó lépsejtek nem idéznek elő GVHD-t, megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja ez az előkezelés a donor sejtek haemopoietikus repopuláló kapacitását. Ezeket a kísérleteket a vérképzőrendszer elpusztítása érdekében letálisan irradiált (B10xA)F₁

19. ábra



20. ábra



recipienteken végeztük, az irradáció dózisa 10 Gy volt. A donor ATS-előkezelésnek a haemopoietikus repopulációra és a GVHD-indukációra gyakorolt hatását szétválasztandó, a két parentális donor törzs mellett itt szingén, (B10xA)F₁ donorokat is használtunk. Valamennyi besugárzott, de lépsejttel nem oltott kontroll állat (12/12) röviddel az irradálás után elhullott, az átlagos túlélés 11,6 nap volt (21. ábra). A kezeletlen parentális lépsejtekkel történt oltás az irradiált recipiensek túlélését megrövidítette: ez az A donorok esetében 7,9 nap ($n=10$, $p < 0,05$), a B10 donorok esetében 9,0 nap ($n=7$, $p < 0,10$) volt. A szingén, (B10xA)F₁ sejtekkel oltott állatok 56%-a (5/9) maradt életben. Az ATS-kezelt szemiallogén donorból származó sejtekkel oltott recipiensek nagy része életben maradt: 78% (7/9) az A donorok és 89% (8/9) a B10 donorok esetében. Ezek szerint az ATS-kezelt allogén sejtek a szingén, kezeletlen sejteknél is hatékonyabban védték ki a sugárbetegséget (78% és 89% vs 58%). A donorok *in vivo* ATS-előkezelése még a szingén sejtek radioprotektív aktivitását is megnövelte: itt valamennyi recipiens életben maradt (10/10, $p < 0,05$).

Az ATS-kezelt donorból származó lépsejtek megnövekedett radioprotektív kapacitására vonatkozó eredményeket egy további irradált szemiallogén rendszerben, a CBA -> (CBAXA)F₁ törzskombinációban is megerősítettük (nem ábrázoltuk).

4. DISZKUSSZIÓ

A szövetátültetés alapvető immunológiai jelenségeit az 1950-es években írták le. Már a transzplantációs immunológia alaptörvényeinek felismerése után nem sokkal felmerült az újszülöttkori toleranciakeltésen átesett felnőtt egerekben kiváltható GVHD elméleti lehetősége. Ennek ellenére összesen két munkacsoport kísérelt meg újszülöttkori toleráns egerekben GVHD-t előidézni. Billingham és munkatársai több törzskombináció (többek között A-CBA PT recipiensek)

felhasználásával, az általunk használttól némileg eltérő toleranciakeltési és GVHD-indukciós protokollt használva a toleráns egereket rezisztensnek találták a szisztémás GVHD-vel szemben (5). Martinez és munkatársai A törzzsel szemben újszülöttkori toleráns C3H egerekben A lépsejtek többszöri oltásával idéztek elő súlycsökkenéssel járó betegséget; mortalitásról nem számoltak be (4). Figyelmet érdemel, hogy ez a törzskombináció az általunk használthoz igen hasonló, mivel a C3H törzs a CBA törzshöz hasonlóan H-2^k MHC haplotípusú, a használt donor törzs pedig megegyezik a két esetben. Ezen kívül újszülöttkori toleráns patkányokban kiváltható GVHD-ről található még néhány irodalmi adat (24, 25). Újszülöttkori toleráns egerekben indukálható letális GVHD-t legjobb tudomásunk szerint mi írtunk le először (26).

Az újszülöttkori transzplantációs tolerancia specifikus, csak a donor transzplantációs antigénjeire korlátozott, szelektív immunológiai válaszképtelenség, azonban az immunrendszer minden más tekintetben normálisan viselkedik (27). A toleranciakeltést követően néhány törzskombinációban immunregulációs zavarok (autoimmunitás, mitogénnel szembeni csökkent válaszképesség, lymphoproliferatív kórképek, malignus lymphomák) lépnek fel. Ezen immunológiai zavarok kialakulásában a toleranciakeltéshez használt F₁ donor lépsejtek jelenlétének és a gazda ezek ellen irányuló immunológiai válaszának tulajdonítanak szerepet, ezért ez a tünetcsoport a host-versus-graft betegség (HVGD) nevet viseli (28, 29, 30). Ennek ismeretében felmerült annak a lehetősége, hogy az A-CBA toleráns állatok GVHD-vel szembeni szenzitivitásában is szerepet játszhat a recipiensek aspecifikusan csökkent immunológiai válaszképessége. Ez ellen számos kísérleti eredményünk szól. 1. Az A bőrgraftot permanensen viselő A-CBA toleráns recipiensek a normál CBA állatokkal megegyező idő alatt lökik ki a harmadik törzstől származó (B10) bőr allotranszplantátumokat (az átlagos grafttúlélés 10,2 nap a toleráns recipiensekben és 10,3 nap normál CBA egerekben). 2. Ennek megfelelően a B10 egértörzs

lépsejtjei - a tolerált A egértörzs lépsejtjeivel ellentétben - nem idéznek elő GVHD-t az A-CBA toleráns egerekben, vagyis a GVHD-vel szembeni érzékenységük specifikus. 3. Az A-CBA toleráns recipiensek lépsejtjeinek mitogén-indukálta proliferációs kapacitása nem csökkent. 4. Nem mutathatók ki bennük a host-versus-graft betegség másik tünetét jelentő antithymocita ellenanyagok sem (saját eredmények). Mindezek arra utalnak, hogy az A-CBA toleranciakeltés valóban specifikus transzplantációs toleranciát hoz létre, melyet nem komplikál host-versus-graft betegség. A recipienseket ez a specifikus transzplantációs tolerancia teszi az A lépsejtekkel szemben válaszképtelenné, megteremtve így a GVHD kiválthatóságának lehetőségét. Más nem irradiált (F₁ hibrid) recipiensekkel összehasonlítva az újszülöttkori toleráns egerek igen érzékenyek az akut, letális GVHD-re. A reakció intenzitása függ a kiváltó sejtek dózisértől és az eredmények jól reprodukálhatóak, ezért ez a rendszer a GVHD mechanizmusának és prevenciójának vizsgálatára alkalmas új modellként jöhet számításba.

A (CBAXA)F₁ és az A-CBA újszülöttkori toleráns recipiensek az A lépsejtekkel szemben elvileg egyformán válaszképtelenek. Ennek ellenére az F₁ recipiensekben még igen magas sejdózissal is csak minimális mérvű GVHD-t tudunk kimutatni. Mivel a GVHR-t a két esetben gyakorlatilag ugyanazon hisztokompatibilitási antigének váltják ki, a használt donorok pedig azonos törzsűek, az F₁ hibrid recipiensek a letális betegséggel szembeni nehezen megmagyarázható rezisztenciája lehetőséget nyújthat a GVHD kialakulását szabályozó recipiens eredetű tényezők vizsgálatára.

Az egerekben kiváltható GVHD-nek két fő típusa különböztethető meg: a többnyire magas mortalitású akut, szuppresszív típusú és az általában enyhébb és krónikus lefolyású, lymphoproliferációval és "autoimmun" jellegű tünetekkel járó, "immunstimuláló" típusú betegség. Az utóbbi esetben gyakoriak a bőrtünetek: kopaszodás, a bőr és a fül fibrotikus elváltozásai, valamint az immunkomplex nephritis és az általa előidézett proteinúria. Ez az "autoimmun" kórkép a GVHD

indukcióját követően egyes F₁ hibrid egértörzsekben is kimutatható (31). Ezen kívül ductus thoracicus lymphocyták oltásával újszülöttkori toleráns patkányokban előidézett GVHD-ben is ilyen tüneteket írt le Stastny és munkacsoportja. Mi sem az újszülöttkori toleráns, sem a (CBAXA)F₁ recipiensek esetében nem találtunk bőrtüneteket, sem vesekárosodást vagy proteinuriát. Ez arra utal, hogy valószínűleg nem a fenti típusú autoimmunitás és a benne szereplő humorális effektor mechanizmusok játszanak domináns szerepet a reakcióban egyik esetben sem. A lépsejtek csökkent Con A indukálta és spontán proliferációs kapacitása azt mutatja, hogy nemcsak a letális GVHD-re érzékeny újszülöttkori toleráns, hanem a rezisztens F₁ hibrid recipiensekben is akut, szuppresszív típusú GVHD indukálható. Muluk és munkatársai A sejtekkel oltott (CBA/JxA)F₁ recipiensekben graft-versus-host reakció által okozott immundeficienciát találtak. Ennek kialakulásában a recipiens Mls^a antigénjeivel szembeni T-sejtes immunválasz kulcsszerepét igazolták (32). Mivel az általunk használt CBA/Ca törzs a CBA/J törzzsel szemben a gyengébb stimuláló hatású (antigenitású) Mls^b allélt hordozza, a mi rendszerünkben nem feltétlenül ez a mechanizmus érvényesül. Lapp és munkacsoportja is sokrétű immundeficienciát talált A sejtekkel oltott (CBAXA)F₁ recipiensekben : a reakció a thymus károsodásával (33), a T-sejtes (34, 35) és a B-sejtes (36) immunválasz defektusával volt jellemezhető. A GVHD mortalitásáról viszont nem közöltek adatokat. Szintén nem közölték, hogy a több, egymástól transzplantációs antigénjeiben is különböző CBA alvonal melyikét használták az F₁ hibridek előállítására, ez megnehezíti adataik összehasonlítását saját eredményeinkkel.

Flow cytometriás vizsgálataink során a reakció első és második hetében mind az A-CBA toleráns, mind a (CBAXA)F₁ recipiensek lépében a CD8⁺ T-sejtek százalékos arányának megnövekedését írtuk le. A lép cellularitására és a sejtszubpopulációkra vonatkozó eredményeket összevetve látható, hogy a hetedik napra a CD8⁺ sejtek százalékos aránya mellett abszolút számuk is nőtt. Mivel a

donor és a recipiens között mindkét rendszerben első osztályú fő hisztokompatibilitási (H-2D) antigénkülönbség áll fenn, eredményeink összhangban állnak azokkal az elméleti megfontolásokkal és kísérleti adatokkal, amelyek ilyen esetben az MHC-I. molekulával kapcsolatot létesíteni képes, CD8+ T-sejtek szerepét hangsúlyozzák (37). Emellett természetesen nem zárható ki egyéb, minor hisztokompatibilitási antigének szerepe sem a reakcióban, hiszen számos rendszerben bizonyították már, hogy súlyos, letális GVHD minor hisztokompatibilitási antigének ellen is irányulhat (37).

Citokinekkal foglalkozó kísérleteinkben többek közt a celluláris immunválasz kialakulásában szerepet játszó, Th1 sejtek által termelt IFN-gamma és az elsődlegesen a humorális immunválaszra jellemző, Th2 sejtek által termelt IL-4 és IL-10 termelődését vizsgáltuk a graft-versus-host reakció során (38).

Úgy találtuk, hogy a kezeletlen újszülöttkori toleráns állatok lépsejtjeinek az F₁ hibridekéinél magasabb az IL-10 termelése. Ez felveti az IL-10 és az indukált transzplantációs tolerancia kapcsolatának kérdését. Az IL-10 a sejtes immunválasz hatékony inhibitora (39), elképzelhető, hogy szerepet játszik a transzplantációs tolerancia létrehozásában és fenntartásában is (38). Ezt a kézenfekvő hipotézist azonban csak kevesen vizsgálták kísérletes módszerekkel. Abramovicz és munkacsoportja egy olyan törzskombinációban mérték citokinek mRNS-ének termelődését, amelyben az újszülöttkori transzplantációs tolerancia indukcióját követően host-versus-graft betegség lép fel. Egy hónappal a toleranciaindukció után mind az IL-10, mind az IL-4 mRNS-ének felszaporodását írták le a recipiensek lépsejtjeiben (40). Az emelkedett IL-4 termelés a host-versus-graft reakcióra jellemző fokozott B-sejt aktivitással állhat kapcsolatban. Elképzelhető, hogy esetünkben a magas IL-10 és alacsony IL-4 szint a sikeres és host-versus-graft betegséggel nem járó toleranciaindukció következménye. Egyes kísérletes eredmények azt mutatják, hogy *in vitro* kultúrában az IL-10 és az IFN-gamma egymás termelődését gátolhatják (41, 42). Mi nem találtunk különbséget a

különböző IL-10 szintekkel jellemezhető toleráns és F₁ hibrid állatok esetében mérhető IFN-gamma termelésben. Az IL-4 termelését az IL-10-ével ellentétben az F₁ hibrid állatokban találtuk magasabbnak. Hogy a toleráns és az F₁ hibrid állatok GVHD-vel szembeni különböző érzékenysége kapcsolatban áll-e a kétféle recipiens lépsejtjeinek különböző kiindulási citokintermelésével, még nem tisztázott.

A kísérletes és klinikai szituációk egy részében valószínűsíthető a TNF- α fontos szerepe a letális GVHD kialakulásában. Az ebből a szempontból vizsgált egérrendszerek közül többen (de nem az összes ilyen rendszerben) a recipiensek anti-TNF- α ellenanyaggal való kezelése kivédte a letális GVHD-t (43, 44, 45). Esetünkben nem volt különbség a letális GVHD indukciójára érzékeny és a rezisztens törzskombinációban mérhető TNF- α szintek közt.

Összegezve, kísérletes rendszerünkben nem sikerült egyértelmű kapcsolatba hozni a letális GVHD kialakulását egyes citokinek termelésének változásával. A TNF- α már említett példáját kivéve napjainkban a humán csontvelőtranszplantációt kísérő GVHD esetében hasonlóan ellentmondóak a citokinek szerepére vonatkozó adatok (46). Fennáll annak a lehetősége, hogy a toleráns és az F₁ hibrid recipiensek GVHD-vel szembeni szenzitivitását az eltérő kiindulási citokinszintek - illetve az ezek mögött álló immunológiai tényezők - befolyásolhatják. Ennek vizsgálatára további kísérleteket tervezünk.

Az F₁ recipiensek GVHD-vel szembeni alacsonyabb érzékenységeinek egyik lehetséges oka az úgynevezett hibrid rezisztencia (47). A hibrid rezisztencia jelensége abban foglalható össze, hogy egyes törzskombinációkban az F₁ hibrid állatok a transzplantációs immunológia alaptörvényeinek ellentmondó módon képesek homozigóta, parentális típusú sejtek immunológiai felismerésére és eliminálására. A hibrid rezisztencia irradiált recipiensekben a haemopoietikus graftok gyors kilökődését okozhatja. Esetünkben ez több okból nem látszik valószínűnek. 1. A popliteális nyirokcsomó-megnagyobbodási teszt az aktiválódott donor T-sejtek által kiváltott sejtszaporodást méri (48). Az újszülöttkori toleráns és

az F₁ hibrid recipiensek azonos lokális GVHR aktivitása arra utal, hogy a szisztémás GVHD-vel szembeni különböző szenzitivitásuk nem a donor sejtek aktiválódásának vagy korai proliferációjának különböző mértékéből ered. 2. Az általunk alkalmazott sejtdózis nagyságrendileg magasabb, mint a hibrid rezisztencia "klasszikus" modelljeiben használt dózis. 3. Közvetett módon a donor sejtek jelenlétére és aktivitására utal az is, hogy a GVHD kialakulásának karakterisztikus *in vitro* jeleit az F₁ hibrid recipiensekben is észleltük. 4. Alloantisavók és anti-MHC monoklonális ellenanyag felhasználásával végzett flow cytometriás vizsgálataink szintén a donor sejtek jelenlétére utalnak mind a toleráns, mind az F₁ hibrid állatok lépében (előkísérletek eredményei, nem ábrázoltuk). A GVHR indukciójához szükséges donor sejtek tehát az F₁ recipiensek lépében is jelen vannak és a reakciót meg is indítják.

Wilson és munkatársai F₁ hibrid patkányokban a letális GVHD kialakulását megakadályozó, recipiens eredetű T-sejtes antiidiotípus mechanizmusok jelenlétét bizonyították (49). A T-sejtek működésén alapuló gátló immunológiai mechanizmusok érzékenyek lehetnek ATS-re (50). Esetünkben a (CBAXA)F₁ egerek GVHD-vel szembeni rezisztenciáját a recipiensek ATS-sel történt immunszuppressziója nem befolyásolta, így nem tudtuk ilyen ATS-szenzitív mechanizmusok szerepét igazolni. Elképzelhető viszont, hogy a GVHD szuppressziójában egyéb, ATS-re nem érzékeny szuppresszor aktivitású sejtpopulációk, például természetes szuppresszor sejtek játszanak szerepet (51). Az esetleges aktív, recipiens eredetű GVHD-szuppresszió vizsgálatával más módszerrel is próbálkoztunk. Az F₁ recipiensek GVHD-vel szembeni rezisztenciáját normál F₁ lépsejtek transzferével nem tudtuk a toleráns állatokba átvinni.

Összefoglalva, a betegség letális, illetve enyhe kimenetele ellenére mind az A-CBA toleráns, mind a (CBAXA)F₁ hibrid recipiensekben kimutatható volt a graft-versus-host reakció kialakulása. További kísérleteinkben többek között a

donor sejtekkel történő vérképzőrendszeri repopuláció szerepét szeretnénk vizsgálni a letális GVHD kialakulásában.

Kísérleteink egy másik csoportjában a graft-versus-host betegség kialakulásának megakadályozására próbáltunk új lehetőségeket keresni.

Az ATS, illetve a belőle tisztított antithymocyt globulin (ATG) egyike a legrégebben használt és a T-sejtes immunreakciók gátlásában leghatásosabb immunszuppresszív szereknek, ennek ellenére hatásmechanizmusa részleteiben a mai napig sem ismert. Az ATS számos sejtfelszíni antigén (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD45, LFA-1) ellen irányuló ellenanyagokat tartalmazhat (52). Az ATS-kezelés egyik jellemző hatása a T-sejt depléción (53). Az ATS immunszuppresszív hatása azonban nem azonosítható pusztán a deplécióval: az ATS kezelés szuppresszor sejteket generál (54, 55), gátolja az IL-2 receptor α láncának (CD25) expresszióját (56), a CD2 blokkolásán keresztül gátolja a T-sejtek antigén-indukálta aktivációját (57). Az ATS szuppresszív hatása mellett *in vitro* stimuláló, aktiváló hatása is bizonyított; a stimulált sejtek különböző citokineket (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IFN-gamma, GM-CSF) termelnek (58, 59, 60). A termelődött citokinek szerepet játszhatnak az ATS-indukálta immunszuppresszióban, továbbá a haemopoietikus aktivitást is befolyásolhatják (61, 62).

Az általunk alkalmazott ATS-előkezelés után a lép csökkent számban ugyan (6% vs 30%, nem ábrázoltuk), de tartalmazott T-sejteket. A T-sejtszám ilyen mérsékelt csökkenése mellett a lépsejtek GVHD-indukáló aktivitása gyakorlatilag megszűnt. Ez azt mutatja, hogy a GVHD-indukáló hatás megszűntének oka itt sem egyszerűen a T-sejt depléción, hanem egyéb, funkcionális okai is lehetnek. Az *in vivo* ATS-előkezelt donorokból származó lymphoid sejtek GVHD-indukáló aktivitásáról alig találhatók irodalmi adatok. Patkányokban végzett allogén vékonybéltranszplantáció esetében az ATS-előkezelt donorból származó graft GVHD-indukáló aktivitása elveszett (63). Ledney és Van Bekkum a donor egerek

folyamatos ATS-kezelését követően a lépsejtek GVHD-indukáló aktivitásának megszüntét írta le (64). Egy másik ATS-kezelési protokoll felhasználásával, szingén sejtttranszferen alapuló rendszerben Ledney bizonyos esetekben a kolóniaformáló egységek (CFU-s) megnövekedett számát találta ATS-kezelt egerek lépében (65). A transzplantátum GVHD indukáló és haemopoietikus repopuláló aktivitását azonban nem vizsgálták egyidejűleg.

A humán csontvelőtranszplantáció kérdéseinek modellezésére Vallera és munkatársai irradiált egér recipienseket oltottak allogén és szingén lépsejt-csontvelő keverékkel. Ilyen kísérleti elrendezés esetében az allogén sejtszuspenziók GVHD-t indukáló aktivitása a humán klinikai szituációhoz hasonlóan anti-Thy-1 (tehát pan-T) monoklonális ellenanyaggal való bevonás, illetve T-sejt depléción alkalmazása után lecsökkent, az így kezelt allogén sejtszuspenzióval oltott recipiensek túlélése azonban így sem érte el a kezeletlen szingén szuspenzióval oltottakét (66). Ezzel szemben a mi kísérleteinkben az ATS-kezelt szingén, sőt allogén donorokból származó lépsejtek a kezeletlen szingén sejtekénél is hatékonyabb radioprotektív hatással rendelkeztek, ezzel a donorok ATS-előkezelése minden egyéb módszernél alkalmasabbnak látszik irradiált recipiensek vérképzőrendszerének repopulálására a GVHD elkerülésével. A klinikailag használt *in vitro* T-sejtdepléción esetében a T-sejtek maradéktalan eltávolítása ad csak biztos eredményt, ami technikailag nehezen oldható meg, ráadásul ronthatja a haematopoietikus repopuláció esélyét. Ezzel ellentétben az ATS-kezelt donorból származó transzplantátum annak ellenére válik a GVHD-t okozó hatás tekintetében inaktívvá, hogy tartalmaz T-sejteket, ez a kezelés egyik potenciális előnye lehet.

Mindezen eredmények arra utalnak, hogy az ATS-előkezelt donorból származó sejtpopulációk vizsgálata közelebb vihet a humán csontvelőtranszplantáció egyik legfontosabb problémájának megoldásához.



5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkacsoportunk elsőként írta le, hogy az A egértörzs transzplantációs antigénjeivel szemben újszülöttkori toleranciakeltésen átesett és permanensen toleránssá vált, felnőtt CBA egerekben A lépsejtekkel letális GVHD váltható ki. A GVHD intenzitása függ a kiváltó sejt dózistól és az eredmények jól reprodukálhatóak. Ezzel ellentétben az A lépsejtekkel szemben genetikai okokból válaszképtelen (CBAxA)F₁ hibrid recipienseket gyakorlatilag rezisztensnek találtuk a letális betegséggel szemben. A reakció első hetében mind az újszülöttkori toleráns, mind az F₁ hibrid recipiensek lépében CD8⁺ sejtek szaporodnak fel, majd a lép magvas sejtszáma és ezen belül a lymphoid sejtek aránya csökken. Az *in vitro* proliferációs tesztek eredménye szerint mindkét rendszerben akut, szuppresszív típusú GVHD indukálható. A kezeletlen állatok lépsejteinek IL-10 termelése a toleráns, IL-4 termelése az F₁ recipiensek estében volt magasabb. Az IL-4, az IL-10, az IFN-gamma és a TNF- α citokinek termelését a GVHD során nem sikerült a betegség kimenetelével egyértelmű kapcsolatba hozni. A szisztémás GVHD-vel szembeni különböző érzékenységek ellenére a kétféle recipiensben azonos intenzitású lokális GVHR váltható ki. Az F₁ hibrid állatok szisztémás GVHD-vel szemben rezisztenciáját a recipiensek ATS-sel történt előzetes immunszuppressziója nem befolyásolta. Mivel a GVHD a két rendszerben azonos hisztokompatibilitási antigének ellen irányul és a használt donorok azonos törzshöz tartoznak, ez a kettős rendszer igen alkalmas lehet a letális GVHD-vel szembeni rezisztencia és szenzitivitás kérdéseinek további vizsgálatára.

A GVHD prevenciójának új lehetőségeit vizsgálva megállapítottuk, hogy *in vivo* antithymocytin savóval kezelt donorok lépsejtjei sem nem irradiált, sem irradiált recipiensekben nem váltanak ki GVHD-t. Ugyanez a kezelés mind allogén, mind szingén donorok lépsejtjeinek haemopoietikus repopuláló kapacitását növelte. Mindezek alapján a donorok ATS-előkezelése minden egyéb módszernél

alkalmasabbnak látszik letálisan irradiált recipiensek vérképzőrendszerének repopulálására a donor sejtek által kiváltott GVHD elkerülésével. A módszernek elméleti érdekessége mellett klinikai jelentősége is lehet.

6. IRODALOM

1. Billingham, R.E.: The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* **21** (1968).
2. Okunevick, J.P., Meredith, R.F., Raikow, R.B., Buffo, M.J., Jones, D.L.: Possibility of three distinct and separable components to fatal graft-vs-host reaction. *Exp. Hematol.* **10**: 277 (1982).
3. Hill, R.P.: Experimental radiotherapy. In: Tannock, I.F., Hill, R.P. (eds.). *The Basic Science of Oncology*. Pergamon Press, New York, p.256 (1987).
4. Martinez, C., Smith, J.M., Good, R.A.: Runt disease induced by intravenous injection of immunologically competent cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **106**: 572 (1961).
5. Billingham, R.E., Brent, L.: Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Phil. Trans. R. Soc. London (ser.B)* **242**: 439 (1959).
6. Jánossy, T., Végh, P., Tábit, K., Erdős, É., Petri, G.: Suppressor cells in mouse allograft tolerance. *Transplant. Proc.* **15**: 859 (1983).
7. Bortin, M.M., Rimm, A.A.: Increasing utilization of bone marrow transplantation. II. Results of the 1985-1987 survey. *Transplantation* **48**: 453 (1989).
8. Champlin, R.E.: Bone marrow transplantation: introduction and overview. In: Champlin, R.E. (ed.). *Bone Marrow Transplantation*: Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, p.1 (1990).

9. Champlin, R.: T-cell depletion to prevent graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **3**: 687 (1990).
10. Végh, P., Balogh, E., Jánosy, T., Erdős, É.: Significance of different lymphoid target cells in determining the correlation of *in vitro* and *in vivo* activities of antilymphocyte sera. *Z. Immunitaetsforsch.* **147**: 162 (1974).
11. Végh, P., Erdős, É., Jánosy, T., Petri, G.: Correlation of the *in vitro* activities of antithymocyte sera (ATS) with the immunizing antigen dose. *Transplantation* **25**: 324 (1978).
12. Jánosy, T., Vizler, Cs., Végh, P., Duda, E.: The effect of tumor necrosis factor producing tumor grafts in mice. *Eur. Cytokine Netw.* **3**: 195 (1992).
13. Krizsa, J., Hunyadi, J., Oláh, J., Jánosy, T., Vizler, Cs., Végh, P.: Long lived CD1+ HLA-DR+ dendritic cells in human skin xenografts. *Exp. Dermatol.* **1**: 92 (1992).
14. Billingham, R.E., Medawar, P.B.: The technique of free skin grafting in mammals. *Brit. J. Exp. Biol.* **28**: 385 (1951).
15. Végh, P.: A comparative study on the graft-protective activity of anti-spleen, anti-lymph node and anti-thymus anti-mouse sera. *Z. Immununitaetsforsch.* **142**: 372 (1971).
16. Levey, R.H., Medwar, P.B.: Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**: 1130 (1966).
17. Végh, P.: Antilymphocyta savók előállítása és alkalmazása a transzplantációs immunreaktivitás befolyásolására. Kandidátusi értekezés, Szeged (1981).
18. van Ewijk, W., van Soest, P. L., van der Engh, G. J.: Fluorescence analysis and anatomic distribution of mouse T-lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies Thy-1, Lyt 1, Lyt 2 and T200. *J. Immunol.* **127**: 2594 (1981).

19. Leenen, P.J.M., Sliker, W.A.T., Melis, M., van Ewijk, W.: Murine macrophage precursor characterization. I. Production, phenotype and differentiation of macrophage precursor hybrids. *Eur. J. Immunol.* **20**: 15 (1990).
20. Cleveland, M.G., Annable, C.R., Klimpel, G.R.: In vivo and in vitro production of IFN-alpha and IFN-gamma during graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **141**: 3349 (1988).
21. Cherwinski, H.M., Schumacher, H.M., Brown, K.D., Mosmann, T.R.J.: Two types of mouse helper T cell clone III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridisation, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **166**: 1229 (1987).
22. Mosmann, T.R., Schumacher, J.H., Fiorentino, D.F., Leverah, J., Moore, K.W., Bond, M.W.: Production of mAbs specific for a novel cytokine, (CSIF), as well as IL-4, IL-5, and IL-6, using a solid phase radioimmunoabsorbent assay: isolation of blocking and nonblocking anti-CSIF mAbs. *J. Immunol.* **145**: 2938 (1990).
23. Chatelain, R., Varkila, K., Coffmann, R.L.: IL-4 induces a TH2 response in Leishmania-infected mice. *J. Immunol.* **148**: 1182 (1992).
24. Stastny, P., Stembridge, V.A., Ziff, M.: Homologous disease in the adult rat, a model for autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **118**: 635 (1963).
25. Miyamoto, M., McCullagh, P.: The response of homograft-tolerant rats to allogeneic lymphocytes. *Transplantation* **18**: 127 (1974).
26. Vizler, Cs., Jánossy, T., Baranyi, L., Végh, P.: Lethal systemic graft-vs-host disease in neonatally tolerant, but not in F1 hybrid mice. *Cell. Immunol.* **146**: 431 (1993).
27. Holán, V.: Absolute specificity of neonatally induced transplantation tolerance. *Transplantation* **50**: 1072 (1990).

28. Végh, P., Baranyi, L., Jánosy, T.: Induction of transplantation tolerance and development of lymphomas in mice: Lack of interdependence. *Cell. Immunol.* **129**: 56 (1990).
29. Varga, L., Jánosy, T., Baranyi, L., Vizler, Cs., Végh, P., Füst, Gy.: Age dependent CH50 and AH50 changes in a tolerized mouse strain. *Immunobiology* **184**: 411 (1992).
30. Jánosy, T., Baranyi, L., Knulst, A.C., Vizler, Cs., Benner, R., Kelényi, G., Végh, P.: Autoimmunity, hyporeactivity to T cell mitogens and lymphoproliferative disorders following neonatal induction of transplanation tolerance in mice. *Eur. J. Immunol.*, nyomdában.
31. Rolink, A.G., Gleichmann, H., Gleichmann, E.: Disease caused by reactions of T lymphocytes to incompatible structures of major histocompatibility complex. VII. Immune complex glomerulonephritis. *J. Immunol.* **130**: 209 (1983).
32. Muluk, S.C, Hakim, F.T., Shearer, G.M.: Regulation of graft-versus-host reaction by Mls^a reactive donor T cells. *Eur. J. Immunol.* **22**: 1967 (1992).
33. Potoworovsky, E., Seemayer, T., Bolande, R., Lapp, W.: Thymic stromal alterations in mice undergoing a chronic graft-versus-host reaction. *Z. Immunitaetsforsch.* **155**: 240 (1979).
34. Seddik, M., Seemayer, T.A., Lapp, W.S.: The graft-versus-host reaction and immune function. I. T helper cell immunodeficiency associated with graft-versus-host-induced thymic epithelial cell damage. *Transplantation* **37**: 281 (1984).
35. Mendes, M.L., Rode, H., Peres, A., Kongshawn, P.A.L., Lapp, W.S.: Interleukin-1 and interleukin-2 defects associated with murine graft-versus-host induced immunodeficiency. *Transplantation* **39**: 418 (1985).

36. Seddik, M., Seemayer, T.A, Lapp, W.S.: The graft-versus-host reaction and immune function. IV. B cell functional defect associated with a depletion of splenic colony forming units in marrow of graft-versus-host reactive mice. *Transplantation* **41**: 242 (1986).
37. Korngold, R., Sprent, J.: T-cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation* **44**: 335 (1987).
38. Lowry, R.P., Takeuchi, T., Cremisi, H., Konieczny, B.: Th2-like effectors may act as antigen-specific suppressor cells in states of transplantation tolerance. *Transplant. Proc.* **25**: 324 (1993).
39. Bejarano, M.-T., de Waal Malefyt, R., Abrams, J.S., Bigler, M., Bacchetta, R., de Vries, J.E., Roncarolo, M.-G.: Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int. Immunol.* **4**: 12 (1992).
40. Abramowicz, D., Durez, P., Gerard, C., Donckier, V., Amraoui, Z., Velu, T., Goldman, M.: Neonatal induction of transplantation tolerance in mice is associated with in vivo expression of IL-4 and -10 mRNAs. *Transplant. Proc.* **25**: 312 (1993).
41. Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Romagnani, S.: Human Il-10 is produced by type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* **150**: 353 (1993)
42. Chomarat, P., Rissoan, M.-C., Banchereau, J., Moisse, P.: Interferon-gamma inhibits interleukin-10 production by monocytes. *J. Exp. Med.* **177**: 523 (1993).
43. Piguet, P.-F., Grau, G. E., Allet, B., Vassalli, P.: Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs-host disease. *J. Exp. Med.* **166**: 1280 (1987).

44. Holler, E., Kolb, H.J., Möller, A., Kempeni, J., Liesenfeld, S., Pechumer, H., Lehmacher, W., Ruckdeschel, G., Gleixner, B., Riedner, C., Leddröse, G., Brehm, G., Mittermüller, J., Wilmanns, W.: Increased serum levels of tumor necrosis factor- α precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* **75**: 1011 (1990).
45. Antin, J., Ferrara, J.L.M.: Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* **80**: 2964 (1992)
46. Jadus, M.R., Wepsic, H.T.: The role of cytokines in graft-versus-host reactions and disease. *Bone Marrow Transplant.* **10**: 1 (1992).
47. Cudkovicz, G., Nakamura, I.: Genetics of the murine haemopoietic-histocompatibility system: an overview. *Transplant. Proc.* **15**: 2058 (1983).
48. Monie, H.J., Everett, N.B.: The popliteal lymph node assay for graft-versus-host interaction in mice. *Anat. Rec.* **179**: 19 (1974).
49. Bellgrau, D., Smilek, D., Wilson, D.B.: Induced tolerance in F₁ rats to anti-major histocompatibility complex receptors on parental cells. *J. Exp. Med.* **153**: 1660 (1981).
50. Végh, P., Erdős, É., Jánossy, T., Petri, G.: Studies on the mechanism of transplantation tolerance. I. Do suppressor cells play a role in the induction and maintenance of the transplantation tolerance? *Cell. Immunol.* **55**: 265 (1980).
51. Sykes, M., Eisenthal, A., Sachs, D.H.: Mechanism of protection from graft-versus-host disease in murine mixed allogeneic chimeras. I. Development of a null cell population suppressive of cell-mediated lympholysis responses and derived from the syngeneic bone marrow component. *J. Immunol.* **140**: 2903 (1988).
52. Bonnefoy-Berard, N., Vincent, C., Revillard, J.-P.: Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* **51**: 669 (1991).

53. Olausson, M., Söderström, T., Kjellson, B., Wramner, L., Mjörnstedt, L.: The effect of ATG treatment on T-cell subpopulations in peripheral blood of inbred rats. *Transplant. Proc.* **24**: 316 (1992).
54. Simpson, M.A., Gozzo, J.: Studies on the mechanism of action of rabbit anti-mouse thymocyte serum. I. Induction of suppressor cells. *Transplantation* **30**: 64 (1980).
55. Emara, M., Carver, F.M., Thomas, J.M.: RATG treatment induces suppressor cells in primates. *Transplant. Proc.* **23**: 302 (1991).
56. Bonnefoy-Berard, N., Verrier, B., Vincent, C., Revillard, J.-P.: Inhibition of CD25 (IL-2R alpha) expression and T-cell proliferation by polyclonal antithymocyte globulins. *Immunology* **77**: 61 (1992).
57. Leimenstoll, G., Zerrenthin, N., Niedermayer, W., Steinmann, J.: An antithymocyte globulin of rabbit origin inhibits the antigen induced activation of alloreactive T-cells by blocking CD2. *Transplant. Proc.* **23**: 982 (1991).
58. Bonnefoy-Berard, M., Vincent, C., Verrier, B., Revillard, J.-P.: Monocyte-independent T-cell activation by polyclonal antythymocyte globulins. *Cell. Immunol.* **143**: 272 (1992).
59. Barbano, G.C., Schenone, A., Roncella, S., Ghio, R., Corcione, A., Mori, P.G., Ferrarini, M., Pistoia, V.: Anti-lymphocyte globulin stimulates normal human T cells to proliferate and to release lymphokines in vitro. A study at the clonal level. *Blood* **72**: 956 (1988).
60. Kawano, Y., Nissen, C., Gratwohl, A., Speck, B.: Immunostimulatory effects of different antilymphocyte globulin preparations: a possible clue to their clinical effect. *Br. J. Haematol.* **68**: 115 (1988).
61. Rameshwar, P., Gascon, P.: Release of Interleukin-1 and Interleukin-6 from human monocytes by antithymocyte globulin - requirement for de novo synthesis. *Blood* **80**: 10 (1992).

62. Nimer, D.S., Golde, D.W., Kwan, K., Lee, K., Clark, S., Champlin, R.: *In vitro* production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aplastic anemia: possible mechanism of action of antithymocyte globulin. *Blood* **78**: 163 (1991).
63. Shaffer, D., Ubhi, C.S., Simpson, M.A., Gottshalk, R., Milford, E.L., Maki, T., Monaco, A.P.: Prevention of graft-versus-host disease following small bowel transplantation with polyclonal and monoclonal antilymphocyte serum. The effect of timing and route of administration. *Transplantation* **52**: 948 (1991).
64. Ledney, G.D., Van Bekkum, D.W.: Suppression of acute secondary disease in the mouse with antilymphocyte serum. In: Dausset J, Hamburger J, Mathé G. (eds.). *Advance in transplantation*. Munksgaard: Scandinavian University Books, 441 (1967).
65. Ledney, G.D.: Cellularity and colony-forming units of hematopoietic tissue of mice after antilymphocytic serum treatment. *Transplantation* **13**: 558 (1972).
66. Vallera, A.D., Sonderling, C.C.B., Carlson, G.J., Kersey, J.H.: Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. Effect of elimination of T-cells from donor grafts by treatment with with monoclonal Thy-1.2 plus complement or antibody alone. *Transplantation* **31**: 218 (1981).

A publikációk listája

Jánossy, T., Vizler, Cs., Végh, P., Duda, E.: The effect of tumor necrosis factor producing tumor grafts in mice. *European Cytokine Network* 3: 195 (1992).

Krizsa, J., Hunyadi, J., Oláh, J., Jánossy, T., Vizler, Cs., Végh, P., Dobozy, A.: Long lived CD1+ HLA-DR+ dendritic cells in human skin xenografts. *Experimental Dermatology* 1: 92 (1992).

Varga, L., Jánossy, T., Baranyi, L., Vizler, Cs., Végh, P., Füst, Gy.: Age dependent CH50 and AH50 changes in a tolerized mouse strain. *Immunobiology* 184: 411 (1992).

Vizler, Cs., Jánossy, T., Baranyi, L., Végh, P.: Lethal systemic graft-vs-host disease in neonatally tolerant, but not in F₁ hybrid mice. *Cellular Immunology* 146: 431 (1993).

Jánossy, T., Baranyi, L., Knulst, A.C., Vizler, Cs., Benner, R., Végh, P.: MHC-specific graft-protective and delayed-type hypersensitivity (DTH) suppressive activity of a CD4⁺CD8⁺, $\alpha\beta$ T-cell receptor (TcR) positive lymphoma isolated from a tolerant mouse. *Immunobiology* 188: 172 (1993).

Jánossy, T., Baranyi, L., Knulst, A.C., Vizler, Cs., Benner, R., Kelényi, G., Végh, P.: Autoimmunity, hyporeactivity to T-cell mitogens and lymphoproliferative disorders following neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *European Journal of Immunology*, nyomdában.



Vizler, Cs., Jánossy, T., Tabi, Z., Végh, P.: Lack of cross-species sensitization between skin allo- and xenotransplants in mice. *Transplantation Proceedings*, nyomdában.

Jánossy, T., Vizler, Cs., Krizsa, J., Hunyadi, J., Kiss, M., Nyirati, I., Végh, P., Dobozy, A.: Long term survival and use of human skin xenotransplants in immunosuppressed mice. *Transplantation proceedings*, nyomdában.

Vizler, Cs., Jánossy, T., Végh, P.: Spleen cells from ATS-pretreated donors do not induce GVHD, but exert increased radioprotection in mice. *Transplantation*, közlésre bocsátva.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Végh Pálnak és Dr. Jánossy Tamásnak, akik bizalmat szavaztak nekem és kifogyhatatlan energiával és lelkesedéssel tanítottak a kutatói mesterségre.

Köszönettel tartozom Dr. Robbert Bennernek és munkatársainak, akik lehetővé tették hogy a rotterdami Erasmus Egyetem Immunológiai Tanszékén dolgozzam, nagyon sok hasznos tapasztalatot szerezve ez idő alatt.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk minden dolgozójának, hiszen a mindennapi munkában nyújtott nélkülözhetelen segítségükön kívül valamennyien hozzájárultak ahhoz is, hogy barátságos hangulatú munkahelyen dolgozhassam.

