

Dr. Hajtó Tibor:

Egy növényi lektin (VAA1) immunmodulációs hatásának in vivo vizsgálata egér timocitákon

(Immunomodulatory effect of a plant lectin (VAA1) studied in mice thymocytes in vivo)

PhD tézis-tervezet

PTE-ÁOK Doktori Iskola B139 „Az Immunológia alapjai” alprogram

Alprogram vezető: Prof. Dr. Németh Péter

Témavezető: Dr. Berki Tímea

PTE-ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

P é c s

2002

Összefoglalás

Számos betegség és klinikai szituáció kezelésében a medicina egyik legrégebbi törekvéseihez tartozik, hogy a természetes immunvédekezést erősítsük toxikus mellékhatás nélkül és ezáltal gátoljuk a patológiás állapotok progresszióját valamint javítsuk a betegek életminőségét.

A fehér fagyöngy (*Viscum album*) galaktozid specifikus lektinje (VAA-I) a természetes immunrendszer celluláris aktivitását (így például a granulocyták priming-ját vagy a természetes killer sejtek cytotoxicitását) stimulálni tudta alacsony és nem toxikus 0.5-3 ng/kg dózisban különböző állat modellekben. Az in vitro tesztekben VAA-I hasonló adagban segíti elő az apoptózist és a természetes immunrendszer celluláris elemeinek aktiválását. Az in vivo vizsgálatok során a természetes immunfunkciók mellett a keringő lymphocyták koncentrációja is egy Gauss típusú dózis-hatás eloszlást mutatott, melynek biológiai mechanizmusa még nem tisztázott. Mivel a thymocyták maturációja kétségtelen szerepet kap ezen hatásokban, jelen vizsgálatok célja az volt, hogy a lektin (VAA-I) hatását immuncytokémiai és áramlási cytometriai technikával vizsgáljuk a thymocytákra in vivo. Balb/c egerek thymocytáinak teljes sejt számát, limfoid sejt megoszlását, azaz a double negative (DN), double positive (DP), CD4+ valamint CD8+ sejtek arányát, apoptózisának mértékét és a glikokortikoid kötő receptor expressziós kinetikáját határoztuk meg 1, 4 és 21 napig tartó (hetenként 2-szer alkalmazott 1 és 30 ng/kg) lektin kezelése után. VAA-I mindkét vizsgált, de főleg a magasabb dózisban szignifikáns thymocytá proliferciót indukált a DN, DP és CD8+ subpopulációkban. 30 ng/kg VAA-I az apoptotikus sejtek arányának szignifikáns emelkedését okozta, amely főleg a single positive (SP) sejteket érintette. 1 ng/kg VAA-I viszont erősebb protektív hatást fejtett ki a dexamethasone (DX) által indukált fokozott apoptózis miatt kiváltott thymocytá szám redukcióra. A magasabb (30 ng/kg) lektin dózis additív módon fokozta a DX által indukált apoptózist, amely két különböző hatásból tevődik össze. VAA-I a SP sejtekre, DX viszont főleg az éretlen (DN és DP) sejtekre hat. Párhuzamosan ezzel a lektin emelte a glucocorticoid (GC) high pozitív thymocytá számát főleg a DP, de a többi subpopulációban is. Az elvégzett vizsgálatok új megvilágításban járulnak hozzá azokhoz az eredményekhez, amelyek a VAA-I immunmodulációs hatását egy Gauss típusú dózis-hatás eloszlásban igazolták. Jelen adatok továbbá azt is felvetik, hogy VAA-I a thymocytá maturációjára hatással van és emeli a thymocytá GC érzékenységét. Jelen eredmények terápiás jelentőségének megítéléséhez még további vizsgálatok szükségesek..

Bevezetés, kutatási előzmények

Különböző betegségek, de főleg a tumorok terápiájában egy régi álomnak mondható az a törekvés, hogy a természetes immunvédekezést erősítsük toxikus mellékhatások nélkül és ezáltal gátoljuk a betegségek illetve a rák progresszióját. Sajnos ezeknek az attraktív elképzeléseknek a képviselője az utóbbi évtizedekben egyre inkább a természetgyógyászat keretei közé került, mivel a természettudományos kutatásokra támaszkodó medicinának sokszor nehézségeket okoz állást foglalni az immunrendszer szerepéről a különböző betegségek kialakulásában és a tumorimmunológia számos fontos kérdésében.. Ennek ellenére nem szabad ezeknek a kutatási irányzatoknak semmi esetre sem átkerülni egy „alternatív” medicinába.

Az immunmodulációs kezelések másik nehézségét az a tény képezi, hogy a bonyolult kaskade mehanizmusokra épülő immunrendszer nem modulálható folyamatosan, csak bizonyos ritmusok betartásával, amely figyelembeveszi a biológiai szabályozás kinetikáját.

Lassan több mint 60 éve használnak Európa néhány országában fagyöngy leveléből és szárából származó vizes növényi kivonatokat a rák gyógyítására mint immunmodulátort. A vezető hatóanyagot viszont csak 10 évvel ezelőtt sikerült kimutatni a fagyöngyben. Ez egy galaktozidspecifikuss cukorkötő fehérje (lektin), amelynek eltávolítása a növényi extraktokból az immunmodulációs hatás elvesztését okozta *in vivo* kísérletekben. [1]. Ezért a fagyöngy kutatás az elmúlt 10 évben a benne levő lektinre koncentrált.[2-3]. A döntő biológiai hatásokat egy galaktosidspecifikus lektin, a *Viscum album agglutinin* (VAA)-I képviseli, amely ma már rekombináns formában is rendelkezésre áll. A fehér fagyöngy (*Viscum album*) lektinjé (VAA-I) két láncból áll. A 29 kd molekulásúlyú „A-lánc” N-glikozidáz aktivitása révén egy erős riboszoma inaktivátor [4-8]. A cukorkötő 34 kd molekulásúlyú „B-lánc” felelős a lektin molekula immunmodulációs hatásáért [9-11].

Különböző eukaryota sejtek kultúrájában a DNS-fragmentáció és a hypodiploid DNS-peak vizsgálata révén sikerült kimutatni, hogy a VAA-I 10 ng/ml feletti koncentrációban képes, 24 óra inkubáció után, apoptózist indukálni [12]. PCR és ELISA vizsgálatok kimutatták, hogy 1 és 10 ng/ml közötti koncentrációban a VAA-I stimulálta a humán perifériás mononukleáris sejtekben történő proinflammatorikus citokinek szintézisét és termelését [10, 13]. Ezek az eredmények azzal is összefüggnek, hogy VAA-I az inflammatorikus sejtvonalakhoz (monociták, granulociták és NK sejtek) erősebben kötődik, mint egyéb immunsejtekhez [10]. VAA-I együttes inkubációja interleukin (IL)-2-vel és IL-12-vel additív módon tudta fokozni azoknak a természetes ölü sejtekre (NK sejtek) kifejtett stimulációs hatását [14]. Ezek az *in vitro* adatok összhangban vannak az *in vivo* eredményekkel [14-15]. A természetes immunrendszer egyes celluláris funkciója, úgymint a granulocyták phagocytosis aktivitása, az NK sejtek cytotoxikus hatása és az ún. large granular lymphocyták (LGL sejtek) koncentrációja Gauss típusú dózis-hatás eloszlást mutat, ha ezeket kísérleti állatokban 24 vagy 48 órával a lektin injekciók beadása után vizsgáljuk [14-15]. PBMC és csontvelői CD34+ sejtek 14 napos kultúrájában a VAA-I hematopoetikus növekedési faktorokkal együtt adva fokozta az őssejtek kolónia képzését és növekedését [16]. A természetes immunrendszer egyensúlya számos betegségben (pl. egyes autoimmun kórképekben és rosszindulatú daganatok esetében is), ma már egyre jobban megértett mechanizmusok révén zavart szenved, ami esetleg a VAA-I adásával pozitívan befolyásolható lehet.

Az *in vivo* vizsgálatok során a természetes immunfunkciók mellett a keringő lymphocyták koncentrációja is egy Gauss típusú dózis-hatás eloszlást mutatott [14-15, 17-20], melynek biológiai mehanizmusa még nem tisztázott. Mivel a thymocyták maturációja kétségtelen szerepet kap ezen hatásokban, jelen vizsgálatok egyik célja az volt, hogy a lektin (VAA-I)

hatását immuncytokémiai és áramlási cytometriai technikával vizsgáljuk a thymocytákra in vivo.

A T lymphocyták szigorú szelekciós folyamatokon esnek át a thymusban, hogy az autoreaktív és a nem funkcióképes sejtek ne juthassanak el a periferiára [21]. A glucocorticoid (GC) hormonok, amelyeket a thymus epitheliális sejtjei is termelnek [22], valószínűleg fontos szerepet játszanak a T lymphocyták fejlődésében, de ennek pontos hatásmechanismusáról még nincsenek egyértelmű elképzelések. Az érett és éretlen thymocyták glucocorticoid érzékenysége jelentősnek tűnik mind a pozitív és negatív szelekcióban, mivel transzgenikus egerekben, ahol a glucocorticoid receptorok (GCR) expressziója csökkentett mértékű, a thymocyták abnormalis fejlődést mutatnak [21]. A thymocytákon a GCR szint magasabb, mint a splenocytákon. A thymocytá subpopulációk között a DP sejtek felszínén található a legkevesebb GCR [23]. A neutrophil sejteken pedig kevesebb GCR van, mint a lymphocytákon vagy a monocytákon [24]. Mindezek a különbségek az immunsejtek GCR expressziójában felvetik a kérdést, hogy nincs-e összefüggés az egyes subpopulációk GCR szintje és GC érzékenysége között. Valóban GCR deficiens thymocyták rezisztensek a GC által indukált apoptózisra [25]. Azonban GCR gen depléciója esetén normális thymocyte fejlődést is megfigyeltek [26], ami arra utal, hogy a GCR expressziója nem kizárólagos meghatározója az immunsejtek GC érzékenységének [25].

Vizsgálatainknak második része ezért annak tisztázására irányult, hogy hogyan hat a VAA-I a GC által indukált thymocytá apoptózisra és a különböző subpopulációk GCR expressziójára.

Elvégzett vizsgálatok:

A fagyöngy lektin immunmoduláló hatásának igazolására fiatal BALB/c egereket választottunk. Ezen a beltenyésztett egértörzsön előkísérleteink során már többször sikerült a VAA-I immunmodulációs hatását kimutatni immuncytokémiai módszerekkel. A meghatározott protokoll szerint adott VAA-I hatását monoklonális ellenanyagokkal végzett áramlási cytometriás mérésekkel határoztuk meg. Így az immunbiológiai hatás tisztázása mellett a preklinikai és a későbbi klinikai vizsgálatok számára a lektin-hatás mérésének standardizálását és az eredmények reprodukálhatóságának biztosítását is igyekeztünk elősegíteni. Mivel VAA-I hasonló adagban segíti elő az apoptózist és a természetes immunrendszer celluláris elemeinek aktiválását, a lektinnek a nyirokszervekre, elsősorban a thymusra gyakorolt hatásának a vizsgálatát, immuncytokémiai és áramlási cytometriai technikával a következő protokoll szerint végeztük:

Az állatok a következő lektin adagokat kapták hetente két alkalommal, szubkután, 3 héten keresztül beadni:

- Izotoniás NaCl mint negatív kontrol
- 1 ng /kg lektin
- 1 ng/kg lektin + 1 mg /kg dexamethason
- 30 ng/kg lektin
- 30 ng/kg lektin + 1 mg/kg dexamethason
- 1 mg/kg dexamethason mint pozitív kontrol

Az egerek egy csoportja 24 órával az első injekció után, egy második része 4 napi és a többi 3 heti kezelés után a következő paraméterekre lett vizsgálva:

- 1.) Thymus teljes sejtszám meghatározás
- 2.) Thymus sejtek korai és késői apoptózisának meghatározása
- 3.) Flow-cytometriás vizsgálatok a limfoid sejtek megoszlásának és a GCR expressziós kinetikájának meghatározásával:

A vizsgálatok fontosabb célkitűzései:

- 1.) A lektin (VAA-I) immunmodulációs hatásának in vivo vizsgálata
- 2.) Az érett CD4+ és CD8+ valamint az éretlen DN és DP sejtek lektin által kiváltott proliferációjának és apoptózisának meghatározása
- 3.) VAA-I protektív hatásának vizsgálata a GC által indukált thymocytá sejt szám redukcióra.
- 4.) VAA-I-nak a GC által indukált apoptózisra gyakorolt additív hatásának meghatározása a különböző thymocytá subpopulációkban
- 5.) Thymocyták GCR expressziójának vizsgálata
- 6.) Gauss típusú dózis-hatás eloszlás további interpretációja az új ismeretek birtokában.
- 7.) A preklinikai és a későbbi klinikai vizsgálatok számára a lektin-hatás mérésének standardizálását és az eredmények reprodukálhatóságának biztosítását is szeretnénk ezekkel az eredményekkel elősegíteni

Anyagok és módszerek

Anyagok

VAA-I a friss növény leveléből és szárából készült vizes extraktumból laktoz-agaroz oszlopon lett izolálva, ahogyan ezt előzőleg publikáltuk [15]. Endotoxin kontamináció a használt lektinoldatokban mindig kevesebb volt, mint 0.5 pg/ml a kvantitatív kinetikus LAL assay alapján. Dexamethason (DX) N.V.Organon Oss Holland cégtől lettek vásárolva. Az apoptózis meghatározásához Annexin V-FITC a Pharmingentől (kat.sz. 556420) és propidium jodid a Sigmától (p 4170) lett alkalmazva.

A hármas jelöléssel járó kísérletekhez a következő monoklonális antitestek lettek használva: phycoerythrin (PE) patkány egérelles CD4 (L3T4, Pharmingen, kat.sz.:09005A) és Cy-chrome konjugált patkány egér ellenes CD8 (L-2 Pharmingen kat.sz. 553034). Anti-GCR-FITC a saját laboratóriumban lett előállítva [26].

Az állatok kezelése

Hím és nőstény Balb/c egerek mindig fele-fele arányban lettek kezelve és vizsgálva. Az állatok (átlagos életkoruk 6 hét, testsúlyuk 20 g +/-10%) Charles Rivers Laboratóriumból lettek vásárolva. Az állatok randomizáltan kerültek hármas csoportokba. Az állatok subkután hetenként kétszer lettek a következő injekciókkal kezelve: placebo (phosphat puffer), 1 ng/kg és 30 ng/kg VAA-I egyedül vagy 1 mg/kg DX-val. Az egerek egy csoportja 24 órával az első injekció után, egy második része 4 napi és a többi 3 heti kezelés (72 órával az utolsó injekció) után lett egy gyors decapitációt követően vizsgálva.

Thymocyták preparációja, festése és analysise

A thymus mirigy eltávolítás után jeges PBS oldatba lett helyezve, majd üveg/üveg homogenizátorral homogenizálva. A sejt suspenzió nylon mesh filterrel lett megsűrűve. A thymocyta kétszer lettek PBS-ben mosva, majd a sejt szám és a viabilitás trypan blue segítségével hemocytometerrel lett meghatározva. 1×10^6 thymocyta a kötő pufferban (PBS/ 0,1%NaN₃/ 0,1%BSA) CD4 és CD8-ra lett jelölve 30 percig, majd 2-szeri PBS-vel végzett mosás után PBS /0,1%PFA oldatba lett helyezve a flow cytometriás analízisig. A korai apoptózis vizsgálathoz 15 percig tartó Annexin V-FITC jelölés lett használva. A késői apoptózis meghatározásához a sejtek 4%-os PFA-val való fixálás után szaponin pufferben (0,1% Szaponin /0,1% BSA/ 0,1% NaN₃ PBS-ben) 50 µg/ml propidium jodiddal lettek 30 percig szobahőmérsékleten inkubálva. A minták FACS Calibur flow cytometerrel (Becton Dickinson, San Jose CA) lettek analizálva CellQuest software-t alkalmazva.

Statisztikai analysis

Az eredmények Student's t test és a Wilcoxon, Mann és Whitney féle U test segítségével a Statgraphics statisztikai IBM computer program keretében lettek statisztikailag analizálva.

Eredmények

VAA-I hatása a thymocyta proliferációjára

Ha 24 órával egyetlen lektin injekció után a thymocyta totális száma lett meghatározva, nem volt kimutatható különbség a kezelt és a kontrol csoportok között (1. ábra A része). Ha a DN, DP és SP thymocyta subpopulációk lettek összehasonlítva, akkor a CD8+ thymocyta 1 ng/kg VAA-I után 70%-os és 30 ng/kg VAA-I után 44%-os emelkedést mutattak ($p < 0.025$ ill. $p > 0.05$). Ezzel egyértelműen a CD4/CD8 ratio csökkent a thymusban 39 ill 38 %-kal 24 órával a két lektin dózis után ($p < 0,01$ ill. $p < 0,01$). (2. ábra C része, táblázat A része). Ezzel ellentétben a perifériás vérben 1 ng/kg után 74 %-kal és 30 ng/kg lektin dózis után 55 %-kal emelkedett a CD4+/CD8+ ratio ($p < 0,005$ ill. $p < 0,01$) (2. ábra A rész).

Az állatoknak egy másik csoportja 3 hétig lett kezelve a lektinnel (VAA-I) hetente kétszer és 72 órával az utolsó injekció után lettek a vizsgálatok elvégezve. Ahogyan ezt az 1. ábra B része mutatja mindkét lektin dózis után emelkedett a thymocyta totális száma ($p < 0,05$ ill. $0,025$). Ha az egyes thymocyta subpopulációk lettek összehasonlítva (a táblázat B része), akkor 30 ng/kg lektin dózis után CD4+ sejtek kivételével valamennyi vizsgált sejt típus (DN, DP és CD8+) szignifikáns emelkedést mutatott ($p < 0,01$, $p < 0,05$ ill. $0,0025$). 1 ng/kg VAA-I után szintén valamennyi thymocyta subpopuláció emelkedett, de ez csak a CD8+ populáció esetén volt szignifikáns, ami arra utal, hogy a CD8+ thymocyta subpopuláció mutatja a legnagyobb érzékenységet a lektin indukálta proliferációra.

VAA-I gátló hatása a glucocorticoid által indukált thymocyta szám redukcióra

Mivel jól ismert, hogy GCs jelentősen redukálják a thymocyta számát a thymusban és ezt a jelenleg elvégzett vizsgálatok is igazolták (1. ábra A és B részének 4. oszlopai), ezért most a lektin hatása is vizsgálva lett erre a DX által indukálta thymocyta szám redukcióra. Ha DX VAA-I-val együtt lett adva, akkor a lektin szignifikánsan mérsékelte a GC által-indukált sejtszám redukciót a thymusban. (1. ábra A és B részének 5. és 6. oszlopa). A lektinnek ez a protektív hatása valamennyi vizsgált subpopulációt (DN, DP, SP) érintette (táblázat B része).

Mindkét lektin dózis hatásosnak bizonyult, de 1 ng/kg erősebben volt protektív, mint a 30 ng/kg.

VAA-I hatása a thymocyták apoptózisára

Mivel a lektin indukálta fokozott thymocyta proliferáció egy gyorsabb maturáció (pozitív és negatív szelekció) révén az apoptotikus sejteknek emelkedett számát is okozhatja, fontos volt ezt ugyanabban az állatmodelben szintén vizsgálni. Ahogyan ezt a 3. ábra A része mutatja, az apoptotikus thymocyták százalékos aránya 1,9-szeresen és 2,2-szeresen emelkedett 24 órával 1 ng/kg és 30 ng/kg VAA-I adása után ($p < 0,07$ ill. $p < 0,05$). Ugyancsak 30 ng/kg lektin dózis hatása bizonyult erősebbnek, ha a korai apoptózist a phosphatidylserin expressziójával mértük a thymocyta subpopulációk felületén. Ahogyan ezt a 4. ábra mutatja, 24 órával 30 ng/kg lektin injekció után a SP CD4+ és CD8+ sejtek mutattak 2-szeres illetve 1,7-szeres emelkedést. Az állatok egy másik csoportjában, amelyek 3 hétig lettek kezelve (3. ábra B része), 72 órával az utolsó 30 ng/kg lektin injekció után 54 %-kal emelkedett az apoptotikus sejtek száma ($p < 0,01$).

VAA-I hatása a DX által indukált apoptózisra

Mivel GC hormonok jelentős szerepet töltenek be a thymus sejtek fejlődésében (a pozitív és negatív szelekcióban) és mind in vitro, valamint in vivo kísérletekben jelentősen fokozzák a thymocyták apoptózisát, ezért fontos volt a lektin hatását a DX által indukált apoptózisra ugyanabban az állatmodelben szintén vizsgálni. Ahogyan ezt az 5. ábra mutatja 30 ng/kg VAA-I szignifikánsan emelte a CD4+ és CD8+ SP thymocyták korai apoptózisát ($p < 0,025$ ill. $p < 0,01$). Azonban a különbség 24 órával az injekció után viszonylag kicsi volt, ha a lektin egyedül vagy 1 mg/kg dexametasonnal együtt lett adva. Ha a lektin a 0 és 3. napon lett injektálva napi 2 mg/kg DX mellett, 4 nap után a kombinációs adagolás már szignifikánsan magasabb százalékban ($p < 0,05$) okozott késői apoptózist (23 +/-3,1%) mint VAA-I egyedül (15,1 +/-1,7). Ez a különbség 3 hét után is kifejezett maradt (6. ábra). 30 ng/kg VAA-I egyedül 54 %-ban, 1 mg/kg DX egyedül 13 %-ban, de a kettő kombinációjában 100 %-ban emelte az apoptotikus sejtek százalékos arányát ($p < 0,05$).

VAA-I hatása a thymocyták glucocorticoid receptorára (GCR)

A thymocyták lektin indukálta fokozott apoptózisa miatt felmerült az a kérdés is, hogy VAA-I hat-e a thymus sejtek GCR expressziójára. 24 órával a lektin injekció után szignifikáns változások még nem voltak észlelhetők. 4 napi kezelés után főleg a GCR high pozitív DP és kevésbé a DN sejtek száma emelkedett szignifikánsan (7. ábra, $p < 0,05$). A DP thymocyták GCR fluorescence intenzitása pedig szintén 2,5-szeresére emelkedett a 4 napos kombinációs kezelésre.

72 órával az utolsó injekció után a 3 heti kezelést követően a GCR high pozitív sejtek száma hasonló mértékben 20 % felett (8. ábra) emelkedett minden thymocyta subpopulációban.

Megbeszélés

Jelen eredmények összhangban vannak az előzetes in vitro leletekkel [12], mivel VAA-I in vivo mind proliferációt és mind apoptózist indukál a thymusban, mely az érett és éretlen thymocytákat egyaránt érinti. Ezeknek a hatásoknak esetleges mechanizmusaként felmerül a

lektin (VAA-I) által indukált proinflammatorikus aktivitás is, mivel interleukin (IL)-1beta, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-alpha és interferon (IFN)-gamma jelentős szerepet töltenek be a thymocyták proliferációjában és apoptózisában [27-32]. Ennek a feltevésnek a korrekt megítélése azonban még további vizsgálatokat tesz szükségessé.

Különböző eukaryotikus sejtek kulturájában VAA-I modulálta a protein synthesist, mivel - ez mint már említve volt - VAA-I a 29 kd molekulásúlyú A-láncának N-glikozidáz aktivitása révén egy erős riboszoma inaktívátor [4-8]. A lektinnek az apoptotikus hatásában a caspase-3 legalább is részben szerepet játszik. [33]. Jelen in vivo vizsgálatok összhangban vannak azokkal az in vitro leletekkel, melyek szerint a VAA-I által indukált apoptózis dózis-dependens. 24 órás sejtkulturákban VAA-I 10 és 1000 ng/ml közötti koncentrációban okozott programozott sejthalált [33-34]. Az in vivo vizsgálatok szerint 30 ng/kg lektin dózis erősebben hat a thymocyták proliferációjára és apoptózisára, mint 1 ng/kg VAA-I. Viszont 1 ng/kg lektin dózis erősebben volt protektív a DX által indukált thymocytá sejt szám csökkenésre. Valamennyi apoptózis vizsgálatot összevetve a lektin hatás a fokozott szelekciós folyamatok következménye is lehet ellentétben a DX által indukált direkt apoptózissal az éretlen thymocytákon. Mind a protektív és mind az apoptózist stimuláló hatás klinikai jelentőségének megítélése (pl. GC rezisztencia esetén) további vizsgálatokat tesz szükségessé.

A GC hormonoknak talán a legismertebb hatása az immunsuppresszió, amely a thymocytákat is erősen érinti. A thymusban ugyanis GC hormonok potens apoptózis indukerek. Így például egy stressz situáció által indukált emelkedett GC koncentráció a DP sejtek fokozott halálát tudja előidézni [22]. Thymus epithélisejtek is termelnek endogen GC hormonokat, amelyek jelentős szerepet töltenek be a DP thymocyták pozitív szelekciójában [22]. Érdekes módon a DP thymocytákon található a legalacsonyabb GCR expresszió [23]. Fokozott GCR gén expresszió egerekben emelni tudta GC-indukálta thymocytá apoptózist [35]. Ezek a hatások a GCR expresszió regulációs jelentőségét támasztják alá különböző fiziologias és pathologias folyamatokban.

Korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy VAA-I modulálni tudja bizonyos lymphocytá populációk „circulating pool”-jának mértékét [14, 36]. A lymphocytá számot emelő alacsony (0,5 - 1 ng/kg) és a lymphocytá számot csökkentő magasabb (>30 ng/kg) lektin dózisok hatásai között szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők [14]. A thymocytá és peripherias lymphocytá számot szabályozó homeosztatis reguláció ma még nem egészen megértett. Transzenikus egerekben, amelyeknek redukált GCR expressziója van, fokozott thymocytá és T sejt számot mutattak ki [37]. Így ez nagyon valószínűnek látszik, hogy a fiziologias GC és GCR szint szerepet kap a thymocytá és T sejtek pool-jának ellenőrzésében. Említett adatok miatt a lektin (VAA-I) által indukált GCR expresszió emelkedés és additív hatás a DX által kiváltott apoptózisra talán segítséget nyújtanak a lektin Gauss típusú dózis-hatás eloszlásának jobb megértéséhez.

A lektin additív hatása a DX által indukált apoptózisra 2 különböző akcióból tevődhet össze. A DX apoptotikus hatása erősebben irányul az éretlen thymocytákra, míg VAA-I inkább az érett sejtekre hat. Ennek az additív hatásnak esetleg therapias jelentősége lehet, ha GC magasabb plasma szintje alacsonyabb GC érzékenységet, vagy rezisztenciát vált ki. Emellett VAA-I a lymphocytá „circulating pool”-jára protektív hatást is gyakorol, amely esetleg tovább javíthatja a therapias eredményeket a GC kezelés folyamán.

Tablázat

A. Egyetlen VAA-I and DX kezelés hatása a thymocyta subpopulációkra x 10⁶ (SEM)

Thymus	Ctrl	VAA 1ng	VAA 30ng	VAA 1ng +DX	VAA 30ng +DX	DX
DN	2,4 (0,4)	3,0 (0,5)	4,7 (0,1)	#1,6 (0,4)	1,8 (0,6)	*1,2 (0,1)
DP	117,8 (7,5)	97,1 (1,3)	104,5 (13)	64,4 (14)	55,7 (13,0)	*48,1 (5,4)
CD4+	12,5 (1,4)	12,7 (1,7)	10,5 (1,2)	9,0 (1,7)	8,2 (2,4)	*5,4 (0,2)
CD8+	4,9 (1,3)	*8,4 (1,2)	7,1 (1,7)	7,0 (2,8)	6,9 (2,9)	*2,3 (0,03)

B. 3 heti VAA-I and DX kezelés hatása a thymocyta subpopulációkra x 10⁶ (SEM)

Thymus	Ctrl	VAA 1ng	VAA 30ng	VAA 1ng +DX	VAA 30ng +DX	DX
DN	3,2 (0,7)	3,5 (0,2)	*4,7 (0,24)	#4,8 (1,6)	#3,0 (0,8)	*0,9 (0,3)
DP	48,8 (14,7)	69,7 (15,9)	*101 (18,0)	#54,4 (16)	#53,7 (16,7)	*10,2 (1,5)
CD4+	7,2 (1,4)	9,4 (0,9)	10,6 (2,1)	#7,6 (2,0)	#6,3 (1,8)	*2,2 (0,3)
CD8+	2,3 (0,3)	*3,6 (0,08)	*4,4 (0,1)	#3,8 (0,9)	5,0 (3,0)	*0,9 (0,3)

DN, DP, CD4+ és CD8+ thymocyta átlagos abszolút száma (+SEM) lett összehasonlítva különböző kezeléseket után. (*) azt jelenti, hogy az érték a negatív kontrolhoz hasonlítva szignifikáns (p<0,05), míg (#) a pozitív kontrolhoz (DX kezelést egyedül kapó csoport) képest jelzi a statisztikai szignifikanciát.

Irodalom:

1. Sharon, N., Carbohydrates as recognition determinants in phagocytosis and in lectin-mediated killing of target cells. *Biol. Cell* 1984. **51**: 239-246.
2. Ziska, P. and Franz, H., Determination of lectin contents in commercial mistletoe preparations for cancer therapy using the ELISA technique. In Bog Hansen, T.C. and Breborowicz, J. (Eds.) *Lectins, Vol IV*. Walter de Gruyter & Co press, Berlin 1985, pp 473-480.
3. Dietrich, J.B., Ribereau-Gayon, G., Jung, M.L., Franz, H., Beck, J.P. and Anton, R., Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album L.*) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. *Anticancer Drug*. 1992. **3**: 507-511.
4. Franz, H., Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 1986. **43**: 23-34.
5. Endo, Y., Tsurugi, K. and Franz, H., The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *Febs Lett* 1988. **231**: 378-380.
6. Sandvig, K. and Olsnes, S., Entry of the toxic proteins abrin, modeccin ricin and diphtheria toxin into cell. II. Effect of pH, metabolic inhibitors, and ionophores and evidence for toxin penetration from endocytotic vesicles. *J Biol Chem* 1982. **257**: 7504-13.
7. Wiedlocha, A., Sandvig, K., Walzel, H., Radzikowsky, C. and Olsnes, S., Internalization and action of an immunotoxin containing mistletoe lectin A-chain. *Cancer Res*. 1991. **51**: 916-920.
8. Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A., Isolation and characterization of viscum, a toxic lectin from *Viscum album L.* (Mistletoe). *J. Biol. Chem.* 1982. **257**: 13263-70.

9. Lee, R.T., Gabius, H-J. and Lee, Y.C., The sugar-combining area of the galactose-specific toxic lectin of mistletoe extends beyond the terminal sugar residue: comparison with homologous toxic lectin, ricin. *Carbohydr. Res.* 1994. **254**: 269-276.
10. Hostanska, K., **Hajto, T.**, Spagnoli, G., Fischer, J., Lentzen, H. and Herrmann, R., A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat. Immun.* 1995. **14**: 295-304.
11. Walzel, H., Bremer, H. and Gabius, H-J., Lectin-induced alterations in the level of phospholipids, inositol phosphates, and phosphoproteins. In Gabius, H-J. and Gabius, S. (Eds.) *Lectins and Glycobiology*. Springer Verlag, Berlin 1993, pp.357-361.
12. Hostanska, K., **Hajto, T.**, Fischer, J., Mengs, U., Weber, K., Lentzen, H. and Saller, R., Selective modulation of phosphatidylserine exposure on subpopulations of human peripheral blood lymphocytes by a plant lectin, *Viscum album* agglutinin (VAA)-I and its recombinant form (rVAA) in vitro. *Cancer Detect. Prevent.* 1999, **23**: 511-523.
13. **Hajto, T.**, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius H-J., Increased secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 1990. **50**: 3322-6.
14. **Hajto, T.**, Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs, U., Lentzen, H. and Saller, R., Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin (rVAA) on secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. *Nat. Immun.* 1998. **16**: 34-46.

15. **Hajto, T.**, Hostanska, K. and Gabius, H-J., Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res.* 1989. **49**: 4803-8.
16. Vehmeyer K, **Hajto T**, Hostanska K, Könermann S, Lösert H, Saller R, Wörmann
Lectin-induced increase in clonogenic growth of hematopoietic progenitor cells. *Eur J Hematol* 1998; 60:16-20.
17. Beuth J, Ko HL, Tunggal L, Buss G, Jeljaszewicz J, Steuer MK, Pulverer G: Immunaktive Wirkung von Mistellektin 1 in Abhängigkeit von der Dosierung. *Aerzneim Forsch* 1994; 44:1255-8.
18. Beuth J, Stoffel B, Ko HL, Buss G, Tunggal L, Pulverer G: Immunaktive Wirkung verschiedener Mistellektin-1 Dosierungen in Mammakarzinompatientinnen. *Arzneim Forsch* 1995; 45:505-507.
19. **Hajto T**, Hostanska K, Herrmann R: Immunomodulatory potency of mistletoe lectins in cancer patients. Results of a dose finding study. *Allergy (Suppl.)* 1993; 48:548.
20. **Hajto T**, Hostanska K, Gabius H-J: Zytokine als Lektin-induzierte Mediatoren in der Misteltherapie. *Therapeutikon* 1990; 4:136-145.
21. Vacchio MS, Ashwell JD and King LB: A positive role for thymus-derived steroids in formation of the T-cell repertoire. *Ann NY Acad Sci* 840: 317-27, 1998.
22. . Ashwell JD, Lu FW and Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 18 :309-45, 2000.
23. Berki T, Pálinkás L, Boldizsár F and Németh P: Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 14: 463-469, 2002.
24. Miller AH, Spencer RL, Pearce BD, Pisell TL, Azrieli Y, Tanapat P, Moday H, Rhee R and McEwen BS: Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell Immunol* 186: 45-54, 1998.

25. Purton JF, Boyd RL, Cole TJ and Godfrey DI. Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity* 13:179-86, 2000.
26. Berki T, Kumanovics G, Kumanovics A, Falus A, Ujhelyi E and Nemeth P. Production and flow-cytometric application of a monoclonal anti-glucocorticoid receptor antibody. *J Immunol Methods* 214: 19-27, 1998.
27. Deman, J., Van Meurs, M., Claassen, E., Humblet, C., Bonvier, J. and Defresne, M., In vivo expression of interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-2, IL-4 IL-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in the fetal murine thymus. *Immunology* 1996. **89**: 152-157.
28. Von Patay, B., Loppnow, H., Feindt, J., Kurz, B. and Mentlein, R., Chatecholamines and lipopolysaccharide synergistically induce the release of interleukin-6 from thymic epithel cells. *J. Neuroimmunol.* 1998, **86**: 182-189.
29. Positive selection by thymic nurse cells requires IL-1 beta and is associated with an increased Bcl-2 expression. *Cell. Immunol.* 1996, **169**: 174-84.
30. Durkin, H.G. and Waksman, B.H., Thymus and tolerance. Is regulation the major function of the thymus? *Immunol. Rev.* 2001. **182**: 33-57.
31. Artico, M., Cavallotti, C., Camerini, M. and Cavallotti, D., Interleukin 1 beta as stimulator of the rat thymus. *Cytokine* 2001, **15**: 261-265.
32. Baseta, J.G. and Stutman, O., TNF regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3-CD4-CD8-) subset. *J. Immunol.* 2000, **165**: 2621-30.
33. Savoie, A., Lavastre, V., Pelletier, M., **Hajto, T.**, Hostanska, K. and Girard, D., Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I : modulation of de

- novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 2000, **68**: 845-853.
34. Hostanska, K., **Hajto, T**, Fischer, J., Mengs, U., Weber, K., Lentzen, H. and Saller, R.,
Selective modulation of phosphatidylserine exposure on subpopulations of human
Peripheral blood lymphocytes by a plant lectin, *Viscum album agglutinin (VAA)-I* and its
recombinant form (rVAA) in vitro. *Cancer Detect. Prevent.* 1999, **23**: 511-523.
35. Reichardt HM, Umland T, Bauer A, Kretz O and Schutz G. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol Cell Biol* 20: 9009-17, 2000.
36. **Hajto T**, Hostanska K, Fornalski M and Kirsch A. Pilot clinical trial of antitumor activity of beta-galactoside-specific mistletoe lectins given in standardized mistletoe extracts (Iscador^R) *Dtsch Zschr Onkol* 23: 1-6, 1991.
37. Pazirandeh A, Xue Y, Prestegard T, Jondal M and Okret S. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. *FASEB J* 16 :727-9, 2002.