

Semmelweis Orvostudományi Egyetem,
II. Belgyógyászati Klinika
(igazgató: Petrányi Gyula dr.)

A humán antitest- dependens celluláris cytotoxicitás (ADCC) vizsgálata allogén rendszerben

Láng István dr., Fekete Béla dr.,
Gergely Péter dr. és Petrányi Gyula dr.

Az utóbbi években az antitest dependens cellularis cytotoxicitás vizsgálata a cellularis immunológiai kutatások előterébe került. A reakció mechanizmusát, általános methodikai kérdéseit és klinikai jelentőségét illetően utalunk előző közleményünkre (10), ill. összefoglaló tanulmányokra (13, 15). Az eredmények értékelését nehezíti, hogy a különböző sejttípusok effektor aktivitása nagymértékben függ az alkalmazott tesztrendszerrel (12, 18).

Humán vizsgálatokra előnyösnek látszik allogén rendszert használni, melyben mind a célsejt, mind a lymphocytá dependens antitest (LDA) emberi eredetű. Humán monocyták cytotoxikus aktivitását specifikus antitesttel bevont emberi vörösvérsejtek ellen korábban többen is kimutatták (6, 8, 9, 17). Legújabban a lymphocyták cytotoxicitását is sikerült bizonyítani ebben a rendszerben (18). A következőkben egészséges és krónikus lymphoid leukaemiás betegek szeparált monocytáris sejteinek anti-D-vel bevont Rh pozitív humán vörösvérsejtek elleni ADCC aktivitásáról számolunk be.

Anyag és módszer

Célsejt

Célsejtként humán anti-D serummal bevont 0 Rh pozitív emberi vörösvérsejteket használtunk. Egészséges véradótól vett 2–3 ml 0 Rh pozitív heparinos vért háromszor mostunk foszfát pufferben (PBS) és a sejtszámot 10^9 /ml-re állítottuk be 10^0 -os hőinaktivált és a célsejtekkel kimerített borjú szérumot tartalmazó Parker-oldattal (a továbbiakban: tápfolyadék). 10^8 vörösvérsejtet $100 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -tal (MTA Izotóp Intézete, Budapest; spec. aktivitás 2 mCi/ml) és $500 \mu\text{l}$ dekomplementált humán anti-D serummal inkubáltunk

$0,8 \text{ ml}$ ösztérfogóban, 90 percen át, állandó óvatos rázás közben, 37°C -os vízfürdőben. Parker-oldattal történő háromszori mosás után a sejtszámot tápfolyadékkal 6×10^3 célsejt/ μl -re állítottuk be. Bizonyos esetekben anti-D szérum kötés nélküli ^{51}Cr -mal jelzett célsejteket használtunk.

Lymphocytá dependens antitest

0 Rh pozitív vérel hiperimmunizált egészséges önkéntes véradók $1:512-1:16384$ titerű dekomplementált anti-D szérumát használtuk (OHVI). Az anti-szérumot -20°C -on tároltuk, és közvetlen a felhasználás előtt olvastottuk fel. Előzetesen különböző célsejt-antiszérum párosításokat próbáltunk ki, melyek közül nem mindegyik biztosított megfelelő cytotoxicitást. A legtöbb kísérletben a legnagyobb aktivitást eredményező $1:16384$ titerű antiszérumot használtuk.

Effektorsejt

Egészséges véradóktól és krónikus lymphoid B sejt-leukaemiás (CLL) betegektől vett 30 ml vénás vért nylonvatta oszlopon szűrtünk ($1,3 \text{ g}$ nylonvatta), majd Ficoll-Uromiro gradiensen szeparáltunk (2). Egyes kísérletekben csak Ficoll-Uromiro gradiensen szeparált effektorsejteket használtunk. A sejtszámot végül $1,2-2,4 \times 10^7$ /ml-re állítottuk be tápfolyadékkal. A sejtek életképessége meghaladta a 98% -ot (Trypankék próba). A kombinált nylonvatta-Ficoll-Uromiro szeparálás után a sejtek $97-100\%$ -a lymphocytá volt, a monocyták aránya nem érte el a 2% -ot.

Lymphocytá marker vizsgálatok

A komplement receptoros lymphocytákat EAC rozettaképzéssel mutattuk ki Bianco és mtsai módszerével (1). Az Fc receptoros populációt jelző EA rozettát Brain és Marston (3) szerint vizsgáltuk. A spontán (T) rozetta tesztet Fekete és mtsai módszerével végeztük (4). A felszíni immunoglobulint (sIg) hordozó B sejteket fluorescein-isothiocianáttal jelzett kecske anti-humán immunoglobulinnal (Hyland, Los Angeles, USA) $+4^\circ\text{C}$ -on 45 percig végzett festéssel mutattuk ki. A sejteket háromszor mostuk PBS-ben, s az eredményt verticalis illuminátorral ellátott Leitz Orthoplan Fluorescens mikroszkóppal értékeltük.

ADCC teszt

3×10^4 célsejtet $3 \times 10^4-2,4 \times 10^6$ effektorsejttel inkubáltunk (effektorsejt : célsejt = $1:1-80:1$) üvegcsőben, 37°C -os termosztátban, $2-16$ órán át. A csővenkénti ösztérfogatot $0,05 \text{ ml}$ -re állítottuk be tápfolyadékkal. Közvetlen az inkubálás megkezdése előtt a csöveket 10 percig 1000 -es fordulatszámmal centrifugáltuk, hogy a célsejtek és effektorsejtek közti szoros kapcsolatot biztosítsuk. A kontroll csövek 3×10^4 célsejtet és $1,2 \times 10^5$ jelöletlen Rh pozitív vörösvérsejtet tartalmaztak a szokásos térfogatban. További kontrollként anti-D szérummal nem kezelt célsejteket és effektorsejteket tartalmazó csöveket állítottunk be. A reakciót $0,1 \text{ ml}$ $+4^\circ\text{C}$ -os Parker-oldattal állítottuk le. A csöveket 2500 fordulatszámmal 10 percig centrifugáltuk $0,1 \text{ ml}$ felülúszót leszívunk és külön csőbe mértünk, az üledékhez $0,1 \text{ ml}$ Parker-oldatot adtunk vissza, és a felülúszók és üledékek radioaktivitását Nuclear Chicago gamma-számlálóval mértük. Minden meghatározást három párhuzamossal végeztünk. A maximális release-t a célsejtek 1% -os Saponinos kezelésével határoztuk meg. A százalékos Cr-felszabadulást (release-t) a következő képlettel számítottuk ki:

$$1,5 \times \frac{\text{felülúszó aktivitása (cpm)}}{\text{üledék akt. (cpm)} + \text{felülúszó akt. (cpm)}} \times 100$$

A cytotoxicitási indexet (CI) a specifikus release százalékában adtuk meg:

$$\text{CI} = \frac{\text{teszt release} - \text{spontán release}}{\text{max. release} - \text{spontán release}} \times 100$$

1. táblázat
A lymphocytá dependens antitest (LDA) specifikitása
 +: CI > 10% -: CI < 10%

Célsejt	LDA		
	humán anti-D antiszérum	csirkevvs elleni nyúl antiszérum	csak tápfolyadék
„0” Rh pozitív humán vvs	+	-	-
„0” Rh negatív humán vvs	-	-	-
csirke vvs	-	+	-

eredményeket az 1. táblázatban tüntettük fel. Az Rh pozitív emberi vörösvérsejteket csak az anti-D szérumban jelenlétében pusztították el az effektorsejtek, ugyanígy a csirkevörösvérsejtek csak az ellenük termelt nyúl-antiszérum jelenlétében haemolysálódtak az effektorsejtek hatására. Sem az effektorsejtek specifikus LDA nélkül, sem a LDA-k effektorsejtek hiányában nem okoztak számottevő cytotoxicitást. A cytotoxicitást az anti-D szérumban eredete és titerbe befolyásolta. Kísérleteinkben mindig ugyanazt a magas titerű LDA-t igyekeztünk használni, mely a legjobb cytotoxicitást biztosította.

2. táblázat
Nylon-vatta szeparálás hatása a lymphocytá populációkra és az ADCC-ra (X ± SEM; n = 24)

Szeparálás	Rozetta (%)				sIg sejtek	Cytotoxicitás (CI%)
	E	EA		EAC		
		sIg-neg.	sIg-pos.			
Ficoll—Uromiro	71,9 ± 1,0	7,2 ± 0,7	18,6 ± 1,9	11,2 ± 0,9	18,6 ± 1,8	32,9 ± 0,3
Nylon vatta és Ficoll—Uromiro	89,8 ± 0,6	16,5 ± 1,3	3,2 ± 0,3	0,5 ± 0,2	3,2 ± 0,3	46,2 ± 0,3*

* : p < 0,01

A spontán felszabadulás 5,5—11,5% volt (átlag ± SEM : 8,94% ± 0,42). A cytotoxicitást csak akkor tekintettük pozitívnak, ha a teszt release szignifikánsan nagyobb volt a spontán felszabadulásnál (p < 0,01) és a CI nagyobb volt 5%-nál.

Eredmények

A LDA specifikitása

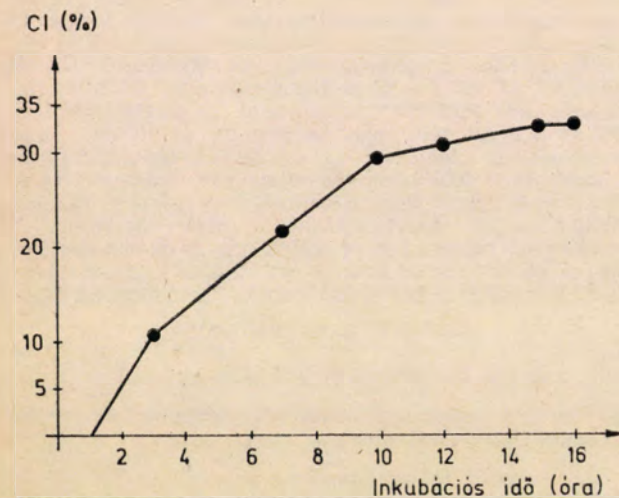
Rh pozitív és negatív humán vörösvérsejteket és csirkevörösvérsejteket ⁵¹Cr-mal jeleztünk a fenti módon, és vagy humán anti-D, vagy csirkevörösvérsejt elleni nyúlserummal inkubáltuk őket. Ezeknek a szérumban az említett célsejtek elleni LDA aktivitását vizsgáltuk normális humán mononuclearis effektorsejtekkel, 40 : 1 effektorsejt/célsejt arány és 6 órás inkubáció mellett. Az

Az inkubációs idő hatása a cytotoxicitásra

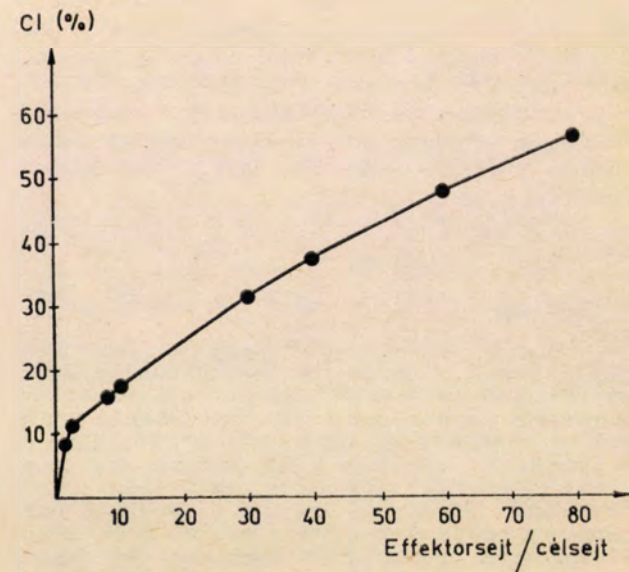
Egészséges véradók mononuclearis peripheriás vérséjtjeinek ADCC aktivitását vizsgáltuk az inkubációs idő függvényében 1—16 órán át. Az effektorsejt/célsejt arány 30 : 1 volt. Háromórás inkubáció már szignifikáns cytotoxicitást eredményezett, mely az inkubáció előrehaladtával tovább növekedett (1. ábra). A görbe 12—15 óra között érte el a platót.

Az effektorsejt/célsejt arány hatása a cytotoxicitásra

Az inkubációs idő 12 óra volt. Az eredményt a 2. ábrán tüntettük fel. Már 2 : 1 effektorsejt/célsejt aránynál szignifikáns cytotoxicitást találtunk, s ez a nagyobb arányokkal folyamatosan növekedett.



1. ábra: Az inkubációs idő hatása a humán ADCC-ra



2. ábra: Az effektorsejt/célsejt arány hatása a humán ADCC-ra

A lymphocita szeparálás hatása a cytotoxicitásra

Nylonvatta oszlopon történő szeparálás után az EAC rozettaképzéssel és felszíni immunglobulin vizsgálattal meghatározott B sejt arány jelentősen csökkent, a T sejt arány fokozódott, és az sIg negatív Fc receptoros sejtek aránya fokozódott (2. táblázat). Ez arra utal, hogy az Fc receptor pozitív sIg negatív sejteket a nylonvatta oszlop nem tartotta vissza. A nylonvatta oszlopon történő szeparálás után az ADCC aktivitás fokozódott ($p < 0,01$).

Egészséges emberek ADCC aktivitása

Tizenhat egészséges donor nylonvatta—Ficoll—Uromiro szeparálással előállított mononuclearis peripheriás vörösvérsejtjeinek ADCC aktivitását vizsgáltuk. Az inkubációs idő 12 óra volt. Valamennyi egyén sejtjei pozitív cytotoxicitást mutattak. Az átlag (\pm SEM) CI 4 : 1 effektorsejt/célsejt aránnyal $8,38 \pm 0,63\%$ (szélső értékek: 5,11—12,82%), 40 : 1 aránnyal $38,74 \pm 0,76\%$ (szélső értékek: 31,24—49,93%) volt.

Chronikus lymphoid B sejt leukaemiában szenvedő (CLL) betegek ADCC aktivitása

Négy CLL-s beteg ADCC aktivitását vizsgáltuk a fenti körülmények között. A vizsgálat időpontjában a betegek nem szedtek immunosuppresszív hatású gyógyszert. Egyik beteg lymphocytái sem mutattak pozitív ADCC aktivitást. Ez meg-
egyezik más szerzők adataival (5, 16).

Megbeszélés

A humán antitest dependens killer sejt populatio kóros körülmények között számbeli és/vagy aktivitásbeli változásainak vizsgálatára jól definiált standard teszt rendszer, azaz specifikus antitesttel bevont célsejt szükséges. Az egyik leggyakrabban használt ilyen rendszer csirkevörösvérsejt elleni specifikus nyúlserummal bevont csirkevörösvérsejtekből áll (15, 16), tehát humán vizsgálatokban xenogén. Az anti-dextrán antitestekkel borított dextránt kötött humán vörösvérsejtek megfelelő allogén célsejtnak bizonyultak, de a dextrán mesterséges komponens, és ennek a teszt rendszernek a használata önkéntes donorok dextránnal történő immunizációját teszi szükségessé (11). Bár a monocyták IgG anti-A-val (9) és anti-D-vel (8) bevont humán vörösvérsejtek elleni cytotoxicitása bizonyítottan tekinthető, a lymphocyták hasonló hatását a legutóbbi időkig nem sikerült egyértelműen kimutatni (7, 14, 17). Ezzel szemben *Urbanik* (18) 1976-ban bizonyította, hogy az anti-D-vel bevont humán vörösvérsejtek elleni cytotoxicitásban a lymphoid K sejteknek is fontos szerep jut.

A különböző vizsgálok eredményei közötti ellentmondások az Rh rendszer komplexitására utalnak.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a humán IgG anti-D antitesttel bevont humán vörösvérsejtek alkalmas *allogén* teszt rendszernek tekinthetők a humán ADCC klinikai vizsgálatára. Egészséges egyének nylonvatta oszlopon szeparált peripheriás mononuclearis vörösvérsejtjei már háromórás inkubáció és 4 : 1 effektorsejt/célsejt arány mellett cytotoxikusnak bizonyultak. A reakció egyes esetekben már 2 : 1 effektorsejt/célsejt aránnyal pozitív volt. Az eredmények jól reprodukálhatók voltak. A cytotoxicitás az inkubációs idővel és az effektorsejt/célsejt aránnyal fokozódott. A monocyták nagy részének és a B sejteknek nylonvatta oszlopon való eltávolítása után a cytotoxicitás fokozódott. Ez arra utal, hogy fenti teszt rendszerben az Fc receptoros sIg negatív lymphoid sejtek killer funkciót töltenek be. A kombinált nylonvatta—Ficoll—Uromiro szeparálás után megmaradó csekély számú monocytá esetleges aktivitása nem zárható ki teljesen.

Az ismertetett allogén teszt rendszert hasznosnak véljük a humán ADCC aktivitás klinikai tanulmányozásában.

Összefoglalás. A szerzők egészségesek és leukaemiás betegek kombinált nylonvatta—Ficoll—Uromiro szeparálással előállított mononuclearis sejtjeinek antitest dependens cytotoxicitását vizsgálták allogén teszt rendszerben. Célsejtként Rh pozitív humán vörösvérsejtet, lymphocytá dependens antitestként humán anti-D szérumot használtak. Az egészségesek mononuclearis sejtjeit mindig cytotoxikusnak találták, viszont a chronikus lymphoid B sejt leukaemiában szenvedő betegek sejtjei nem voltak cytotoxikusak. Fenti allogén teszt rendszert alkalmasnak tartják a humán antitest dependens celluláris cytotoxicitás klinikai tanulmányozására.

IRODALOM: 1. *Bianco, C. és mtsai:* J. exp. Med. 1970, 132, 701. — 2. *Böyum, A.:* Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968, 21, suppl. 97. — 3. *Brain, P., Marston, R. H.:* Eur. J. Immunol. 1973, 3, 6. — 4. *Fekete B. és mtsai:* Haematologia (Budapest). 1974, 8, 353. — 5. *Gale, R. P. és mtsai:* Clin. Immunol. Immunopathol. 1975, 3, 377. — 6. *Hayward, A. R.:* Immunology. 1974, 26, 61. — 7. *Hinz, C. F., Chickosky, J. F.:* Proceedings of the Sixth Leukocyte Culture Conference. New York 1972. 699. — 8. *Holm, G.:* Int. Arch. Allergy. 1972, 43, 671. — 9. *Holm, G., Hammarström, S.:* Clin. exp. Immunol. 1973, 13, 29. — 10. *Láng I. és mtsai:* Orv. Hetil. 1977, 118, 1585. — 11. *Larsson, A. és mtsai:* Scand. J. Immunol. 1975, 4, 241. — 12. *MacDonald, H. R. és mtsai:* Scand. J. Immunol. 1975, 4, 487. — 13. *MacLennan, I. C. M.:* Transplant. Rev. 1972, 13, 67. — 14. *MacLennan, I. C. M., Loewi, G.:* Nature. 1968, 219, 1067. — 15. *Perlmann, P., Holm, G.:* Advanc. Immunol. 1969, 11, 117. — 16. *Perlmann, P., Perlmann, H.:* Cell. Immunol. 1970, 1, 300. — 17. *Perlmann, P. és mtsai:* J. Reticuloendothel. Soc. 1975, 17, 241. — 18. *Urbanik, S. J.:* Br. J. Haematology. 1976, 33, 409.