Uloga primateljevih dendritičkih stanica u adoptivnoj imunoterapiji nakon transplantacije koštane srži

Duraković, Nadira

Doctoral thesis / Disertacija

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:390617

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nadira Duraković

Uloga primateljevih dendritičkih stanica u adoptivnoj imunoterapiji nakon transplantacije koštane srži

DISERTACIJA

Zagreb, 2008.

Pokusi u sklopu ovog istraživanja obavljeni su pod vodstvom dr. Lea Luznika u Sidney Kimmel Cancer Comprehensive Center na Sveučilištu Johns Hopkins u Balitmoreu, USA.
Moj rad je omogućen sredstvima znanstvenoistraživačkih projekata financiranih od National Cancer Institute (K08 CA89546, P01 CA15396, and RO1 CA40358), kao i projektom Amy Strelzer Manasevit Scholars Program koji financira Marrow Foundation u suradnji s National Marrow Donor Program, te projektima zaklada Susan Komen Foundation i Multiple Myeloma Research Foundation.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Damir Nemet

Moram prije svega zahvaliti Leu, pružio mi je priliku da se okušam u translacijskom istraživanju iako je znao da nemam nikakvog laboratorijskog iskustva. Bio je izuzetno strpljiv, uvijek brižan, mentor i prijatelj. Sve što znam o transplantacijskoj imunologiji naučila sam od njega ili zahvaljujući njemu.

Veliko hvala dugujem i mom sadašnjem mentoru, prof.dr.sc. Damiru Nemetu, nadam se da nikada neću iznevjeriti veliko povjerenje koje mi je ukazao.

Mnogo je ljudi posredno ili neposredno sudjelovalo u izradi eksperimenata koji su temelj ove disertacije ili je kritički razmatralo istu, previše da bih svakog imenovala. Svakako veliko hvala svim ljudima koji su bili dijelom znanstvenoistraživačkog programa imunologije i imunoterapije u Sidney Kimmel Cancer Comprehensive centru. Želja za znanjem koja se širila hodnicima te zgrade bila je zarazna.

Naposlijetku, hvala mojim roditeljima i bratu na bezrezevnoj podršci koju su mi pružali svih ovih godina.

SADRŽAJ

Popis uporabljenih kratica 1
1. Uvod 3
1.1. Alogenična transplantacija matičnih stanica koštane srži 3
1.1.1. Tkivna snošljivost 4
1.1.2. Bolest transplantata protiv primatelja (GVHD) 5
1.1.3. Patofiziologija GVHD 6
1.1.4. Ciljni organi 7
1.1.5. Učinak transplantata protiv leukemije i davateljeve limfocitne infuzije 8
1.2. Antigen predočne stanice 10
1.2.1. Langerhansove stanice 13
1.2.2. Uloga dendritičkih stanica u transplantaciji 14
2. Cilj rada 16
3. Hipoteze 17
4. Materijali i metode 18
4.1. Životinje 18
4.2. Transplantacija koštane srži, UV zračenje, davateljeve limfocitne infuzije i primjena imikvimoda 18
4.3. Izolacija DC stanica iz slezene, limfnih čvorova i epidermalnih slojeva kože 19
4.4. Priprava i sazrijevanje dendritičkih stanica *ex vivo* 20
4.5. Analiza protočnim citometrom 20
4.6. *In vivo* i histopatološka analiza GVHD 21
4.7. Statistička analiza 22
5. Rezultati 23
5.1. Kimerizam dendritičnih stanica slezene, kože, potkožnih limfnih čvorova, mezenterijalnih limfnih čvorova i T limfocita u MHC-podudarnom i nepodudarnom sustavu.. 23
5.2. Rekonstitucija dendritičkih stanica i T limfocita nakon MHC-podudarne transplantacije 26
5.3. Porijeklo dendritičkih stanica potkožnih limfnih čvorova nakon MHC-podudarne transplantacije 28
5.4. Učinak ukupne doze zračenja i zrelih davateljevih T limfocita na kimerizam dendritičkih stanica nakon transplantacije 35
5.5. Učinak adoptivno prenesenih T limfocita (DLI) na ostatnu populaciju primateljevih epDC 40

5.6. Učinak davateljevog kimerizma na jačinu DLI-posredovane GVH reaktivnosti adoptivno prenesenih T limfocita u MHC-nepodudarnom i MHC-podudarnom modelu 43
5.7. Učinak aktivacije antigen predočnih stanica na GVH reaktivnost adoptivno prenesenih T limfocita 49
5.8. Učinak aktivacije antigen predočnih stanica *in vivo* i adoptivno prenesenih davateljevih T limfocita na GVL reaktivnost i pojavu GVHD u MHC-podudarnom modelu 59
6. Rasprava 64
6.1. Kimerizam dendritičnih stanica slezene, kože i limfnih čvorova, kao i T limfocita ovisan je o stupnju nepodudarnosti u MHC sustavu 64
6.2. Rekonstitucija dendritičkih stanica nakon MHC podudarne transplantacije brža je od rekonstitucije T limfocita 65
6.3. Dendritičke stanice porijeklom iz kože su dominantna rezidualna populacija među primateljevim dendritičkim stanica u limfnim čvorovima nakon MHC-podudarne transplantacije koštane srži, što je rezultat njihove njihove stalne migracije iz kože u mirnom stanju 66
6.4. Ukupna doza zračenja i dodatak zrelih davateljevih T limfocita MHC-podudarnoj koštanoj srži utječu na rekonstituciju davateljevih dendritičkih stanica i količinu preostalih primateljevih dendritičkih stanica u potkožnim limfnim čvorovima 68
6.5. GVH odgovor posredovan adoptivno prenesenim T limfocitima pomaže eliminaciju rezidualnih primateljevih epDC 70
6.6. Rezidualni davateljev kimerizam utječe na jačinu DLI-posredovane GVH reaktivnosti samo u MHC-nepodudarnom ali ne i u MHC-podudarnom modelu 70
6.7. Učinak adoptivno prenesenih T limfocita u ranih kimera moguće je pojačati aktivacijom antigen predočnih stanica upotrebom TLR liganda, dok je za aktivaciju u starijih punih ili mlađih miješanih kimera potrebna upotreba kombinacije dva TRL liganda, ili deplecija primateljevih T limfocita uz aktivaciju dendritičkih stanica 72
6.8. Aktivacijom antigen predočnih stanica in vivo pojačava se GVL reaktivnost adoptivno prenesenih davateljevih limfocita u MHC-podudarnom modelu bez uzrokovanja pojave GVHD 73
6.9. Završna razmišljanja 74
7. Zaključci 77
8. Sažetak 79
9. Summary 80
10. Literatura 81
11. Životopis 90

Popis uporabljenih kratica

ALL	akutna limfocitna leukemija
APC	antigen predočna stanica (prema engl. *antigen presenting cells*)
BM	koštana srž (prema engl. bone marrow)
CCR	receptor kemokina (prema engl. *chemokine receptor*)
CFSE	karboksi-fluorescein diacetat sukcinimidil ester (prema engl. *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*)
CIBMTR	Međunarodna organizacija za istraživanje transplantacije koštane srži (prema engl. *Center for International Bone Marrow Transplant Research*)
CpG	odjeljci DNA gdje se uzastopno ponavljaju citozin i guanin nukleotid, odjeljeni fosfatnom bazom
DC	dendritičke stanice (prema engl. *dendritic dells*)
DLI	davateljeva limfocitna infuzija (prema engl. *donor lymphocyte infusions*)
EBMT	Europsko društvo za transplantaciju koštane srži (prema engl. *European Bone Marrow Transplantation*)
epDC	dendritičke stanice epitelnog porijekla (prema engl. *epithelium derived dendritic cells*)
GVH	učinak transplantata protiv primatelja (prema engl. *graft-versus-host*)
GVHD	bolest transplantata protiv primatelja (prema engl. *graft-versus-host disease*)
GVL	učinak transplantata protiv leukemije (prema engl. *graft-versus-leukemia effect*)
GVT	učinak transplantata protiv tumora (prema engl. *graft-versus-tumor effect*)
HLA	glavni sustav tkivne snošljivosti ljudi (prema engl. *human leucocyte antigen*)
IFNγ	interferon gama
IKDC	ubilačke DC koje stvaraju interferon (prema engl. *interferon-producing killer dendritic cells*)
IL	interleukin
KML	kronična mijeloična leukemija
LC	Langerhansove stanice (prema engl. *Langerhans cells*)
LCA	zajednički leukocitni antigen (prema engl. *leucocyte common antigen*)
LH-GVH	limfohematopoetska reakcija transplantata protiv primatelja (prema engl. *lymphohematopoetic graft-versus-host*)
LPS	lipopolisaharid
MFI	srednja vrijednost fluorescencije (prema engl. *mean fluorescence intensity*)
mHAg	sustav slabih antigena tkivne snošljivosti (minor H antigeni)
MHC	glavni sustav tkivne snošljivosti (prema engl. *major histocompatibility complex*)
NF-κB	jezgreni čimbenik κB (prema engl. *nuclear factor κB*)
ODN	oligodeoksinukleotid
PAMP	molekularni uzorci povezani s patogenom (prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*)
PRR	receptor za prepoznavanje uzoraka patogena (prema engl. *pattern-recognition receptors*)

TBI	zračenje cijelog tijela (prema engl. *total body irradiation*)
TCD	deplecija T limfocita (prema engl. *T-cell depletion*)
TLR	receptor nalik Toll-u (prema engl. *Toll-like receptors*)
TRITC	tetrametilrodamin-isotiocijanat (prema engl. *tetramethylrhodamine isothiocyanate*)
TKS	transplantacija koštane srži
TNF	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. *tumor necrosis factor*)
TNF-R	obitelj molekula receptora čimbenika tumorske nekroze (prema engl. *tumor-necrosis factor-receptor family molecules*)
UV	ultraljubičasto

1. Uvod

1.1. Alogenična transplantacija matičnih stanica koštane srži

Pluripotentne hematopoetske matične stanice imaju sposobnost ponovne uspostave funkcije hematopoetskog sustava ukoliko se transfundiraju nakon mijeloablativne terapije.[1] Iako su početkom 50-tih objavljene prve pretkliničke studije koje su pokazale da je eksperimentalne životinje moguće zaštititi od letalnog oštećenja koštane srži izazvanog zračenjem ukoliko im se transfundiraju stanice koštane srži zdrave životinje[2,3], tek je 1968. godine transplantacija alogeničnih hematopoetskih stanica koštane srži bila prvi put uspješno korištena u liječenju bolesnika s imunodeficijencijom.[4,5] Ubrzo potom je učinjena i prva uspješna transplantacija u bolesnika s aplastičnom anemijom.[6] Već 1956. godine eksperimentalni radovi jasno su ukazali da transplantirane hematopoetske matične stanice posjeduju terapijski potencijal; u životinja koje su imale leukemiju zabilježeno je bolje preživljenje nakon ozračenja i transplantacije alogenične koštane srži u usporedbi s transplantacijom singenične koštane srži.[7,8] Temeljem tih pokazatelja postavljena je hipoteza kako transplantat ima antileukemijski potencijal, što je pokrenulo eksperimentalnu transplantaciju matičnih stanica koštane srži u oboljelih od leukemije desetak godina kasnije.[9] Prva veća studija objavljena 1977. godine uključivala je rezultate 100 bolesnika transplantiranih u terminalnoj fazi leukemije i potvrdila antileukemijski učinak presađenih alogenih matičnih stanica.[10] Danas je transplantacija alogeničnih matičnih stanica uvriježena metoda liječenja mnogih malignih i nemalignih hematoloških oboljenja, a u posljednje vrijeme sve je šira upotreba transplantacije i u liječenju autoimunih bolesti, nasljednih metaboličkih deficijencija i drugih oboljenja. Cilj liječenja nasljednih metaboličkih bolesti i imunodeficijencija te aplazije koštane srži transplantacijom jest zamijeniti nedostatnu ili promijenjenu hematopoezu onom od zdravog davatelja. U liječenju zloćudnih oboljenja transfuzija matičnih stanica omogućuje primjenu visokih doza citotoksičnih lijekova i zračenja (odnosno mijeloablativnu terapiju). Tim se postupkom uništava maligna bolest, nakon čega infuzija davateljevih matičnih stanica omogućava ponovnu uspostavu funkcije krvotvornog sustava. Matične stanice ne posjeduju samo sposobnost uspostave funkcije krvotvornog

sustava, već imaju neposredni antileukemijski učinak koji se naziva učinkom transplantata protiv leukemije (GVL prema engl. *graft-versus-leukemia effect*).

1.1.1. Tkivna snošljivost

Geni koji kodiraju antigene glavnog sustava tkivne snošljivosti, MHC (prema engl. *major histocompatibility complex*), odnosno u ljudi HLA (prema engl. *human leucocyte antigen*) antigene nalaze se na kratkom kraku kromosoma 6 i sastoje od tri klase, od čega su za transplantacijsku imunologiju zanimljive razred I i razred II. Antigene razreda I, odnosno razreda Ia važnih u transplantacijskoj imunologiji kodiraju visoko polimorfni geni HLA-A, -B, i -C, dok razred II čine HLA-DP, -DQ, i -DR.[11] Molekule razreda Ia prisutne su na svim stanicama s jezgrom i trombocitima te predočuju peptide porijeklom iz citosola i jezgre $CD8^+$ T limfocitima, dok su molekule razreda II prisutne samo na B limfocitima, monocitima, endotelnim stanicama, aktiviranim T limfocitima, dendritičkim stanicama i makrofazima.[12] Molekule razreda II predočuju peptide $CD4^+$ T limfocitima. Osim jakih (major) antigena sustava tkivne snošljivosti, postoji i sustav slabih (minor H, mHAg) antigena; oni predstavljaju bjelančevine nastale izražajem polimorfnih gena koji se razlikuju i u pojedinaca koji su identični u MHC sustavu, i predstavljaju antigene koje T limfociti prisutni u transplantatu prepoznaju kao «strane» te započinju reakciju transplantata protiv primatelja (GVH prema engl. *graft-versus-host*), odnosno antigene koji započinju reakciju odbacivanja kod transplantacije solidnih organa.[13] Trenutno ne postoji metoda rutinskog tipiziranja minor antigena.

Transplantacija matičnih stanica može biti autologna (koja nije predmet ovog istraživanja), singenična i alogenična. U singeničnoj transplantaciji davatelj i primatelj su potpuno podudarni u svim antigenima tkivne snošljivosti, što zadovoljavaju samo jednojajčani blizanci. U alogeničnoj transplantaciji postoji podudarnost u jakim (major) ali ne i slabim (minor) antigenima tkivne snošljivosti. Srodni davatelji dijele neke antigene minor sustava, dok nesrodni davatelji ne dijele tkivne antigene u minor sustavu. Danas je, zahvaljujući sve većem broju dobrovoljnih davatelja u nacionalnim registrima, i sve šira upotreba nesrodnih davatelja; prema podacima Međunarodne organizacije za istraživanje transplantacije koštane srži (CIBMTR prema engl. *Center for International Bone Marrow Transplant Research*) gotovo polovica transplantacija prijavljenjih toj organizaciji u 2006. bila je od nesrodnih davatelja (podaci dostupni na www.cibmtr.org).

Kod tipizacije srodnika uobičajeno je tražiti davatelja koji je podudaran u 6/6 lokusa (odnosno HLA-A, -B i DR). Zahvaljujući činjenici da se HLA geni nasljeđuju u haplotipu i da je križna preuredba kromosoma u toj regiji rijetka, tipizacijom 6 lokusa moguće je ustvrdti da su dva srodnika potpuno podudarna. U slučaju nesrodnog davatelja potrebna je podudarnost u 10/10 lokusa (HLA-A, -B, -C, -DRB1, i -DQB1). Uz nove, sve djelotvornije imunosupresivne lijekove moguće je provesti liječenje transplantacijom i kada se transplantirane stanice davatelja razlikuju od primatelja u 1 do 2 lokusa, ili koristiti stanice haploidentičnog davatelja (najčešće majka, otac, brat ili sestra). Transplantacija od nepodudarnog davatelja nosi povećani rizik od odbacivanja i od povećane učestalosti i težine bolesti transplantata protiv primatelja (GVHD prema engl. *graft-versus-host disease*). U kliničkoj se praksi provodi liječenje transplantacijom od podudarnog srodnog ili nesrodnog davatelja, dok se one od nepodudarnog davatelja rade samo u visoko specijaliziranim centrima.

1.1.2. Bolest transplantata protiv primatelja (GVHD)

Razlog zbog čega je proteklo više od 15 godina od početka alogenične transplantacije na laboratorijskim miševima do uspješne transplantacije ljudi jest osnovna komplikacija metode a to je bolest transplantata protiv primatelja, GVHD. Već su rani pokusi na životinjama pokazali da transplantacije koštane srži od miševa drugog soja izaziva sindrom propadanja («runting syndrome»)[7,8], odnosno GVHD. Prepoznato je da se radi o imunološkoj reakciji u kojoj imunokompetentni T limfociti koji se nalaze u transplantatu prepoznaju antigene tkivne snošljivosti predočnih stanica kao tuđe i započinju imunološku reakciju. Ubrzo potom učinjeni su i prvi pokusi koji su pokazali povoljan učinak kombinacije ciklosporina i metotreksata u prevenciji razvoja GVHD[14-16], a ista kombinacija lijekova i danas je najšire primjenjivana profilaktička terapija. Usprkos tome GVHD ostaje najznačajnija komplikacija liječenja alogeničnom transplantacijom, i najčešći je uzrok smrtnosti nakon transplantacije.

Klinički se GVHD očituje kao akutni i kronični oblik. Akutni GVHD se razvija brzo nakon transplantacije, dok se kronični oblik javlja obično nakon 100. dana iza transplantacije (iako se u posljednje vrijeme sve više odustaje od kronološke razdiobe a sve se veća važnost pridaje kliničkoj slici). Akutni GVHD razvija se u oko 35-40%

alogenično transplantiranih osoba, od čega oko 15% razvije teški, smrtonosni oblik. Učestalost GVHD nakon nesrodne transplantacije je veća i iznosi 50-70%.[17,18]

1.1.3. Patofiziologija GVHD

Već je 1966. godine Billingham formulirao tri preduvjeta za razvoj GVHD: 1. transplantat mora sadržavati imunokompetentne stanice; 2. primatelj mora biti nesposoban za odbacivanje transplantata i 3. primatelj mora izražavati tkivne antigene koji nisu prisutni u davatelja a koji će tako biti prepoznati kao «strani».[19] Danas se zna da su zreli T limfociti te imunokompetentne stanice koje ispunjavaju prvi preduvjet[20], i da postoji korelacija između težine GVHD i broja T limfocita prisutnim u transplantatu.[21] Drugi uvjet za razvoj GVHD je nesposobnost primatelja da odbaci transplantat, odnosno imunokompromitirano stanje primatelja. Taj je uvjet zadovoljen kod svih koji primaju transplantat nakon mijeloablativne terapije radi zloćudne bolesti, te u bolesnika koji u pripremi za liječenje transplantacijom primaju anti-timocitni globulin. Treći preduvjet je zadovoljen uvijek, osim kod singenične transplantacije. Iako u alogenične transplantacije postoji potpuna podudarnost u HLA sustavu, razlike u minor (mHAg) sustavu su dovoljne za početak reakcije. One su izraženije kod nesrodnih transplantacija, što objašnjava i veću učestalost GVHD u tako liječenih bolesnika.

Suvremeni pristup razmatranju patofiziologije nastanka GVHD polazi od modela koji navodi tri potrebna koraka («three step model»)[22]: 1) oštećenje tkiva primatelja zračenjem i/ili kemoterapijom tijekom kondicioniranja prije transplantacije; 2) aktivacija davateljevih T limfocita i klonalna ekspanzija i 3) stanični i upalni čimbenici. Tijekom pripreme za transplantaciju dolazi do oštećenja tkiva primatelja te pojačanog lučenja upalnih citokina kao što su čimbenik tumorske nekroze alfa (TNFα prema engl. *tumor necrosis factor alpha*) i interleukin 1 (IL-1). Ovi citokini imaju sposobnost povećanja izražaja MHC antigena i kostimulirajućih molekula na antigen predočnim stanicama (APC prema engl. *antigen presenting cells*) te tako potiču prepoznavanje primateljevih aloantigena od strane davateljevih T limfocita. Upalni citokini također stimuliraju otpuštanje kemokina koje privlače davateljeve T limfocite u ciljne organe. Tijekom drugog koraka primateljeve APC predočuju aloantigen (unutar HLA molekule) davateljevim T limfocitima. Kostimulatorne molekule koje izražavaju nužne su za

aktivaciju T limfocita, a ti signali dalje aktiviraju APC, koje opet aktiviraju daljnje T limfocite te dolazi do stanične proliferacije i otpuštanja citokina. Najvažniji su interleukin 2 (IL-2) koji potiče ekspanziju T staničnog klona i potiče stvaranje citotoksičnih T limfocita, te interferon gama (IFNγ) koji ima mnogo učinaka, uključujući poticanje stvaranja TNFα i IL-1 od strane mononuklearnih fagocita. Tijekom trećeg koraka mononuklearne fagocite i neutrofile potiču medijatori kao što su lipopolisaharidi (LPS). Oni u krvotok ulaze kroz oštećenja crijevne mukoze nastala zračenjem (korak 1), nakupljaju se u ciljnim organima te uz citotoksične T limfocite uzrokuju oštećenja ciljnih organa. Iako su sva tri koraka bitna, naglašava se upravo važnost drugog koraka odnosno aktivacije T limfocita od strane APC u nastanku GVHD. Naime, iako citokini pružaju dodatan stimulus i potiču upalna događanja te su važni u konačnom oštećenju organa, pojedinačno blokiranje djelovanja pojedinih citokina nije dovelo kontrole odnosno prestanka GVHD kao niti do smanjenja oštećenja, ukoliko su prisutni stanični elementi kao što su citotoksični T limfociti. Kondicioniranje također nije nužno, dokaz za to je posttransfuzijski GVHD za razvoj kojega nije potrebno oštećenje tkiva primatelja. Iako nije bez zamjerki, ovaj model svakako nudi bolji uvid u komplicirani slijed događaja tijekom razvoja GVHD.

1.1.4. Ciljni organi

Najčešće zahvaćeni ciljni organi su koža, jetra i crijeva, a sve je više naznaka o promjenama koje zahvaćaju i dišni sustav.[23] Bolest kože se obično očituje makulopapuloznim osipom koji tipično isprva zahvaća kožu dlanova i tabana, a može progredirati do deskvamacije velikih površina kože. Za postavljanje dijagnoze GVHD kože neophodno je učiniti histopatološku evaluaciju promjena. Histopatološke karakteristike GVHD kože su egzocitoza limfocita i njihovo nakupljanje uzduž epidermalno dermalne granice, deplecija Langerhansovih stanica, satelitsko nakupljanje limfocita oko diskeratotičnih epidermalnih keratinocita, vakuolarna degeneracija uzduž bazalnog sloja, intracelularni edem, nekroza bazalnog sloja, akantoliza i epidemoliza. Ove promjene nisu uvijek patognomonične za GVHD.

U jetri su nekrotičkim promjenama zahvaćeni mali žučni vodovi a bolest se u prvom redu očituje povećanjem serumske razine bilirubina i alkalne fosfataze, a zatim i povećanjem serumske razine alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze te

gama-glutamil transferaze. Histopatološke promjene uključuju limfocitnu infiltraciju i oštećenje malih žučnih vodova sa nuklearnim polimorfizmom i odumiranjem pojedinih stanice epitelnog sloja.

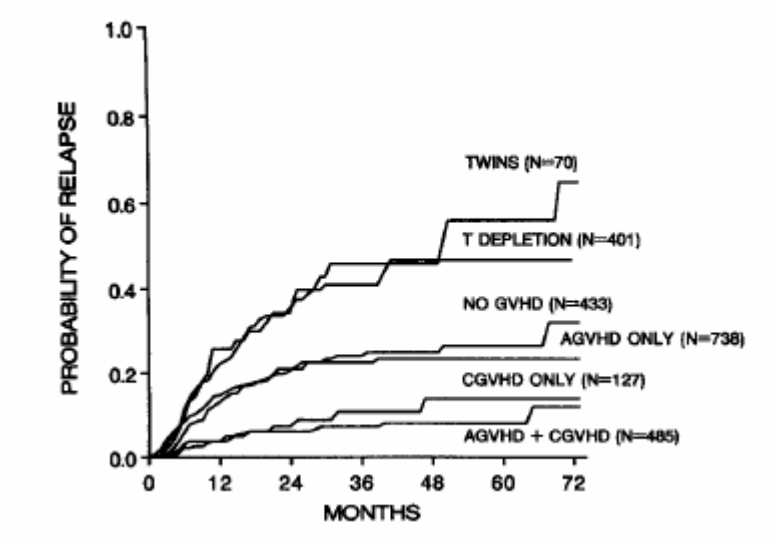
Bolest crijeva očituje se pojavom proljevastih stolica i grčevima, a progresijom bolesti može se razviti ileus i toksični megakolon. Volumen stolica može dostići i do 10 litara dnevno i u takvoj je situaciji teško održavati adekvatnu ravnotežu tekućina i elektrolita u tijelu. Bolest crijeva je vjerojatno najozbiljnija i često ne odgovara dobro na terapiju. Može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi. Endoskopski pregled otkriva cijelu lepezu mogućih nalaza, od normalnog nalaza do opsežnog edema, defekata mukoze i difuznog krvarenja uzduž gastrointestinalnog sustava. Histološki pregled otkriva staničnu nekrozu unutar kripti i odumiranje pojednih epitelnih stanica.

GVHD je najvažnija komplikacija transplantacije i uz infekcije najčešći uzrok smrtnosti nakon transplantacije. Stoga je kod bolesnika koje liječimo alogeničnom transplantacijom standardni pristup prevencija pojave GVHD primjenom imunosupresivnih lijekova, najčešće kombinacijom metotreksata i ciklosporina. U bolesnika s kliničnom slikom GVHD u prvoj liniji terapije koriste se kortikosteroidi, dok se u drugoj liniji primjenjuju anti-timocitni globulini, ciklosporin te drugi imunosupresivni lijekovi.

1.1.5. Učinak transplantata protiv leukemije (GVL) i davateljeve limfocitne infuzije (DLI, prema engl. *donor lymphocyte infusion*)

Relativno rano je uočen antileukemijski potencijal[7] transplantiranih hematopoetskih stanica, no važnost tog učinka u samim počecima nije bila dovoljno prepoznata. Dugo vremena se veće značenje pridavalo pripremi za transplantaciju tj. intenzitetu pripreme ozračenjem i kemoterapijom, dok je alogenični transplantat predstavljao izvor hematopoetskih stanica iz kojih će nastati nova hematopoeza. Početkom 1980-tih sukpina iz Seattlea objavila je dva rada, rezultat sistematske analize dosadašnjih transplantacija, te pokazali kako transplantirani bolesnici u kojih je zabilježen GVHD imaju manju incidenciju povrata bolesti nego oni bez GVHD.[24,25] Konačna potvrda tih rezultata došla je 1990. godine kada je učinjena retrospektivna analiza svih transplantacija prijavljenih u Međunarodni registar za transplantaciju koštane srži (IBMTR prema engl. *International Bone Marrow Transplantat Registry*) koja je pokazala kako alogenični T limfociti imaju

antitumorski učinak, odnosno da se deplecijom T limfocita iz transplantata povećava rizik ponovne pojave leukemije dok se pojavom GVHD taj rizik smanjuje (slika 1).[26]



Slika 1. Vjerojatnost povrata osnovne bolesti nakon transplantacije koštene srži zbog leukemije u ranoj fazi bolesti ovisno o transplantatu i razvoju GVHD (iz reference 26).

Konačnu potvrdu i najopipljiviji dokaz postojanja GVL učinka posredovanog T limfocitima pružio je Hans-Jochem Kolb koji je 1990. godine objavio uspješne rezultate u liječenju hematološkog povrata bolesti nakon transplantacije u tri oboljela od kronične mijeloične leukemije (KML) terapijom interferonom alfa i infuzijom izdvojenih stanica periferne krvi davatelja (sloj izdvojenih stanica koji sadrži leukocite i trombocite, «buffy coat»).[27]

Rezultati retrospektivne Europske grupe za liječenje transplantacijom (EBMTG prema engl. *European Blood and Marrow Transplant Group*) potvrdili su učinkovitost DLI u terapiji ponovne pojave KML.[28,29] Djelotvornost DLI nije se pokazala toliko velika u terapiji drugih vrsta hematoloških malignih oboljenja. Tako se u bolesnika s KML remisija bolesti nakon DLI postiže u 70.5% slučajeva, dok se u bolesnika s akutnom limfoblastičnom leukemijom (ALL) isto postiže u tek 15% slučajeva. Učinkovitost ovisi ne samo o vrsti zloćudne bolesti već i o veličini tumorske mase: bolesnici u kojih je zabilježen citogenetski povrat bolesti najbolje su odgovorili na terapiju, u čak 80% slučajeva postignuta je kompletna remisija. Postotak postignutih kompletnih remisija u bolesnika s hematološkim relapsom je nešto manji, ali sasvim prihvatiljiv (77%). Od bolesnika koji su imali blastičnu transformaciju tek je 36% zabilježilo kompletnu

remisiju kao odgovor na primjenu DLI.[29] Ipak, vrijedi spomenuti kako je jedna od prvih DLI infuzija primjenjena u terapiji relapsa ALL kod djeteta i da je postignuta dugotrajna remisija bolesti.[30,31] Jedan od predmnijevanih razloga zašto je DLI toliko uspješan u oboljelih od KML a manje uspješan u drugih zloćudnih tumora jest činjenica da se iz malignog klona KML-e mogu razviti dendritičke stanice[32] sposobne za predočenje antigena, koje tako pojačavaju aktivaciju adoptivno prenesenih T limfocita.

Svakako je pokazani antileukemijski potencijal davateljevih limfocita pomogao pomicanju paradigme transplantacije matičnih hematopoetskih stanica. Danas se postiže jednak antileukemijski učinak korištenjem manje intenzivnih protokola kondicioniranja, tzv. nemijeloablativnim protokolima. Cilj ovakve pripreme je postići dostatnu imunosupresiju primatelja kako be se prihvatile transplantirane alogenične hematopoetske stanice. Transplantacijom se uz matične stanice presađuju i T limfociti koji posreduju i potiču GVL učinak. Takvom se transplantacijom u većine bolesnika postiže miješani kimerizam, odnosno stanje u kojem su prisutne i davateljeve i primateljeve stanice u koštanoj srži. Nakon postizanja međusobne tolerancije naknadno se dodaju davateljevi limfociti s ciljem da se postigne potpuni davateljev kimerizam (potreban za eradikaciju maligne bolesti). Ovakim pristupom se smanjuje toksičnost liječenja, te se on osobito primjenjuje u oboljelih starije životne dobi, kao u bolesnika koji, zbog postojanja određenih komorbiditeta, ne bi mogli podnijeti mijeloablativnu pripremu.

Ovakvo razmišljanje otvorilo je vrata i potencijalnoj široj upotrebi metode u liječenju oboljelih od solidnih tumora, genetskih ili autoimunih oboljenja koji bi mogli imati koristi od transplantacije matičnih stanica i alogenične adoptivne terapije. Svakako je cilj kojem svi težimo razdvojiti GVL odnosno šire učinak transplantata protiv tumora (GVT prema engl. *graft-versus-tumor effect*) od GVHD kako bi metoda postala sigurnija, i nosila što manje komplikacija.

1.2. Antigen predočne stanice (APC)

Antigen predočne stanice su visoko specijalizirane stanice koje mogu procesuirati antigene i iskazati njihove peptidne fragmente na površini stanice zajedno s molekulama

koje su potrebe za aktivaciju T limfocita. Najvažnije APC su dendritičke stanice, makrofazi i B stanice.[12]

Iako su dendritičke stanice prvi puta morfološki opisane od strane Paula Langerhansa, termin «dendritičke stanice» iskovan je tek 1973. od strane Ralpha Steinmana koji ih je prvi opisao[33] i započeo eru njihove karakterizacije. Dendritičke stanice (DC prema engl. *dendritic cells*) su najučinkovitije APC, jedine imaju sposobnost učinkovite aktivacije naivnih T limfocita, posjeduju visoku sposobnost endocitoze, učinkovit sustav procesuiranja i predočavanja antigena, a pokazuju i visok izražaj T staničnih kostimulatornih molekula.[34] Neophodne su u aktivaciji imunih odgovora, kao i induciranju periferne tolerancije; u odsustvu upalnih podražaja one kontinuirano procesuiraju antigene prisutne u periferiji te ih predstavljaju T limfocitima bez prisutnih kostimulatornih molekula, čime se inducira anergija odnosno delecija T staničnih klonova koje imaju sposobnost reakcije na antigene prisutne u organizmu.[35] DC, kojih ima relativno malo u perifernim tkivima, izrazito su osjetljive na «signal opasnosti» koji se javlja nakon ozljede tkiva. U odgovoru na upalne citokine koji se stvaraju u takvoj situaciji DC prolaze proces sazrijevanja koji uključuje smanjenje sposobnosti prihvaćanja novih antigena, povećan izražaj MHC i kostimulatornih molekula, te promijenjen izražaj adhezijskih molekula ili receptora za kemokine, čime se omogućava njihova migracija prema limfoidnim organima gdje predočuju antigene. Kao izrazito bitna molekula za migraciju DC prema limfnim čvorovima, kako u normalnim uvjetima tako i tijekom upale, pokazala se molekula kemokinskog receptora 7 (CCR7 prema engl. *chemokine receptor 7*).[36-38] Relativno maleni broj ovih stanica u cirkulaciji ne umanjuje njihovu važnost: jedna DC može dnevno aktivirati odnosno doći u kontakt sa do 10 000 T limfocita.[39] Osim toga, u posljednje vrijeme postoje dokazi koji govore u prilog tvrdnji da put DC iz perifernih tkiva ne završava u regionalnim limfnim čvorovima, kao što se nekad mislilo. Barem su dvije studije pokazale kako se periferno primjenjene označene DC mogu naći u tkivu slezene i koštanoj srži, što govori u prilog njihove diseminacije krvlju nakon što prođu kroz limfni čvor.[40,41]

Već je naglašeno kako DC igraju ključnu ulogu u prepoznavanju infekcije (signala opasnosti) i započinjanju adoptivnog imunog odgovora.[42] DC odgovaraju na dva tipa signala: neposrednim prepoznavanjem patogena preko receptora za prepoznavanje

uzoraka patogena (PRR prema engl. *pattern-recognition receptors*) odnosno posredno prepoznavajući znakove infekcije (preko upalnih citokina, unutarnjih staničnih sastojaka i već započetih imunosnih reakcija,[43] pri čemu započinju proces sazrijevanja. Postoji ukupno pet vrsta površinskih receptora koji mogu pokrenuti proces sazrijevanja: receptori nalik Toll-u (nazvani tako zbog sličnosti s Toll genom identificiranim kod Drozofile; TLR, prema engl. *Toll-like receptors*), receptori za citokine, obitelj molekula receptora čimbenika nekroze tumora (TNF-R prema engl. *tumor-necrosis factor-receptor family molecule*), receptor za Fc fragment i receptori stanične smrti. U ovom su istraživanju od najveće važnosti upravo Tollu slični receptori koji predstavljaju vrstu receptora za prepoznavanje uzoraka patogena, prepoznaju molekule koje dijele patogeni a koje su različite od molekula domaćina, poznatije pod imenom molekularni uzorci povezani s patogenom (PAMPs, prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*). Dendritičke stanice sazrijevaju u odgovoru na različite sastavne dijelove patogena, uključivo nekoliko sastavnih dijelova bakterijskog staničnog zida (npr lipopolisaharide), ne-metilirane CpG motive, dvostruku RNA uzvojnicu, koji se vežu na različite TLR. Tako na primjer TLR4 prepoznaje lipopolisaharide, TLR2 prepoznaje bakterijske peptidoglikane koji čine sastavni dio bakterijskog zida gram pozitivnih bakterija, TLR5 prepoznaje flagelin bakterija, za TLR9 se vežu ne-metilirani CpG motivi a TLR7 prepoznaje imidazokvinoline.[44] Većina TLR receptora započinju sintezu potrebnih staničnih čimbenika tako da nizvodno aktiviraju NF-κB preko molekule MyD88, no postoje i putevi koji taj put zaobilaze.[45]

U limfnom čvoru miša izdvaja se pet različitih populacija DC. Uz $CD4^+CD8\alpha^-$ $DEC205^-$, $CD4^-CD8\alpha^-DEC205^-$ i $CD4^-CD8\alpha^+DEC205^-$ populacije koje se nalaze i u slezeni izdvajaju se dvije dodatne populacije koje se nalaze isključivo u limfnom čvoru a koje ne izražavaju CD4 biljeg, tek male količine CD8α biljega, ali jasno izražavaju DEC205 biljeg i visoke razine MHC razreda II.[46] Jedna populacija zajednička svim limfnim čvorovima iskazuje umjerenu razinu DEC205 i vjerojatno predstavlja dermalnu DC koja je emigrirala u limfni čvor, dok druga populacija koju se nalazi uglavnom samo u limfnim čvorovim koji derniraju kožu izražava visoke razine DEC205 i čini se da predstavlja Langerhansove stanice koje su emigrirale u limfne čvorove.

Točna uloga pojedinih podvrsta dendritičkih stanica još uvijek nije razjašnjena. Iako su postojale sugestije da neke od njih imaju prvenstveno u tolerogenu odnosno aktivacijsku ulogu (temeljeno prije svega predominantnoj prisutnosti $CD8^+$ stanica u timusu, ključnom organu u indukciji centralne tolerancije[47], percepciji da su jedino $CD8^-$ «mijeloidne» DC stanice migratorne, te prema lokaciji stanica unutar T stanične zone limfoidnih tkiva tijekom normalne homeostaze[48]), trenutno nema jasnih dokaza koje bi poduprle takvu tezu. Pokazano je da pojedine vrste dendritičkih stanica pokazuju drukčiji izražaj TLR[49], te se čini da uloga različitih podvrsta dendritičkih stanica nije odrediti hoće li doći do imune reakcije ili tolerancije, već da u susretu sa stranim antigenom proizvodeći različite citokine mogu utjecati na kvalitetu imunog odgovora odnosno utjecati na selekciju između Th1 ili Th2 odgovora.

1.2.1. Langerhansove stanice (LC prema engl. *Langerhans cell*) su tipično lokalizirane u bazalnom i suprabazalnom sloju epidermisa i predstavljaju prvu i glavnu imunološku barijeru našeg tijela prema okolini. Učinkovito prihvaćaju strane antigene i nose ih prema T staničnim područjima regionalnih limfnih čvorova, gdje ih predstavljaju u okviru MHC molekule T limfocitima, iskazujući i kostimulatorne molekule (osiguravajući tako i drugi signal) te započinju imunu reakciju.[50,51] U miševa se LC mogu razlikovati od ostalih DC prema njihovom visokom izražaju lektina DEC205, niskim razinama $CD8\alpha$ i visokom intracelularnom izražaju langerina.[52] Postoji i drugi tip DC stanica kože, sličan LC stanicama, no ipak se razlikuje nižim izražajem DEC205 a gotovo da ne sadrži intracelularnog langerina. Te stanice se nazivaju «dermalne» odnosno «intersticijske» DC.[53] Njima slične stanice mogu se naći u svim limfnim čvorovima, ne samo potkožnim, već i u medijastinalnim ili mezenterijalnim limfnim čvorovima. Pretpostavlja se da su emigrirale iz epitelnog tkiva (plućni epitel, crijevni epitel), te ih se ponekad u literaturi združeno promatra zajedno s LC i tada naziva epDC (prema engl. e*pithelium derived dendritic cells*)[54], iako ne potječu isključivo iz epitelnog tkiva.

LC su nađene u potkožnom limfnom čvoru tijekom normalnih uvjeta (engl. «steady state» uvjeta), dakle izvan upalne reakcije[50], što govori u prilog tvrdnji da one i u odsutnosti upalnog podražaja cirkuliraju prema limfnom čvoru. Nedavno je pokazano da su LC radio-rezistentne i da zaostaju i nakon primjenjenih smrtonosnih doza ozračenja.[55] U novije vrijeme pokazano je da i u ostalim limfatičkim tkivima kao što su slezena,

limfni čvorovi i koža postoji podvrsta DC populacije koja se obnavlja iz lokalno prisutnih prekursora, a ne kako se prije smatralo iz cirkulirajućih prekursora porijekom iz koštane srži. [56 57] Tek upalna reakcija izaziva njihovu obnovu prekursorima iz cirkulirajuće krvi, i to ovisno o izražaju molekule receptora kemokina 2 (CCR2 prema engl. *chemokine receptor 2*) od strane prekursora i CCR2 vezajućih molekula od strane upaljene kože.[55] Pokazano je također da su ti cirkulirajući prekursori ustvari cirkulirajući monociti.[58]

1.2.2. Uloga dendritičkih stanica u transplantaciji

Alogenična T stanična reakcija, kao i svi drugi stečeni imuni odgovori, započinje u sekundarnim limfnim organima susretom limfocita i antigen predočne stanice. U pokušaju da se postigne bolji GVL učinak a istovremeno umanji opasnost GVHD, prva su istraživanja na ovom polju bila usmjerena na otkrivanje staničnih i molekularnih mehanizama presudnih u započinjanju GVH reakcije, određivanje koji je tip T limfocita ($CD4^+$ ili $CD8^+$) ključan u reakciji GVHD[59-61], kao i na identifikaciju citotoksične efektorske molekule koja je odgovorna za uništenje tkiva u GVHD.[62-65] U posljednje vrijeme objavljeno je dosta važnih radova koji se bave identifikacijom porijekla dendritičke stanice odgovorne za pokretanje i/ili održavanje GVH reakcije, odnosno određivanjem jesu li dendritičke stanice porijekla davatelja ili primatelja te koje su presudne u navedenoj reakciji.[66-71] Za sada objavljeni radovi su dijelom prijeporni. Shlomchik i sur. su koristeći prijenos $CD8^+$ C3H.SW stanica u ponovno ozračene C3H.SW→C57BL/6 kimere (MHC podudarne, mHAg nepodudarne) pokazali da razvoj letalnog GVHD u tom modelu ovisi o prepoznavanju antigena predočenih od strane primateljevih APC[71], što je u direktnoj suportnosti s ranijim studijama Korngolda i Sprenta. Oni su infuzijom $CD8^+$ stanica od CBA miša u ponovno ozračene CBA→B10.BR kimere, kao i infuzijom $CD8^+$ stanica od B10.BR miša u ponovno ozračene B10.BR → CBA kimere, izazvali pojavu akutnog GVHD, što ih je navelo na zaključak da su za razvoj akutnog GVHD dovoljne davateljeve DC ili da primateljeve DC perzistiraju i nakon transplantacije.[59] Obzirom da su i Shlomchik i sur. zamijetili da ipak neke životinje razvijaju smrtonosni GVHD i u njihovim modelu transplantacije, analizirali su ostatnu populaciju primateljevih DC stanica nakon transplantacije. Zamijetili su da postoji različita ostatna količina primateljevih DC (od 0.2 do 17.8%), te zaključili da je u oba modela pojavnost GVHD ovisna upravo o rezidualnoj količini

primateljevih DC.[71] Matte i sur. s druge strane identificiraju davateljeve DC kao važne u održavanju GVHD započetog od strane primateljevih DC, no ne i presudne za GVL učinak[67], dok su Reddy i sur. pokazali da davateljeve DC učinkovite ukoliko je tumorska masa mala, no ukoliko je tumorska masa velika, primateljeve su DC nužne za uspješnu eliminaciju tumora.[66]

Nedavno objavljen rad pokazuje da Langerhansove stanice kože perzistiraju u MHC-nepodudarnom modelu nakon smrtonosnog ozračenja i transplantacije koštane srži iz koje su izdvojeni T limfociti, ali ne i nakon dodavanja T limfocita davatelja transplantatu, te da je za potpunu eliminaciju primateljevih Langerhansovih stanica potrebna ili prisutnost primateljevih T limfocita u transplantatu ili dodatak DLI uz prethodno dodatno zračenje primatelja.[68] Do sada nije razjašnjeno što se događa u klinički važnijem modelu MHC-podudarne, mHAg nepodudarne transplantacije (u daljnjem tekstu označena samo kao MHC-podudarna), te koja je uloga primateljevih Langerhansovih stanica u tom modelu. Odgovor na ta pitanja bliži nas odgovoru na možda najvažnije pitanje, a to je kako to da je kod ljudi koji su liječeni transplantacijom matičnih stanica koštane srži moguće da, i nakon što je uspostavljen potpuni donorski kimerizam, vidljivo prema analizi periferne krvi i koštane srži, DLI i dalje može izazvati smrtonosan GVHD?

2. Cilj rada

Svrha rada bila je iznaći način bolje aktivacije i jače efektorske funkcije T limfocita koji se primjenjuju u adoptivnoj imunoterapiji nakon nemijeloablativne transplantacije koštane srži, te istražiti ulogu dendritičkih stanica primatelja, posebice Langerhansovih stanica kože u njihovoj aktivaciji. Naime, iako je adoptivna terapija ponovne pojave zloćudnog tumora nakon alogenične transplantacije uvriježena metoda liječenja, njena učinkovitost ovisi o vrsti bolesti, tumorskoj masi i drugim čimbenicima.

Specifični ciljevi rada bili su:

1. Odrediti kimerizam dendritičnih stanica slezene, kože, potkožnih limfnih čvorova, mezenterijalnih limfnih čvorova i T limfocita u MHC-podudarnom i nepodudarnom sustavu
2. Ispitati način rekonstitucije dendritičnih stanica i T limfocita nakon MHC-podudarne transplantacije;
3. Utvrditi porijeklo dendritičnih stanica potkožnih limfnih čvorova nakon MHC-podudarne transplantacije;
4. Procijeniti učinak ukupne doze zračenja i zrelih davateljevih T limfocita na kimerizam dendritičnih stanica nakon transplantacije;
5. Ispitati djelotvornost adoptivno prenesenih T limfocita na populaciju primateljevih epidermalnih dendritičnih stanica;
6. Utvrditi u kojoj mjeri davateljev kimerizam potiče DLI-posredovanu GVH reaktivnost adoptivno prenesenih T limfocita u MHC-nepodudarnom i MHC-podudarnom modelu;
7. Ispitati djelotvornost aktivacije antigen predočnih stanica na GVH reaktivnost adoptivno prenesenih T limfocita;
8. Odrediti djelotvornost aktivacije antigen predočnih stanica *in vivo* i adoptivno prenesenih davateljevih T limfocita na GVL reaktivnost i pojavu GVHD u MHC-podudarnom modelu.

3. Hipoteze

1. dendritičke stanice primatelja perzistiraju u koži i potkožnim limfnim čvorovima nakon MHC-podudarne transplantacije kože neovisno o količini T-stanica u transplantatu

2. za postizanje optimalne aloreaktivnosti potrebno je aktivirati donorske T-stanice kao i/ili primateljeve antigen predočne stanice (uz pomoć TLR liganda ili koristeći neki drugi štetan utjecaj kao što je iradijacija)

3. aktivacija perzistirajućih dendritičkih stanica primatelja pospješuje alogeničnu reakciju izazvanu adoptivno prenesenim T-stanicama, bez uzrokovanja GVHD

4. Materijali i metode

4.1. Životinje

Ispitivanja su provedena na sojevima C57BL/6 (B6; H-2^b, CD45.2^+), BALB/c (H-2^d; CD45.2^+) i B6.SJL (H-2^b; CD45.1^+) od dobavljača National Cancer Institute (Frederick, MD, USA), te sojevima C3H.SW (H-2^b; CD45.2^+), B10.D2 (H-2^d) i B6.PL (H-2^b; Thy1.1^+) od dobavljača Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA).

B10.D2-Thy1.1 (H-2^d; Thy1.1^+), BALB/c-Thy1.1 (H-2^d; Thy1.1^+) i BALB/c-CD45.1 (CD45.1^+; F12 generacija) uzgojeni su u prostorijama Jedinice za skrb o laboratorijskim životinjama Sveučilišta Johns Hopkins. Miševi su u mikroizolacijskim kavezima imali neograničen pristup steriliziranoj hrani i acidifiranoj vodi. Svi miševi korišteni su u starosti od 8 do 12 tjedana, a svi eksperimenti koji uključuju miševe provedeni su u skladu s programima odobrenim od strane Odbora za upotrebu i brigu o životinjama (Animal Care and Use Committee) Sveučilišta Johns Hopkins.

4.2. Transplantacija koštane srži, UV zračenje, davateljeve limfocitne infuzije i primjena imikvimoda

Životinje su bile izložene zračenju od dvojnog izvora ^{137}Cs iradijatora (Gammacell 40; Atomic Energy of Canada, Ottawa, ON) pri ekspoziciji od 73 cGy/minuti. Kondicioniranje se sastojalo od 900 cGy zračenja cijelog tijela (TBI prema engl. *total body irradiation*) dan prije transplantacije koštane srži, osim ako nije drukčije naznačeno. «Miješane» kimere konstruirane su rekonstitucijom letalno ozračenih primatelja mješavinom transplantata iz kojih su odstranjeni T limfociti (TCD prema engl. *T-cell depleted*), i to 10^7 stanica porijekla davatelja i 5 x 10^6 porijekla primatelja, dok su «potpune» kimere konstruirane rekonstitucijom letalno ozračenih primatelja stanicama porijekla samo davatelja (10^7 – 1.5 x 10^7). Stanice koštane srži injicirane su u repnu venu u finalnom volumenu od 0.5 mL u Eagle Hanks Amino Acid (EHAA) mediju (Biofluids, Rockville, MD). Deplecija T limfocita (TCD) koštane srži provedena je temeljem već prethodno opisanog programa.[72] Životinje su izlagane ultraljubičastom (UV) zračenju 13 i 15 dana nakon transplantacije u dozi od 100mJ/cm^2 dnevno. DLI predstavlja iv. infuzija 12 x 10^6 davateljevih T-limfocita sakupljenih iz limfnih čvorova. U pojedinim

eksperimentima pročišćavanje populacija davateljevih T-limfocita provedeno je propuštanjem stanica kroz najlonsku vunu ili koristeći komercijalno dostupne izolacijske setove (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), prema uputama proizvođača. Stanice su bile resuspendirane i injicirane u finalnom volumenu 0.5 mL u EHAA mediju. Prema uputama proizvođača (Molecular Probes, Eugene, OR provedeno je označavanje limfocita uz pomoć CFSE (karboksi-fluorescein diacetat sukcinimidil ester boje). CFSE se može doklazati protočnom citometrijom u FL1 kanalu, ugrađuje se u membranu stanice i svakom diobom stanice njen intenzitet se smanjuje za ½ što se može pratiti protočnim citometrom. Za prethodnu senzibilizaciju davatelja na primateljeve antigene u dva navrata u razmaku od tjedan dana miševima je injicirano 10^7 splenocita primatelja intraperitonealno. Korišteni su slijedeći stimulatorni i kontrolni CPG oligonukleotidi: stimulatorni CpG1826 (5'-TCCATGACGTTCCTGACGTT3'), te kontrolni CpG1982 (5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT3').[73] CpG oligonukleotidi (Oligos Etc., Wilsonville, OR, USA) primjenjeni su intraperitonealno u dozi od 150 μg/mišu na dan 0, +3 i +7 nakon DLI. Imikvimod se koristio u komercijalno dostupnom obliku 5% kreme (Aldara® 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN), u kontrolnoj skupini primjenjena je krema u istoj formulaciji ali bez aktivnog sastojka; krema je bila nanošena jednom dnevno na obrijanu kožu miša pod općom anestezijom, na dane -3, -2 i -1 prije transplantacije na kožu prsišta ili abdomena, a na dan transplantacije na kožu leđa. Anti-CD25 protutijelo (PC61; 0.5 mg/dozi) i anti-Thy1.2 protutijelo (30H12; 1 mg/dozi) primjenjeni su na dan -7 i -4 prije DLI.

4.3. Izolacija DC stanica iz slezene, limfnih čvorova i epidermalnih slojeva kože

Dendritičke stanica iz slezene i limfnih čvorova izolirane su na način kako je prethodno opisano[46,74,75]; ukratko jednostanične suspenzije slezena i potkožnih limfnih čvorova (združenih submandibularnih, cervikalnih, brahijalnih i aksilarnih čvorova) pripremljene su protiskivanjem organa kroz 100μm-sku najlonsku mrežicu. Jednostanične suspenzije splenocita odnosno limnih čvorova inkubirane su u prisustvu kolagenaze D (400 U/mL; Roche, Indianapolis, IN, USA) kroz 60 odnosno 30 minuta. Koristeći kravlji serumski albumin (bovine serum albumine, BSA) izdvojio se udio splenocita niske gustoće, koji se potom inkubirao s MACS CD11c mikromagnetskim česticama (Miltenyi Biotec), dok se

suspenzija stanica limfnih čvorova inkubirala odmah s MACS CD11c mikro magnetskim česticama, bez prethodnog izdvajanja uz pomoć BSA. Nakon 30-minutne inkubacije na 4℃, stanična suspenzija je isprana, a $CD11c^+$ frakcija izolirana koristeći LS separacijske kolumne i MidiMACS sustav magneta (Miltenyi Biotec). Epidermalni slojevi odvojeni su s uški miševa prvo mehanički a potom inkubirani u fiziološkoj otopini koja je sadržala 0.25% tripsin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) i EDTA (5 mM) kroz 60 minuta na 37℃.[46,55,76] Odvojeni epidermalni slojevi kultivirani su u prisustvu 10 ng/ml GM-CSF i 10 ng/ml TNF-α (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA).[55,77] Nakon inkubacije u trajanju od 48 sati na 37℃, stanice koje su emigrirale bile su sakupljene i obojene za analizu protočnom citometrijom.

4.4. Priprava i sazrijevanje dendritičkih stanica *ex vivo*

Dendritičke stanice porijeklom iz koštane srži pripremljene su *ex vivo* na slijedeći način: propiranjem natkoljeničnih i potkoljeničnih kosti miševa te filtriranjem kroz 100μm-sku najlonsku mrežicu dobivena je jednostanična suspenzija stanica koštane srži. Stanice su nasađene u koncentraciji od 1 x 10^6 stanica/ml u mediju u prisutnosti GM-CSF i IL-4 te inkubirane. Medij je mijenjan svaka 2 dana, a šestoga dana je u medij kroz 24 sata dodan lipopolisaharid (LPS) porijeklom iz Escherichiae coli (serotip 055:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u svrhu sazrijevanja stanica. Razina zrelosti provjerena je analizom protočnim citometrom.

4.5. Analiza protočnim citometrom

U prethodno određenim vremenskim točkama životinje su bile žrtvovane, te sakupljene slezene, potkožni limfni čvorovi (aksilarni, brahijalni, cervikalni i submandibularni čvorovi) kao i mezenterijalni limfni čvorovi. Pripremljena je jednostanična suspenzija kako je već opisano, u eksperimentima gdje je to bilo potrebno selekcionirana $CD11c^+$ populacija, kao što je gore opisano, te označena monoklonalnim protutijelima konjugiranim fluorokromom, i analizirana protočnim citometrom. Korištena su monoklonalna protutijela fluorescein isotiocijanatom (FITC), fikoeritrinom (PE), PE-Cy5 ili alofikocijaninom (APC) konjugirana protutijela anti-CD45.1, CD45.2, CD11c, anti-H-

2b, anti-CD229.1, anti-CD90.1 (Thy1.1), anti-interferon-γ (IFN- γ), anti-IL-2, Rat-anti-mouse-IgG1, Rat-anti-mouse-IgG2b anti-CD11c, CD4, i CD8α (sva od BD Biosciences, San Jose, CA, USA). U nekim eksperimentima, biotinilirano anti-CD11c protutijelo bilo je označeno uz pomoć streptavidin-PE ili -APC (BD Biosciences). FITC-konjugirana protutijela anti-DEC205 kupljena su od Cedarlane Laboratories (Hornby, ON, Kanada). U eksperimentima u kojima smo koristili ovo protutijelo, prvo smo označili površinske antigene protutijelima od interesa, nakon čega su stanice fiksirane i permeabilizirane budući da je navedeni antigen lociran primarno intracelularno, te je potom stanična suspenzija inkubirana na 4 °C kroz 30 min u prisutnosti anti-DEC205. Protutijelo specifično za Langerhansove stanice, anti-CD326 (gp-40, Ep-CAM), kupljeno je od Developmental Studies Hybridoma Bank razvijene u okviru National Institute of Child Health and Human Development, University of Iowa Department of Biological Sciences. U svrhu *in vivo* praćenja kretanja dendritičkih stanica, u području abdomena miševa naneseno 200 µL 1% tetrametilrodamin-isotiocijanata, TRITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) otopljeno u odnosu 1:1 u acetondibutilftalatu. Dva ili četiri dana nakon nanošenja TRITC, regionalni limfni čvorovi su sakupljeni, izdvojene dendritičke stanice te učinjena analiza, kao što je gore opisano. Za prikupljanje podataka odnosno događaja korišten je protočni citometar marke FACSCalibur (BD Biosciences), dok je analiza učinjena uz pomoć programa CellQuest (BD Biosciences). U pojedinim ekperimentima propij jodid je dodan neposredno prije analize kako bi se iz analize izdvojio udio mrtvih stanica. Kako bi se odredilo stvaranje IFN-γ u stanicama, iste su stimulirane uz pomoć 4α-forbol 12-miristat 13-acetata (PMA; u konačnoj koncentraciji do 3 ng/ml) i ionomicina (500 ng/ml; oboje od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kroz 5 sati u kulturi u prisustvu GolgiStop (BD Biosciences). Nakon stimulacije i označavanja površnih antigena, stanice su fiksirane i permeabilizirane (CytoFix/CytoPerm kit, BD Biosciences) prema uputama proizvođača, te nakon toga inkubirane s anti-IFN-γ protutijelom kroz 30 minuta na +4 °C.

4.6. *In vivo* i histopatološka analiza GVHD

Za kvantifikaciju kliničke pojavnosti GVHD, koristili smo prethodno utemeljeni sustav bodovanja koji vrednuje promjene u 5 kliničkih pokazatelja: gubitak tjelesne mase, držanje, aktivnost, kvaliteta krzna te cjelovitost kože, pri čemu svaki pokazatelj maksimalno donosi dva boda, a najveća vrijednost cjelokupno iznosi deset bodova.[78,79] U određenim eksperimentima procijenjena je i jačina izražaja akutnog GVHD detaljnom histopatološkom analizom kože ušiju, jezika, jetre i crijeva. Svi uzorci bili su pohranjeni u 10-postotni neutralni formalin i pripremljeni za rutinsku mikroskopsku analizu koji je provodio iskusni patolog (prema principu dvostruko slijepog pokusa). Apoptotične epidermalne bazalne stanice brojane su po linearnom milimetru (Lmm), uz minimum od 6 milimetara po životinji. Podaci su predočeni kao diskeratotični indeks (medijan ± SEM), broj apoptotičnih keratinocita po Lmm.[80,81] Crijevni GVHD ocijenjen je na temelju apoptoze unutar kripti.[82] Apoptotične intestinalne stanice kripte izražene su za najmanje 25 kripti, kao broj apoptotičnih stanica po kripti. Mikroskopska procjena GVHD jetre sastoji se od procjene portalnog limfocitnog trijaditisa.[83,84] Pregledano je najmanje 10 portalnih trijada po uzorku, i podaci su iskazani brojčano na temelju 10 pregledanih trijada.

4.7. Statistička analiza

Podaci su analizirani koristeći program PRISM (inačica 4.0; GraphPad, San Diego, CA, USA). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM. U određivanju razine značajnosti korišten je *t* test za nezavisne uzorke ili analiza varijance (ANOVA). Preživljenje je uspoređivano log-rank testom. Vrijednost $P < 0.05$ smatrana je statistički značajnom.

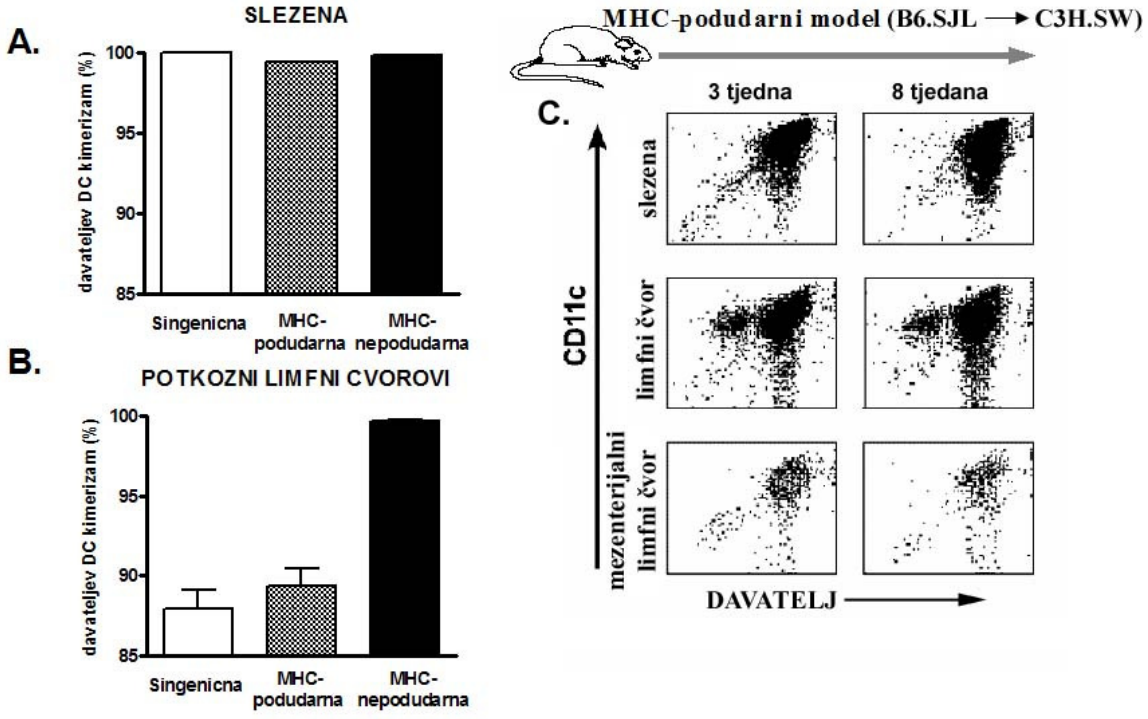
5. Rezultati

5.1. Kimerizam dendritičnih stanica slezene, kože, potkožnih limfnih čvorova, mezenterijalnih limfnih čvorova i T limfocita u MHC-podudarnom i nepodudarnom sustavu

U svrhu određivanja utjecaja stupnja tkivne nesnošljivosti davatelja i primatelja na perzistenciju dendritičkih stanica potkožnih limfnih čvorova, mezenterijalnih limfnih čvorova i slezene konstruirane su tri vrste kimera, MHC-podudarne, MHC-nepodudarne i singenične. MHC-podudarne kimere su konstruirane tako da su C3H.SW (H-2^b; $CD45.2^+$) miševi transplantirani koštanom srži od B6.SJL (H-2^b; $CD45.1^+$) miševa, MHC-nepodudarne kimere transplantacijom BALB/c (H-2^d; $CD45.2^+$) miševa koštanom srži od C57BL/6 (B6; H-2^b, $CD45.2^+$), dok je singenična kontrolna skupina konstruirana transplantacijom B6.SJL (H-2^b; $CD45.1^+$) miševa davateljima soja C57BL/6 (B6; H-2^b, $CD45.2^+$). Takav izbor parova koji se razlikuju u izražaju CD45 alela, poznatog i pod imenom zajednički leukocitni antigen (LCA prema engl. *leucocyte common antigen*), izraženog na svim hematopoetskim stanicama osim eritocita i plazma stanica, omogućio je analizu davateljskog kimerizma protočnom citometrijom. Šest tjedana kasnije protočnom citometrijom određen kimerizam dendritičkih stanica slezene i limfnih čvorova.

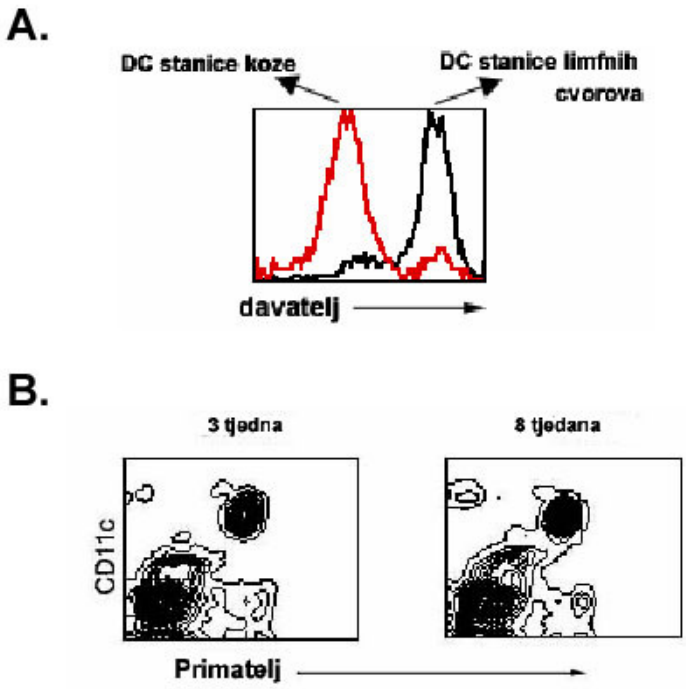
Analiza kimerizma ukazuje da je u sva tri para kimera nakon 6 tjedana utvrđena je potpuna rekonstitucija dendritičkih stanica slezene (slika 2A). Analiza potkožnih limfnih čvorova u ponavljanim je eksperimentima pokazala prisutan udio primateljevih dendritičkih stanica nakon singenične transplantacije od 12 ± 1.2% svih $CD11c^+$ stanica, nakon MHC-podudarne transplantacije od 10.6 ± 1.1% svih $CD11c_+$ stanica, dok je nakon MHC-nepodudarne transplantacije bilo prisutno svega 0.3 ± 0.3% dendritičkih stanica porijekla primatelja (slika 2B). U slezeni je nakon 3 tjedna 99.5 ± 0.2% stanica bilo porijekla davatelja. Nakon 8 tjedana nije bilo značajne razlike u kimerizmu (99.3 ± 0.4% stanica bilo je porijekla davatelja). Potkožni limfni čvorovi su nakon 3 tjedna sadržavali 8.5 ± 0.43% primateljevih dendritičkih stanica, a nakon 8 tjedana 11.6 ± 1.7% (slika 2C). U mezenterijalnim limfnim čvorovima u obje promatrane vremenske točke utvrđen je 100% davateljev DC kimerizam. Šest mjeseci nakon transplantacije (što je bila

najdalja vremenska točka u kojoj je kimerizam bio određivan) broj primateljevih dendritičkih stanica u potkožnim limfnim čvorovima bio je jednak broju nakon 8 tjedana. Kako bi se pobliže odredila dinamika zamjene primateljevih za davateljeve dendritičke stanice u MHC-podudarnom modelu 3 i 8 tjedana nakon transplantacije određen je davateljev DC kimerizam u tri reprezentativna limfatička organa: slezeni, potkožnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima. Prisustvo primateljevih dendritičkih stanica karakteristično je za potkožne limfne čvorove, budući da iste nisu bile prisutne u mezenterijalnim limfnim čvorovima.



Slika 2. Primateljeve dendritičke stanice perzistiraju u potkožnim limfnim čvorovim nakon MHC-podudarne a ne nakon MHC-nepodudarne alogenične transplantacije koštane srži. A i B. Singenične (C57BL/6 (B6; H-2^b, CD45.2^+) → B6.SJL (H-2^b; CD45.1^+)), MHC-podudarne (B6.SJL (H-2^b; CD45.1^+) → C3H.SW (H-2^b; CD45.2^+)) i MHC-nepodudarne (C57BL/6 (B6; H-2^b, CD45.2^+) → BALB/c (H-2^d; CD45.2^+)) kimere su konstruirane nakon letalnog ozračenja cijelog tijela primatelja s 900 cGy na dan -1 te transplantacije 10^7 nemanipuliranih stanica koštane srži davatelja na dan 0. Šest tjedana nakon transplantacije životinje su žrtvovane te su sakupljene slezene, potkožni te mezenterijalni limfni čvorovi (3 miša/grupi). Učinjena je izolacija CD11c$^+$ populacija iz navedenih limfatičkih organa. Nakon bojanja flourokromom obilježenim protutijelima na CD11c i CD45.1 odnosno H-2^d određen je kimerizam stanica slezene i limfnih čvorova. C. Slezena, potkožni i mezenterijalni limfni čvorovi sakupljeni su 3 odnosno 8 tjedana nakon MHC-podudarne transplantacije i analizirani kao što je opisano. Prikazana je reprezentativna analiza između četiri učinjena nezavisna eksperimenta.

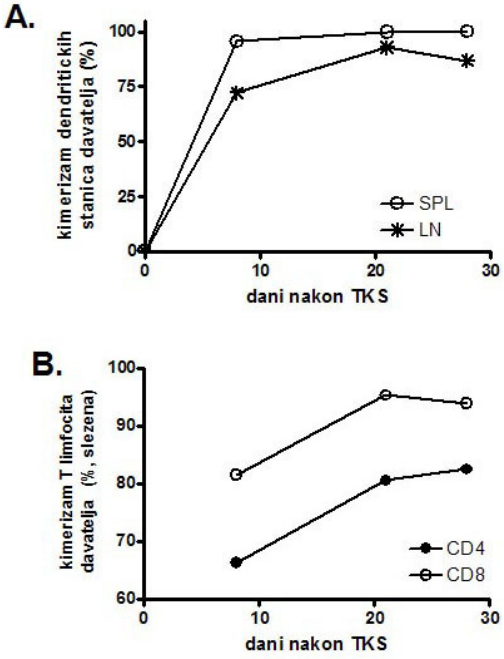
Langerhansove stanice kože tijekom normalne homeostaze i u odsustvu upalne reakcije recirkuliraju u regionalne limfne čvorove.[50] U svrhu određivanja kimerizma DC stanica kože, 3 odnosno 8 tjedana nakon transplantacije sakupljene uške životinja koje su primile transplantat koštane srži MHC-podudarnih davatelja (B6.SJL → C3H.SW), te su izdvojene dendritičke stanice kože emigrirale nakon inkubacije. Njihov kimerizam određen je analizom izražaja CD45.1 i CD45.2 biljega na $CD11c^+$ stanicama. Pokazano je da je velika većina stanica koje migriraju iz kože 3 tjedna nakon transplantacije porijekla primatelja, što je upravo suprotno od nalaza u potkožnim limfnim čvorova (slika 3A). Nakon osam tjedana od transplantacije, populacija $CD11c^+CD45.2^+$ stanica u koži je i dalje dominantna i stabilna (slika 3B).



Slika 3. Dendritičke stanice kože predominantno su porijekla primatelja. A. Tri tjedna nakon MHC-podudarne transplantacije (B6.SJL → C3H.SW) epidermalni slojevi dobiveni razdvajanjem slojeva kože uški miševa kultivirani su kroz 48 sati u prisustvu GM-CSF i TNFα. Stanice koje su emigrirale sakupljene su te je učinjena analiza kimerizma protočnim citometrom, koristeći protutijela na CD11c, CD45.1 (davatelj) i CD45.2 (primatelj). Histogrami predstavljaju izražaj biljega CD45.1 (davatelj) na $CD11c^+$ stanicama kože (crvena linija) odnosno potkožnim limfnim čvorovima (crna linija) istih životina (združene stanice triju kimera). B. Opisani eksperiment je ponovljen 8 tjedana nakon transplantacije. Prikazana je $CD11c^+CD45.2^+$ populacija stanica emigriranih iz kože kimera porijekla primatelja.

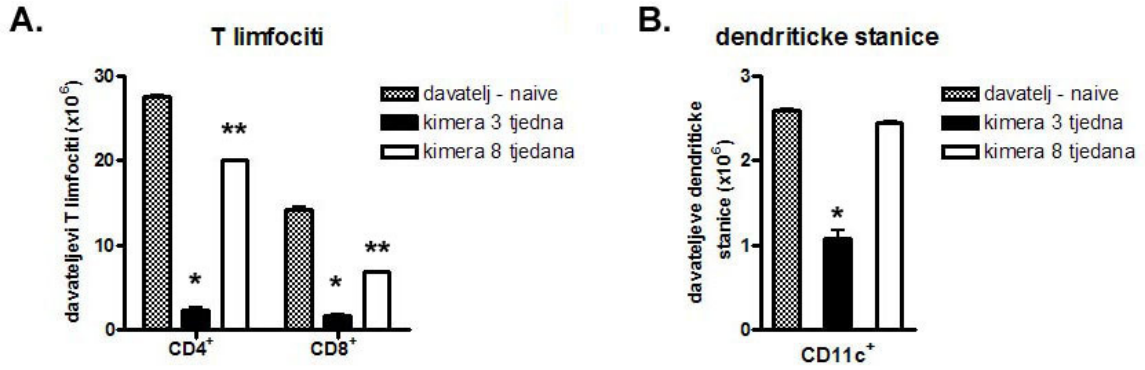
5.2. Rekonstitucija dendritičkih stanica i T limfocita nakon MHC-podudarne transplantacije

Budući da nije uočena razlika u rekonstituciji dendritičkih stanica MHC-podudarnih kimera nakon 3 i 8 tjedana, pokušalo se pobliže istražiti dinamiku zamjene primateljevih za davateljeve dendritičke stanice u slezeni i limfnim čvorovima. Na dan +8, +21 i +28 nakon transplantacije izolirane su dendritičke stanice slezene i potkožnih limfnih čvorova i određen udio stanica porijekla primatelja. U slezeni već 8 dana nakon transplantacije dolazi do gotovo potpune zamjene dendritičkih stanica i zaostaje manje od 5% stanica porijekla primatelja, a 21 dan nakon transplantacije udio davateljevih stanica u ukupnom broju $CD11c^+$ stanica premašuje 99%. U limfnim čvorovima je dinamika zamjene nešto sporija: 8 dana nakon transplantacije 28% $CD11c^+$ je porijekla primatelja, dok je 28 dana oko 13% porijekla primatelja (slika 4 A). Obzirom da je korišten transplantacijski model u kojem se parovi životinja razlikuju u izražaju alela CD45 biljega, bilo je moguće analizirati rekonstituciju i kimerizam T limfocita. Suprotno od dendritičkih stanica, zamjena primateljevih za davateljeve T limfocite bila je sporija; osam dana nakon transplantacije svega 66.2% $CD4^+$ i 81.5% $CD8^+$ stanica slezene bilo je porijekla davatelja; taj udio postupno raste da bi dosegnuo 82.5 % za $CD4^+$ i 93.8 % za $CD8^+$ stanice 28 dana nakon transplantacije (slika 4B).



Slika 4. Rekonstitucija dendritičkih i T limfocita nakon MHC-podudarne transplantacije A. Nakon učinjene MHC-podudarne transplantacije (B6.SJL → C3H.SW) na dane 8, 21 i 28 nakon transplantacije određen je davateljev kimerizam dendritičkih stanica u slezeni (○) i limfnim čvorovima (∗), koristeći protočnu citometriju i bojanje protutijelima na CD11c i CD45.1 biljege (3 miša/vremenskoj točki). B. U istim vremenskim točkama određen je i kimerizam T limfocita slezene, koristeći protočnu citometriju i bojanje protutijelima na CD4, CD8 i CD45.1. Slika prikazuje dinamiku rekontitucije $CD4^+$ (●) i $CD8^+$ (○) populacije slezene.

Uspoređeni su i apsolutni brojevi dendritičkih stanica i T limfocita slezene, što je prikazano na slici 5 A i B. Naivni ne-transplantirani miš soja davatelja korišten je kao kontrola. U usporedbi s kontrolom, ukupan broj $CD4^+$ i $CD8^+$ stanica slezene 3 tjedna nakon transplantacije iznosi oko 15% očekivanog broja za taj soj, dok apsolutni broj $CD11c^+$ stanica iznosi oko 50% očekivanog. Osam tjedana nakon transplantacije ukupan broj $CD11c^+$ stanica slezene je dostigao očekivani broj, dok je ukupan broj T limfocita još uvijek manji od kontrola ($CD8^+$ stanice reducirane za oko 50%, dok su $CD4^+$ stanice reducirane za oko 28%).

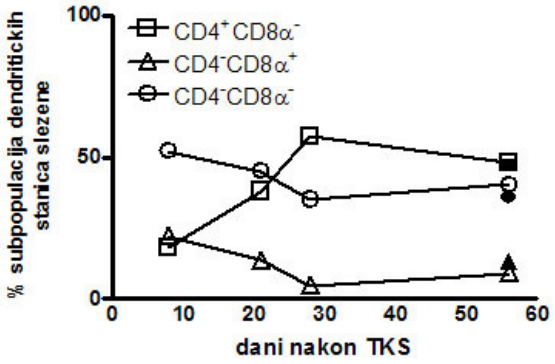


Slika 5. Dendritične stanice i T limfociti 3 i 8 tjedana nakon transplantacije. A Apsolutni broj CD4 i CD8 stanica slezene davatelja 3 i 8 tjedana nakon transplantacije i B. Broj davateljevih dendritičnih stanica slezene 3 i 8 tjedana nakon transplantacije. * P<0.001 kimera nakon tri tjedna u usporedbi s naivnim mišem; ** P<0.001 kimera nakon osam tjedana u usporedbi s naivnim mišem.

U slezeni miša se fenotipski prema izražaju CD8α, CD4 i DEC205 biljega mogu razlikovati 4 podvrste DC: prvi tip ima jak izražaj CD8α i umjeren DEC205 ($CD8^+$ DC), drugi ima jak izražaj CD4 ali ne i DEC205 ($CD4^+$), treći tip ne izražava niti jedan od navedenih biljega ($CD4^-CD8^-$); četvrti tip predstavlja plazmacitoidna DC koju karakterizira jak izražaj CD45RA biljega, čiji sadržaj ovdje nije analiziran.[74,85-87] Sve tri

analizirane podvrste su efikasne u aktivaciji alogenih T limfocita u konvencionalnom testu miješanih limfocta. U svrhu određivanja brzine rekonstitucije pojednih podvrsta DC slezenež

analiziran je udio $CD4^+$, $CD8\alpha^+$ i $CD4^-$ $CD8^-$ stanica u ukupnom broju $CD11c^+$ stanica slezene u 4 vremenske točke nakon transplantacije koštane srži (TKS). Utvrđeno je da nakon TKS dolazi do brze rekonstitucije $CD11c^+$ DC s predominacijom $CD4^-$ $CD8^-$ podvrste osam dana nakon transplantacije, no njihov broj s vremenom pada prema očekivanom udjelu o ukupnoj populaciji. $CD4^+$ DC pokazale su sporiju dinamiku rekonstitucije, no do dana +28 postaju dominantna populacija. Osam tjedana nakon transplantacije distribucija podvrsta jednaka je onoj u normalnih davatelja i primatelja (slika 6).

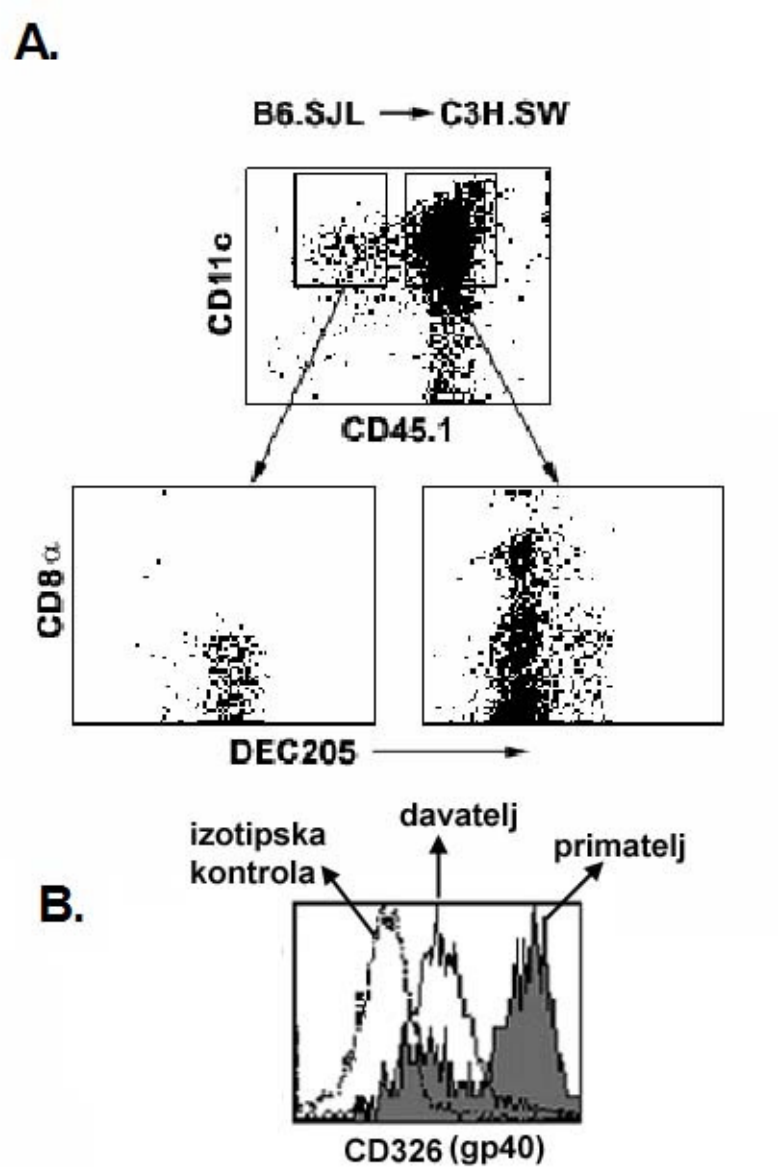


Slika 6. Kinetika rekonstitucije podvrsta dendritičkih stanica slezene. Dendritičke stanice slezene su izolirane u četiri vremenske točke (dan +8, +21, +28 i + 56 nakon MHC-podudarne transplantacije) kako bi se odredila distribucija tri popopulacije dendritičkih stanica slezene: populacija $CD4^+CD8\alpha^-$ (□), $CD4^-CD8\alpha^+$ (Δ) i $CD4^-CD8\alpha^-$ (○). Puni simboli predstavljaju vrijednosti dobivene analizom stanica slezene miša soja davatelja koji je služio kao kontrola. Analizirana su 3 miša/grupi/vremenskoj točki.

5.3. Porijeklo dendritičkih stanica potkožnih limfnih čvorova nakon MHC-podudarne transplantacije

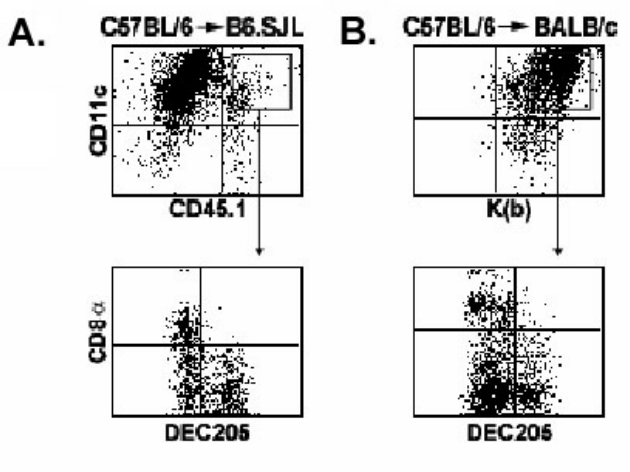
Kao što je već navedeno, populaciju dendritičkih stanica limfnih čvorova čini 5 različitih vrsta dendritičkih stanica, od čega su tri fenotipski jednake dendritičkim stanicama

slezene, dok druge dvije populacije predstavljaju stanice koje iz kože migriraju u limfne čvorove i porijeklom su iz epidermisa (fenotipski $CD11c^{+}CD8\alpha^{-}DEC205^{high}$) odnosno iz dermisa (fenotipski $CD11c^{+}CD8\alpha^{-}DEC205^{low}$). Populacija stanica porijeklom iz epidermisa predstavlja Langerhansove stanice temeljeno na njihovom selektivnom bojanju langerinom, biljegom antigen procesuirajućeg sustava Langerhansovih stanica.[46,52] Obzirom da za potrebe ovog istraživanja nije bilo potrebno razlikovati epidermalne od dermalnih dendritičkih stanica, odlučeno ih je, shodno literaturi[88] promatrati zajedno i zvati dedritičke stanice porijeklom iz epitela, odnosno kraće epDC. U svrhu određivanja točnog fenotipa ostatne populacije dendritičkih stanica porijekla primatelja u limfnom čvoru učinjen je slijedeći eksperiment: tri tjedna nakon MHC-podudarne transplantacije (B6.SJL→C3H.SW) životinje su žrtvovane te sakupljeni potkožni limfni čvorovi i slezene. Uobičajeno su žrtvovane tri životinje, limfni čvorovi su zbog malog broja stanica promatrani zajedno. Izolirane su $CD11c^{+}$ stanice, a koristeći četverobojnu protočnu citometriju odredili smo fenotip ostatne primateljeve populacije. Naime bojanjem protutijelima na CD11c i CD45.1 antigen omogućilo je razdvajanje populacija davateljevih ($CD45.1^{+}$) od primateljevih ($CD45.1^{-}$), dendritičkih stanica ($CD11c^{+}$) dok je bojanje protutijelima na CD8α i DEC205 omogućilo razlikovanje epidermalnih od ostalih dendritičkih stanica. Gotovo sve $CD45.1^{-}$ stanice (primatelj) su epitelijalnog podrijetla ($CD8a^{-}DEC205^{+}$) (slika 7A), dok se $CD45.1^{+}$ stanice (davatelj) sastoje se od svih subpopulacija dendritičkih stanica. Izolirane $CD11c^{+}$ stanice limfnih čvorova su dodatno bojane i protutijelima na CD11c, CD45.1, te na CD326 (gp40), molekulu koja predstavlja mišji homolog humane epitelijalne adhezijske molekule, specifično izražene na većini epitelijalnih stanica stratificiranog epitela, kao i na svježe izoliranim, kultiviranim te LC stanicama koje su migrirale iz eksplantirane kože u staničnoj kulturi. CD326 (gp40) je značajno izražena na DC u T staničnim regijama limnog čvora, koje ujedno izražavaju i CD11c te DEC205, te je istu moguće koristiti kao biljeg LC kod analize podvrsta dendritičkih stanica mišjeg limfnog čvora.[89] Kao što je pokazano na slici 7B, stanice porijekla primatelja (puni histiogram) pokazuju vrlo visoku razinu CD326, osobito u usporedbi s $CD45.1^{-}$ stanicama (prazni histogram; isprekidani histogram predstavlja izotipsku kontrolu) što dodatno ukazuje na njihovo epitelijalno podrijetlo i sugerira da su to Langerhansove stanice.



Slika 7. Epitelne dendritičke stanice (epDC) dominantna su populacija među perzistirajućim davateljevim dendritičkim stanicama u limfnim čvorovima MHC-podudarnih kimera. A. $CD11c^+$ stanice izolirane iz limfnih čvorova B6.SJL → C3H.SW kimera analizirane su tri tjedna nakon transplantacije protočnom citometrijom koristeći protutijela na CD11c, CD8α, CD45.1 i DEC205. Gornji panel pokazuje odnos $CD11c^+$ stanica primatelja i davatelja u limfnom čvoru, dok donji panel pokazuje kako je primateljeva $CD11c^+CD45.1^-$ populacija predominantno pokazuje fenotip epDC, odnosno $DEC205^{high}CD8\alpha^-$, dok je davateljeva $CD11c^+CD45.1^+$ populacija sastavljena od svih podvrsta DC stanica ($CD8^+$, $CD8\text{-}DEC205^{high}$, $CD8\text{-}DEC205^{low}$; nije učinjeno bojanje anti-CD4 protutijelom). B. *Visoka razina izražaja CD326 (gp40) na primateljevim $CD11^+$ stanicama limfnog čvora.* Izolirane $CD11^+$ stanice limfnog čvora bojane su s anti-CD45.1, anti-CD11c i anti-CD326 protutijelom. Histogram prikazuje izražaj CD326 na PI- rezidualnim primateljevim (ispunjeni histogram) i davateljevim (prazni histogram). Iscrtkani histogram predstavlja izotipsku kontrolu.

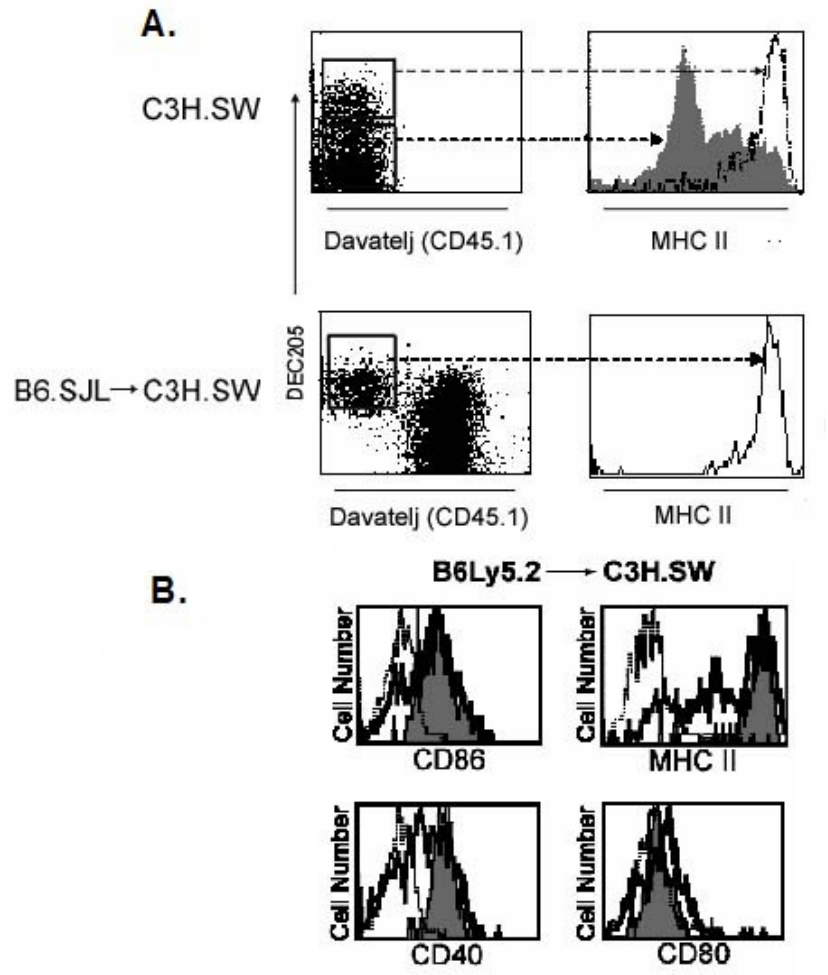
U singeničnom modelu (C57BL/6 → B6.SJL) primateljeva CD45.1$^+$ populacija sadržavala je sve opisane subpopulacije dendritičkih stanica limfnog čvora (slika 8A). S druge strane, nakon mijeloablativnog kondicioniranja i transplatacije BALB/c miševa nemanipuliranom koštanom srži B6 miševa, primateljevih dendritičkih stanica u potkožnim limfnim čvorovima nije bilo, a sve CD11c$^+$CD8α$^-$DEC205^{high} stanice limfnih čvorova bile su porijekla davatelja, što je i u skladu s objavljenim studijama učinjenima u MHC-nepodudarnim modelima transplantacije (slika 8B).[55,68,90]



Slika 8. Rezidualne primateljeve dendritičke stanice limfnih čvorova u singeničnih i MHC-nepodudarnih kimera. A. Tri tjedna nakon transplantacije analizirana je distribucija rezidualnih primateljevih dendritičkih CD11c$^+$CD45.1$^+$ stanica singeničnih kimera (B6 → B6.SJL) koristeći protutijela na CD11c, CD8α, CD45.1 i DEC205. B. Distribucija dendritičkih stanica limfnog čvora u MHC-nepodudarnih kimera (B6 → BALB/c) analizirana je koristeći protutijela na CD11c, CD8α, H2K^b i DEC205.

Pokazano je već da u normalnog miša epDC kontinuirano migriraju iz kože u limfne čvorove te da u mirnom stanju izražavaju visoke razine kostimulatornih molekula, čak i u odsustvu upalnih podražaja.[37,52,91,92] Smatra se da je to u svrhu održavanja periferne tolerancije.[93,94] S obzirom na navedeno analizirana je razina aktivnosti DEC205^{high} i DEC205^{low} CD11c$^+$ stanica, te je nađeno da CD11c$^+$DEC205^{high}, ali ne i CD11c$^+$DEC205^{low} stanice netransplantiranih C3H.SW miševa posjeduju zreli, aktivirani fenotip (MHC klase II prikazan na slici 9A, gornji panel), što su rezultati koji su u skladu s objavljenim studijama.[37,46,52] Analizirana je i aktivacijska razina CD11c$^+$DEC205^{high}

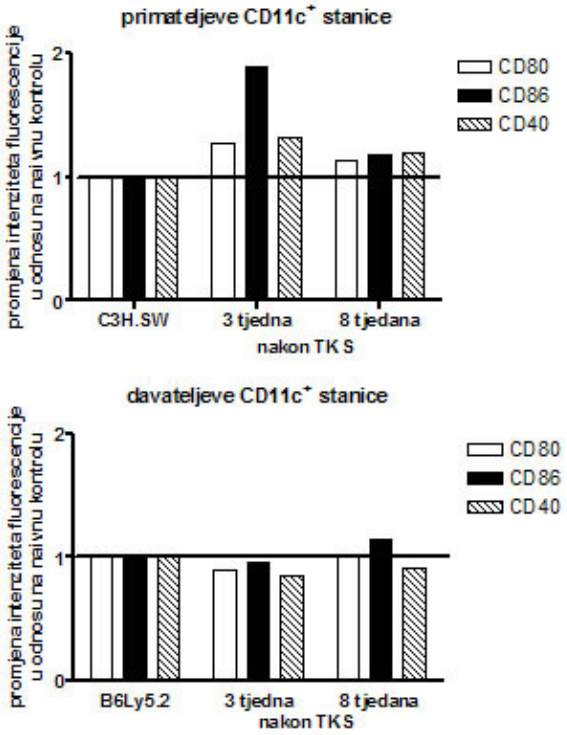
stanica limfnog čvora porijekla davatelja 3 tjedna nakon transplantacije. Nađeno je da u MHC-podudarne kimere tri tjedna nakon transplantacije $CD11c^{+}DEC205^{high}$ stanice porijekla primatelja i dalje pokazuju vrlo visok izražaj MHC klase II molekule (slika 9A donji panel). Također, uspoređena je razina izražaja najvažnijih kostimulacijskih molekula, MHC klase II, CD86, CD80 i CD40 između dendritičkih stanica porijekla primatelja i onih porijekla davatelja (uspoređivana je ukupna $CD11c^{+}$ populacija, ne samo $DEC205^{+}$). Nađeno je da $CD11c^{+}$ stanice porijekla primatelja (slika 8B, ispunjeni histogram) izražavaju višu razinu kostimulacijskih molekula od onih porijekla davatelja, osobito CD40 i MHC klase II (slika 9B, prazan histogram; isprekidani histogram predstavlja izotipsku kontrolu).



Slika 9. EpDC izolirane iz naivnog miša, kao i primateljeve epDC izolirane iz MHC-podudarne kimere pokazuju visoku razinu izražaja molekule MHC klase II. A. *Gornji panel* Usporedba izražaja MHC klase II u naivnog netransplantiranog miša C3H.SW između $CD11c^{+}DEC205^{high}$ i

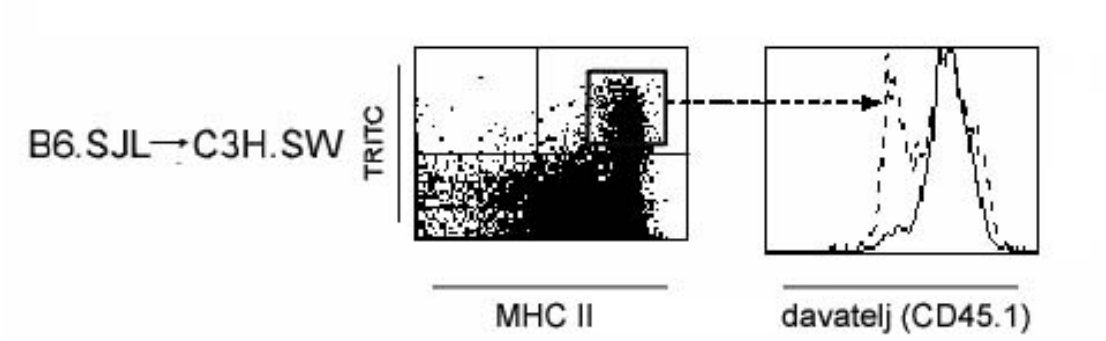
$CD11c^+DEC205^{low}$ populacije koristeći četverobojnu protočnu citometriju i protutijela na CD11c, DEC205, CD45.1 i MHC II. Sivi histogram označava $CD11c^+DEC205^{low}$ populaciju dok iscrtkani označava $CD11c^+DEC205^{high}$ populaciju. *Donji panel* Dvanaest tjedana nakon MHC-podudarne transplantacije (B6.SJL → C3H.SW) izražaj MHC klase II na CD45.1-$CD11c^+DEC205^{high}$ populaciji (primateljeve epDC) i dalje je visoka. B. Usporedba izražaja kostimulacijskih molekula između dendritičkih stanica davatelja (prozor postavljen na $CD11c^+CD45.1^+$) i primatelja (prozor postavljen na $CD11c^+CD45.1^-$) u MHC-podudarnom modelu (B6.SJL → C3H.SW). Puni histogram predstavlja dendritičke stanica primatelja, prazan histogram dendritičke stanice davatelja; iscrtkani histogram predstavlja izotipsku kontrolu.

U pokušaju odgovora na pitanje što se kroz vrijeme događa s kostimulacijskim potencijalom dendritičkih stanica porijekla primatelja uspoređene su srednje vrijednosti fluorescencije anti-CD40, anti-CD80 i anti-CD86 protutijela na $CD11c^+$ stanicama porijekla davatelja i primatelja 3 odnosno 8 tjedana nakon transplantacije. Srednja vrijednost fluorescencije (MFI prema engl. *mean fluorescence intensity*) izražava gustoću pojedinog antigena na staničnoj površini. Primateljeve dendritičke stanice tri tjedna nakon transplantacije pokazuju višu srednju vrijednost fluorescencije svih kostimulacijskih molekula u usporedbi s vrijednostima u naivnog netransplantiranog miša soja primatelja, no te se vrijednosti tijekom vremena smanjuju i 8 tjedana nakon transplantacije tek su nešto više od kontrolnih vrijednosti (slika 10, gornji panel).



Slika 10. Primateljeve CD11c$^+$ stanice pokazuju višu vrijednost izražaja kostimulacijskih biljega 3 tjedana ali ne i 8 tjedana nakon transplantacije u usporedbi s naivnim mišem. Učinjena je analiza *izražaja* CD80, CD40 i CD86 molekula na CD11c$^+$ stanicama limfnih čvorova B6.SJL → C3H.SW kimera 3 odnosno 8 tjedana nakon transplantacije. Analizirana su 3 miša/grupi, rezultati su iskazani kao log promjene intenziteta fluorescencije u odnosnu na kontrolu, odnosno C3H.SW miša za primateljeve stanice (gornji panel) i B6.SJL za davateljeve stanice (donji panel).

Osim što Langerhansove stanice pokazuju visoku razinu kostimulacijskih molekula na površini, njihova važna karakteristika je sposobnost prihvaćanja antigena i njegovog predočavanja T limfocitu u limfnom čvoru u odsutnosti upalnih stimulusa. Kako bi pokazali sposobnost rezidualnih primateljevih DC da prihvate epikutano primjenjeni antigen i predočuju ga T limfocitima u limfnom čvoru, na kožu trbuha 3 tjedna starih kimera nanesena je TRITC boja.[52,95] Dva odnosno četiri dana kasnije analizirana je prisutnost TRITC$^+$CD11c$^+$ stanica u regionalnim limfnim čvorovima kao i njihovo porijeklo (davatelj odnosno primatelj). Kao što je i bilo očekivano prema nalazima iz literature, TRITC$^+$CD11c$^+$ dendritičke stanice bile su prisutne samo među onim DC koje su pokazivale najviši nivo MHC klase II izražaja, i predstavljale su oko 20% svih CD11c$^+$MHC II^{high} stanica u limfnim čvorovima drugog, a 26% četvrtog dana. Dva dana nakon TRITC aplikacije velika većina stanica TRITC$^+$ stanica bila porijekla davatelja, dok je četvrti dan nakon aplikacije značajan udio u ukupnom broju imala populacija porijekla primatelja (Slika 11).

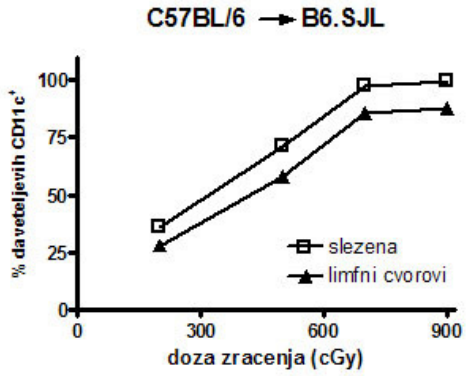


Slika 11. EpDC izolirane iz MHC-podudarnih kimera sposobne su za uzimanje i prijenos epikutano primjenjenih antigena u lokalne limfne čvorove. Na kožu abdomena MHC-podudarnih kimera (B6.SJL → C3H.SW) nanesena je fluorescentna boja TRITC. Dva odnosno četiri dana nakon aplikacije regionalni limfni čvorovi su sakupljeni i izolirane CD11c$^+$ stanice, koje su potom obojane protutijelima na CD11c, CD45.1 i MHC II. Učinjena je analiza izražaja TRITC i MHC II (lijevi panel). Histogram predstavlja izražaj CD45.1 antigena na CD11c$^+$MCH II^{high}TRITC$^+$ stanicama dva (puna crta), odnosno 4 dana nakon primjene (iscrtkana crta). Prikazani su reprezentativni plotovi jednog od tri zasebna eksperimenta.

.

5.4. Učinak ukupne doze zračenja i zrelih davateljevih T limfocita na kimerizam dendritičkih stanica nakon transplantacije

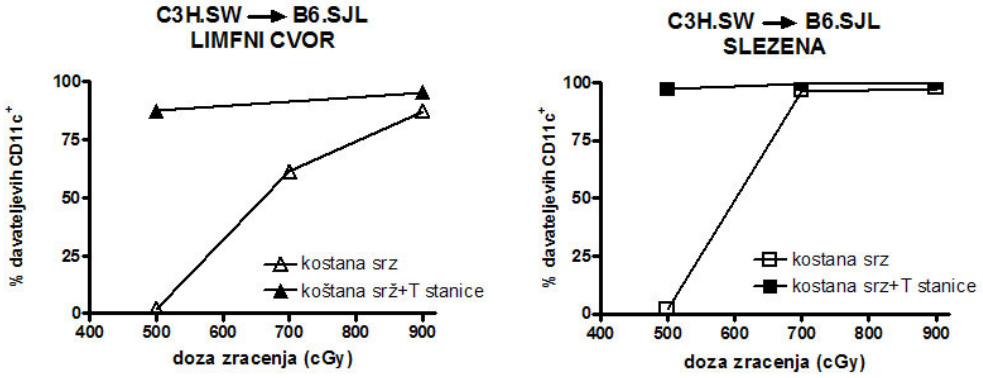
Kako je već pokazano, stupanj tkivne snošljivosti utječe na DC kimerizam kože i limfnih čvorova nakon transplantacije. Kako bi se točno procijenila uloga kondicioniranja u davateljevom kimerizmu nakon transplantacije neovisno o stupnju tkivne snošljivosti, doza zračenja cijelog tijela titrirana je u kontekstu singenične transplantacije (C57BL/6 → B6.SJL). Najmanja primjenjena doza bila je 200cGy, što je ujedno doza koja se u ovih životinja koristi u svrhu nemijeloablativne transplantacije odnosno postizanja miješanog hematopoetskog kimerizma. Najviša primjenjena doza bila je 900cGy, što je ujedno i doza koja se tijekom rada u ovom modelu pokazala kao mijeloablativna. Životinje su žrtvovane šest tjedana nakon transplantacije, sakupljene slezene i limfni čvorovi, koji su potom obilježeni protutijelima na CD11c, CD45.1 i CD45.2. Koristeći protočnu citometriju zabilježen je postotak $CD11c^+$ stanica koji pokazuju biljeg CD45.2 (davatelj) i određen kimerizam dendritičkih stanica u slezeni i potkožnim limfnim čvorovima. Davateljev kimerizam dendritičkih stanica slezene rastao je proporcionalno dozi isporučenog ozračenja i kod doze od 700cGy bio je blizu 100% (slika 12). U potkožnim limfnim čvorovima rast udjela davateljevih dedritičkih stanica bio je sporiji, a njihov udio nikada nije prešao 90%.



Slika 12. Doza zračenja i kimerizam dendritičnih stanica nakon singenične TKS. B6.SJL skupine davatelja (6 miševa/grupi) kondicionirane su rastućim dozama zračenja cijelog tijela na dan -1, a na dan 0 su dobile 10^7 stanica koštane srži singeničnih davatelja C57BL/6. Šest tjedana nakon transplantacije izolirane su dendritičke $CD11c^+$ stanice i određen je njihov kimerizam u slezeni

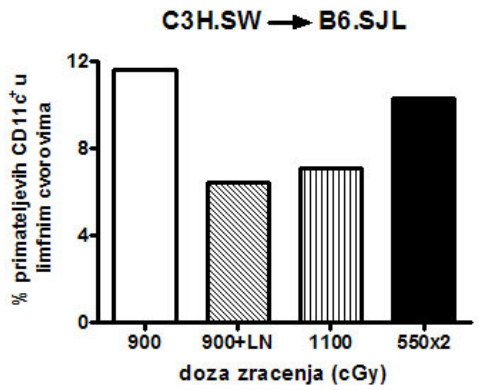
(□) i limfnim čvorovima (▲) temeljem izražaja CD11c i CD45.2 određene protočnom citometrijom.

U slijedećim su eksperimentima kao MHC-nepodudarni model transplantacije korišteni isti sojevi miševa no u suprotnom smjeru, odnosno C3H.SW su služili kao davatelji a B6.SJL kao primatelji, u svrhu potvrde da zabilježeni rezultati nisu karakteristika jednog transplantacijskog modela. Kako bi procijenili u kojoj mjeri prisutnost T limfocita utječe na konverziju kimerizma odnosno na visinu doze zračenja koja je potrebna za postizanje konverzije u MHC-podudarnom modelu transplantacije, B6.SJL miševi su kondicionirani rastućim dozama zračenja (od 500 do 900 cGy) i transplantirani MHC-podudarnom koštanom srži C3H.SW miševa sa ili bez dodanih 10^7 davateljevih T limfocita. Shodno prethodnim eksperimentima, bilo je potrebno najmanje 700 cGy kako bi se postiglo uspješno prihvaćanje transplantata (Slika 13). Prisutnost T limfocita davatelja u transplantatu smanjilo je minimalnu dozu zračenja potrebnu za postizanje prihvaćanja transplantata s 700 na 500 cGy ($p<0.05$), dok je prisutnost davateljevih T limfocita u transplantatu jasno smanjilo količinu ostatnih primateljevih dendritičkih stanica u limfnim čvorovima (12.7 vs. 4.4% kod 900 cGy).



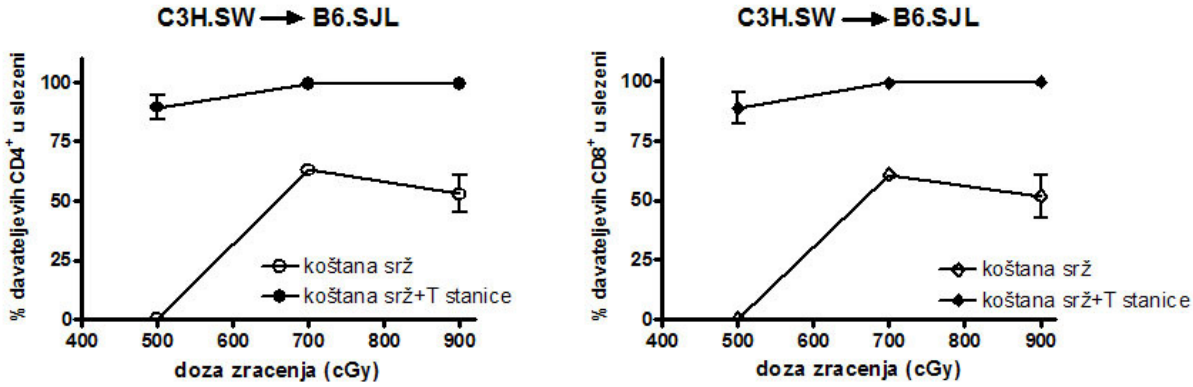
Slika 13. MHC-podudarni alogenični T limfociti određuju nivo rezidualnih primateljevih DC u limfnim čvorovima, te smanjuju potrebu za visokim dozama zračenja u svrhu postizanja popunog davateljevog DC kimerizma slezene. B6.SJL skupine davatelja (6 miševa/grupi) kondicionirane su rastućim dozama zračenja cijelog tijela na dan -1, a na dan 0 su dobile 10^7 stanica samo koštane srži (Δ, □) ili u kombinaciji s 10^7 splenocita (▲, ■) MHC-podudarnog C3H.SW miša. Šest tjedana nakon transplantacije izolirane su dendritičke $CD11c^+$ stanice i određen je njihov kimerizam u limfnim čvorovima (lijevi panel) i slezeni (desni panel) temeljem izražaja CD11c i CD45.1 određenih protočnom citometrijom.

Pri dozi zračenja od 1100 cGy, neovisno primjeni li se u jednoj ili dvije frakcije, i nadalje zaostaje iznad 5% primateljevih dendritičkih stanica (slika 14).



Slika 14. Utjecaj zračenja i T limfocita na perzistenciju primateljevih DC. B6.SJL skupine miševa (3 miša/grupi) kondicionirane su s 900 odnosno 1100 cGy primijenjenih u jednoj odnosno dvije frakcije nakon čega je slijedila transplantacija 10^7 stanica samo koštane srži ili u kombinaciji s 10^7 T limfocita limfnih čvorova davatelja, MHC-podudarnog C3H.SW miša. Dvanaest tjedana nakon transplantacije protočnom citometrijom je određena populacija rezidualnih primateljevih $CD11c^+$ stanica limfnih čvorova.

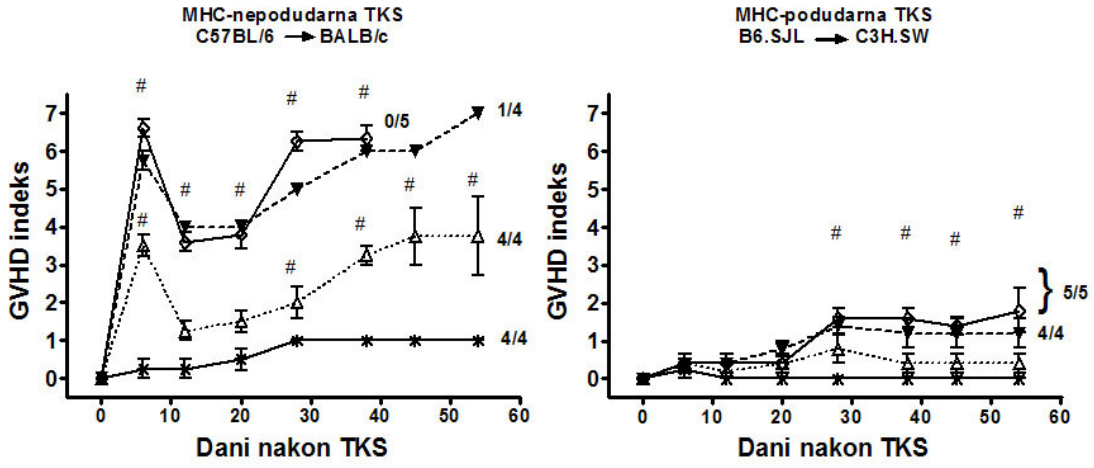
Analizom kimerizma $CD4^+$ i $CD8^+$ stanica periferije utvrđeno je da dodatak davateljevih T limfocita transplantatu pojačava GVH odgovor i značajno smanjuje nivo rezidualnih primateljevih T limfocita u slezeni (Slika 15).



Slika 15. Utjecaj T limfocita iz transplantata na davateljev T stanični kimerizam u slezeni. Šest tjedana nakon transplantacije davateljev $CD4^+$ (lijevi panel) i $CD8^+$ (desni panel) stanični kimerizam određen je protočnom citometrijom u slezeni kimera koje su dobile koštanu srž (○,◊) odnosno koštanu srž i splenocite (●,♦). Podaci predstavljaju jedan od tri nezavisno izvedena eksperimenta s 3 miša/grupi.

Kako bi točnije istražili odnos doze davateljevih T limfocita u transplantatu i rezidualnih primateljevih T i dendritičkih stanica nakon MHC-podudarne i MHC-nepodudarne transplantacije, učinjen je set eksperimenata u kojima je titrirana doza T limfocita

prisutnih u transplantatu. Kako bi direktna usporedba između kimera bila moguća, sve su životinje kondicionirane na isti način (TBI 800cGy), sve su istoga su dana primile transplantat koji se sastojao od 10^7 stanica koštane srži iz kojeg su odstranjeni T limfociti, porijeklom iz istog izvora, a iz istog izvora su bili i T limfociti dodani transplantatu. Nakon transplantacije sve su kimere praćene te su tjedno procjenjivani klinički znakovi GVHD.[78,79] Kao što je pokazano na tablici 1 i slici 16, dodatak ≥1.5 x 10^6 T limfocita transplantatu u MHC-nepodudarnom modelu (B6.SJL → BALB/c) prouzročilo je žestoku GVHD reakciju i uzrokovalo smrt u većine životinja, dok je dodatak manje doze (0.5 x 10^6) davateljevih T limfocita prouzročio umjereni GVHD gledano do šestog tjedna nakon transplantacije; iz tog razloga je eksperiment prekinut dva tjedna kasnije. Niti jedna od MHC-podudarnih B6.SJL → C3H.SW kimera koje su dobile samo TCD BM, ili TCD BM uz dodatak 0.5 x 10^6 davateljevih T limfocita, nisu pokazvale znakove kliničkog GVHD (slika 16). MHC-podudarne kimere koje su dobile 1.5 x 10^6, odnosno 3 x 10^6 T limfocita uz TCD BM pokazivale su samo blage znakove GVHD (gubitak na težini, slika 16), a tijekom 8 tjedana opservacije nisu pokazivale znakova kožnog GVHD.



Slika 16. Utjecaj doze T limfocita i MHC podudarnosti na razvoj i jačinu penetracije GVHD. MHC-podudarne (B6.SJL → C3H.SW) i MHC-nepodudarne (C57BL/6 → BALB/c) kimere konstriurane su primjenom mijeloablativne doze zračenja primatelja (800 cGy) i transplantacijom 10^7 stanica koštane srži iz koje su odstranjeni limfociti. Transplantatu su dodane rastuće doze davateljevih T limfocita dobivenih purifikacijom pomoću T staničnih izolacijskih kitova (Miltenyi Biotech). *Lijevi panel* Klinički GVHD indeks nakon MHC-nepodudarne TKS. Primatelji (BALB/c) su transplantirani samo s TCD BM (*), TCD BM + 0.5 x 10^6 (Δ), TCD BM + 1.5 x 10^6 (▼), ili TCD BM + 3 x 10^6 (◊) pročišćenih T limfocita. # označava $p<0.05$ (* vs. Δ,▼,◊). *Desni panel* Klinički GVHD indeks nakon MHC-podudarne TKS. Primatelji (C3H.SW) su transplantirani samo s TCD BM (*),TCD BM + 0.5 x 10^6 (Δ), TCD BM + 1.5 x 10^6 (▼), ili TCD BM + 3 x 10^6 (◊) pročišćenih T limfocita. # označava $p<0.05$ (* vs. ◊).

U vrijeme konačne analize, osam tjedana nakon transplantacije, učinjena je procjena davateljevog T staničnog kimerizma u limfoidnim tkivima, te analiza kimerizma dendritičkih stanica kože. Kao što je bilo i očekivano, u obje grupe kimera transplantacijom TCD BM, osobito uz dodatak T limfocita, postignuta je visoka razina davateljevog T staničnog kimerizma. Nađena je značajna razlika u davateljevom LC kimerizmu nakon MHC-nepodudarne transplantacije ovisno o prisutnosti dodanih 0.5 x 10^6 zrelih T limfocita u transplantatu (93.64 ± 5.61% za kimere koje su dobile TCD BM + T limfociti vs. 1.03 ± 0.71%, $p<0.0001$ za kimere koje su dobile samo TCD BM). Usprkos postupnom povećavanju doze davateljevih T limfocita u transplantatu, promjene LC kimerizma u MHC-podudarnih kimera bile su minimalne (0.75 ± 0.33% u grupi koja je dobila samo TCD BM vs. 2.96 ± 2.48% u grupi koja je dobila TCD BM + 3 x 10^6 T limfocita). Kako bi potvrdili da opažene promjene nisu specifične samo za navedeni eksperimentalni model, eksperiment je ponovljen koristeći B6.SJL miševe kao primatelje a C3H.SW kao davatelje. Uspoređen je T stanični i DC kimerizam nakon transplantacije same TCD BM i TCD BM uz dodatak vrlo visoke doze T limfocita (5 x 10^6 stanica). Uz takvu visoku dozu T limfocita prisutnih u transplantatu došlo je do statistički značajnog porasta DC kimerizma (2.51 ± 0.43% davateljevih stanica kože za kimere koje su dobile TCD BM vs 7.67 ± 2.76% davateljevih stanica kože za kimere koje su dobile TCD BM + T limfociti), no to je i dalje vrlo mali udio davateljevih stanica u ukupnom broju LC stanica kože.

Epidermalne dendritičke stanice obnavljaju se iz progenitora prisutnih lokalno u koži. Ukoliko se njih eliminira (npr. izazivanjem lokalnog upalnog procesa ili UV zračenjem) epidermalne se dendritičke stanice obnove iz hematopoetskih stanica porijeklom iz koštane srži.[58] Kako bi bilo moguće procijeniti sposobnost hematopoetskih stanica porijekla davatelja da repopulariziraju epidermalne dendritičke stanice MHC-podudarnih kimera, a time otkloniti i moguće selektivne učinke *in vitro* kulture, C3H.SW → B6.SJL kimere tretirane su ultraljubičastim zračenjem, u dva navrata dozom od 100mJ/cm^2. Došlo je do gotovo potpune zamijene primateljevih davateljevim dendritičkim stanicama porijeklom iz koštane srži (2.51 ± 0.43% za kimere koje su dobile TCD BM bez UV zračenja vs. 87.30 ± 3.72% za kimere koje su dobile TCD BM uz UV zračenje, $p<0.001$).

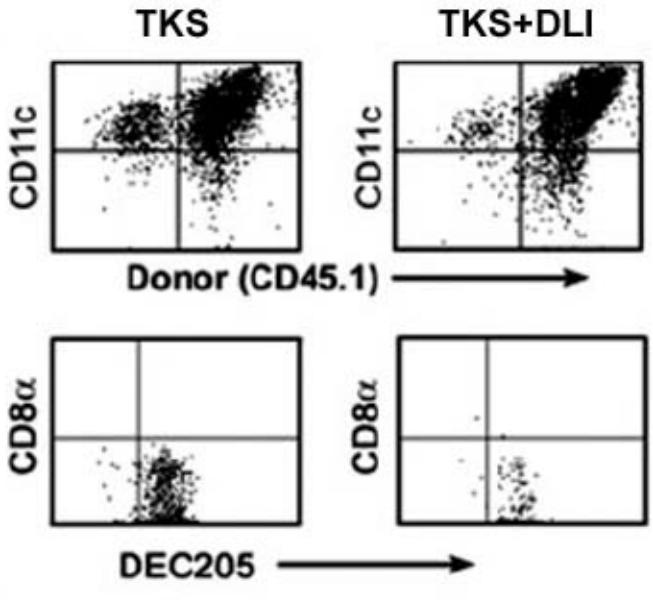
Tablica 1. Utjecaj MHC podudarnosti i doze na T stanični kimerizam limfnih čvorova i LC kimerizam kože[a]

	Davatelj (H2)	Primatelj (H2)	800-cGy TBI BM	Pročišćeni davateljevi T limfociti iv. Dan 0	N[b]	LČ celularnost ($x10^6$ ± SEM)	LČ davateljev $CD4^+$ kimerizam (medijan % ± SEM)	LČ davateljev $CD8^+$ kimerizam (medijan % ± SEM)	Uške[c] davateljev $CD11c^+$ kimerizam (medijan % ± SEM)
Eksp. 1	B6.SJL ($H2^b$)[d]	BALB/c ($H2^d$)	10^7	—	4/4	2.58 ± 10.72	67.81 ±10.29	76.34 ± 14.23	1.03 ± 0.71*
	B6.SJL ($H2^b$)[d]	BALB/c ($H2^d$)	10^7	0.5×10^6	4/4	0.67 ± 0.29	98.61 ± 0.30	94.38 ± 2.78	93.64 ± 5.61*
	B6.SJL ($H2^b$)[d]	BALB/c ($H2^d$)	10^7	1.5×10^6	1/4	0.13	93.23	98.58	92.60
	B6.SJL ($H2^b$)[d]	BALB/c ($H2^d$)	10^7	3.0×10^6	0/5	—	—	—	—
	B6.SJL ($H2^b$)[e]	C3H.SW ($H2^b$)	10^7	—	4/4	24.45 ± 4.41	80.54 ± 3.08	92.85 ± 0.64	0.75 ± 0.33
	B6.SJL ($H2^b$)[e]	C3H.SW ($H2^b$)	10^7	0.5×10^6	5/5	15.52 ± 16.83	86.88 ± 6.68	95.53 ± 2.06	1.32 ± 0.86
	B6.SJL ($H2^b$)[e]	C3H.SW ($H2^b$)	10^7	1.5×10^6	5/5	0.60 ± 0.42	99.49 ± 0.39	98.75 ± 1.09	1.68 ± 0.39
	B6.SJL ($H2^b$)[e]	C3H.SW ($H2^b$)	10^7	3.0×10^6	5/5	0.46 ± 0.26	99.68 ± 0.06	93.56 ± 4.34	2.96 ± 2.48
Eksp. 2	C3H.SW ($H2^b$)[e]	B6.SJL ($H2^b$)	10^7	—	3/3	21.21 ± 3.43	87.27 ± 0.61	72.23 ± 2.33	2.51 ± 0.43♦
	C3H.SW ($H2^b$)[e]	B6.SJL ($H2^b$)	10^7	5×10^6	3/3	0.93 ± 0.76	98.39 ± 1.44	95.11 ± 3.53	7.67 ± 2.76
Eksp. 3	C3H.SW ($H2^b$)[e,f]	B6.SJL ($H2^b$)	10^7	—	3/3	11.58 ± 1.08	—	—	87.30 v 3.72♦

[a] —, nije primjenjivo.
[b] broj transplantiranih životinja/broj živih životinja u vrijeme konačne analize.
[c] Kimerizam je određivan u epidermalnim slojevima.
[d] davatelj i primatelj se razlikuju u izražaju major i minor antigena tkivne snošljivosti.
[e] davatelj i primatelj se razlikuju u izražaju minor antigena tkivne snošljivosti.
[f] kimere su tretirane UV zračenjem ($2 \times 100 mJ/cm^2$)
*, Statistički značajno: $p < 0.0001$; ♦, $p < 0.001$.

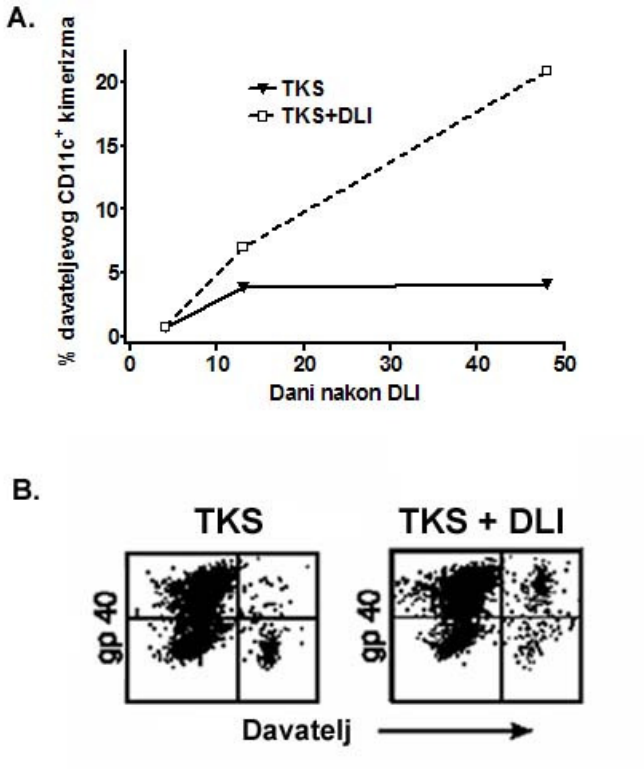
5.5. Učinak adoptivno prenesenih T limfocita (DLI) na ostatnu populaciju primateljevih epDC

Tri tjedna nakon transplantacije B6.SJL → C3H.SW kimere su dobile DLI u obliku 1.2×10^7 T limfocita davatelja. Kako bi se reducirao prijenos davateljevih DC stanica, DLI je pročišćen inkubacijom i potom prolaskom stanične suspenzije kroz kolumnu sačinjenu od najlonske vune. Dva tjedna nakon primjene DLI učinjena je analiza DC kimerizma u limfnim čvorovima i koži. Dodatkom DLI rezidualna primateljeva populacija $CD11c^+$ stanica smanjena je s 8.6% (grupa koja nije primila DLI) na 3.4% (grupa koja je primila DLI) (slika 17, gornji panel). Obzirom da je već pokazano da je ostatna populacija sačinjena od epDC, očekivano je analizom fenotipa potvrđeno da je dodatak DLI eliminirao $CD11c^+CD8\alpha^-DEC205^{high}$ populaciju porijekla primatelja (slika 17, donji panel).



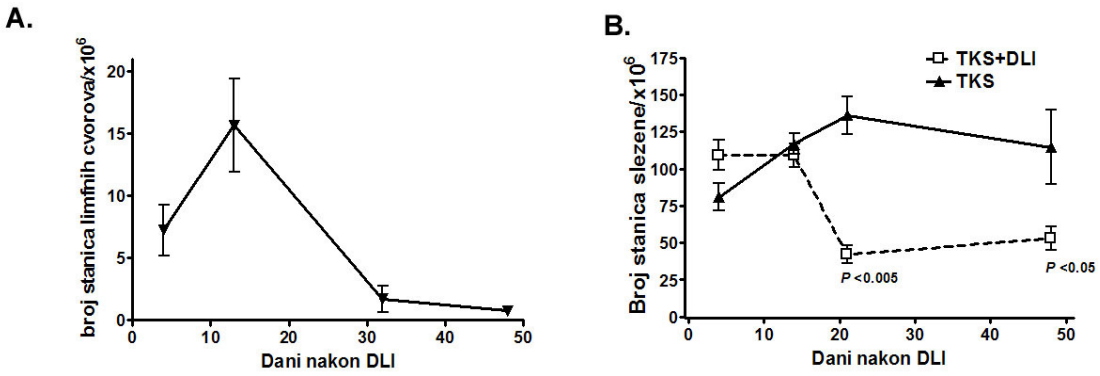
Slika 17. Adoptivan prijenos T limfocita u obliku DLI smanjuje postotak rezidualne primateljeve CD11c$^+$CD45.1$^-$ populacije, točnije CD11c$^+$CD8a$^-$DEC205^{high} populacije u limfnim čvorovima kimera. (B6.SJL → C3H.SW) su primila ništa ili 1.2 x 10^7 pročišćenih T limfocita od davatelja B6.SJL u obliku DLI. Dva tjedna kasnije sakupljeni su limfni čvorovi životinja iz obje grupe te su izolirane CD11c$^+$ stanice. Učinjena je analiza protočnom citometrijom nakon bojanja koristeći protutijela na CD11c, CD45.1, CD8a i DEC205. Gornji panel prikazuje reprezentativni uzorak obje grupe iz kojeg je vidljivo da se dodatkom DLI smanjuje CD11c$^+$CD45.1$^-$ (primateljeva) populacija stanica, dok je donji panel prikaz CD8a i DEC205 bojanja nakon što je ograda stavljena na CD11c$^+$CD45.1$^-$ populaciju prikazanu na gornjem panelu. Analizirana su 3 miša/grupi, limfni čvorovi unutar grupe su analizirani zajedno.

Dodatak DLI se također očituje i povećanim udjelom LC kože porijekla davatelja. Analizom udjela CD11c$^+$ stanica koje migriraju iz kože *ex vivo* kultiviranih epidermalnih slojeva nađeno je da nakon primjene DLI postoji viši udio CD45.1$^+$CD11c$^+$ stanica porijekla davatelja u grupi životinja koje su dobile adoptivno prenešene T limfocite (slika 18 A), što je moguće vidjeti i na slikovnom prikazu nakon bojanja stanica koje su emigrirale iz kože na CD45.1 (davatelj), i CD326 (gp40) (slika 18 B). Zabilježena zamjena primateljevih davateljevim LC ukazuje kako su primateljeve LC meta alorekativnih davateljevih T limfocita.



Slika 18. Primjena DLI dovodi do zamjene primateljevih davateljevim dendritičkim stanicama kože. A. Prikazani su rezultati analize kimerizma $CD11c^+$ stanica koje su migrirale iz kože nakon 48-satne inkubacije u prisustvu GM-CSF i TNFα. Analiza je učinjena u tri vremenske točke nakon primjene DLI (na dan +4, +13 i +48), epidermalni slojevi tri miša po grupi združeni su i analizirani protočnom citometrijom. B. Dva tjedna nakon DLI analizirane su epidermalni slojevi uški (3 miša/grupi) kimera koje su dobile odnosno nisu dobile DLI. Ograda je stavljena na $CD11c^+$ populaciju te učinjena analiza izražaja CD326 (gp40) u odnosu na CD45.1 izražaj (davatelj). Prikazan je reprezentativni plot.

U ovom eksperimentu je zabilježeno smanjenje celularnosti limfoidnih tkiva povezano sa limfohematopoetskom reakcijom transplantata protiv primatelja (LH-GVH prema engl. *lymphohematopoetic graft-versus-host*). U usporedbi s kontrolnom skupinom, kimere koje su primile DLI pokazale su smanjenu celularnost limfnih čvorova, početno 14 dana nakon primjene DLI (slika 19A). Redukcija staničnosti limfnih čvorova bila je progresivna u toj mjeri da je, do vremena završetka eksperimenta na dan 48, bilo sasvim teško naći limfne čvorove žrtvovanih životinja. Također, ukupan broj stanica bio je značajno smanjen i u slezeni, iako ne toliko drastično kao u limfnim čvorovima ($p<0.05$, slika 19B).

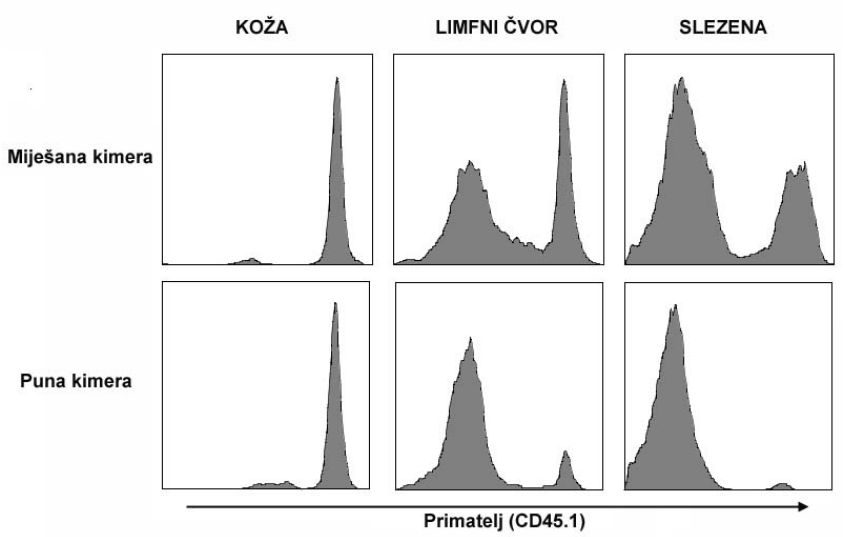


Slika 19. Primjena DLI dovodi do hipoplazije limfnih čvorova i slezene. Ukupna staničnost slezena i združenih limfnih čvorova analizirana je na dan 4, 13, 33 i 48 nakon primjene DLI. Prikazani rezultati predstavljaju združene podatke ± SEM tri nezavisna eksperimenta.

5.6. Učinak davateljevog kimerizma na jačinu DLI-posredovane GVH reaktivnosti adoptivno prenesenih T limfocita u MHC-nepodudarnom i MHC-podudarnom modelu

Mapara et al. jasno su pokazali ulogu primateljevih dendritičkih stanica u aktivaciji adoptivno primjenjenih davateljevih T limfocita kada su pokazali superioran antitumorski učinak DLI kada se primjeni u miješane kimere (koja sadrži hematopoetske stanice davatelja i primatelja) u usporedbi s antitumorskim učinkom primjene DLI u pune kimere (hematopoetske stanica samo porijekla davatelja), te njihovu sposobnost konverzije u puni davateljev kimerizam bez uzrokovanja GVHD[69], no ti su eksperimenti izvedeni u MHC-nepodudarnom modelu. Kako bi procijenili ulogu rezidualnog, prije svega DC ali i T staničnog kimerizma, konstruirali smo miješane i pune kimere u MHC-podudarnom modelu (miješane: B10.D2 + BALB/c-CD45.1 → BALB/c-CD45.1; pune B10.D2 → BALB/c-CD45.1) s različitim količinama rezidualnog primateljevog kimerizma. I u ovom modelu nam je diferencijalan izražaj CD45.1 alela omogućila da razlikujemo porijeklo dendritičkih stanica slezene, limfnih čvorova i kože. Kao što je prikazano na reprezentativnim histogramima (slika 20) u miješanih kimera je 27.5 ± 0.88% DC slezene i 42.83% ± 1.87% DC stanica limfnih čvorova bilo porijekla primatelja, dok je u punih kimera 2.3% ± 0.84% DC slezene i 10.17% ± 2.97% DC stanica limfnih čvorova bilo porijekla primatelja ($p<0.05$). Značajna razlika među kimerama nije nađena u

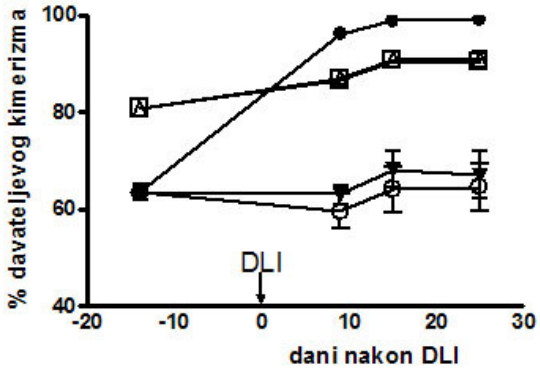
dendritičkim stanicama kože, 98.56% ± 1.19% u miješanih i 93.96% ± 2.16% u punih kimera bilo je porijekla primatelja. U analizu je uključena i kontrolna skupina miševa koji su zaprimili singenični transplantat (BALB/c → BALB/c-CD45.1), kao kontrola za razinu proliferacije stanica inducirane limfopenijom.[96]



Slika 20. Analiza DC kimerizma 8 tjedana starih kimera. Reprezentativni histogrami pokazuju odnos primateljevog kimerizma u koži, limfnim čvorovima i slezeni u miješanih kimera (10^7 stanica B10.D2 + 5 x 10^6 BALB/c CD45.1 → BALB/c-CD45.1) odnosno punih kimera. (10^7 stanica B10.D2 → BALB/c-CD45.1). Prikazani reprezentativni histogrami dva neovisna eksperimenta.

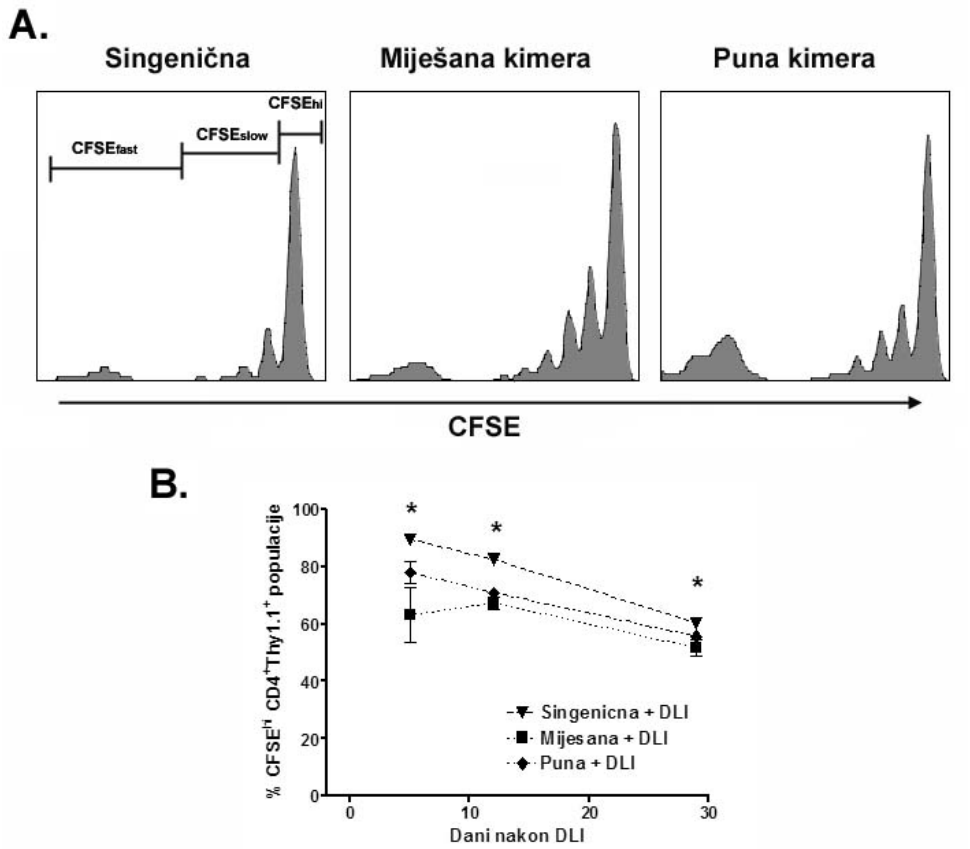
Nakon što je određen rezidualni DC i T stanični kimerizam, dodan je DLI u obliku 2 x 10^7 davateljevih splenocita, nakon čega su praćene promjene kimerizma periferne krvi, slezene i kože temeljeno na diferencijalnom izražaju CD45.1 biljega, koje su reflektirale DLI-posredovani limfohematopoetski GVH učinak. Kao izvor donorskih limfocitnih infuzija korišteni su miševi soja B10.D2-Thy1.1 za miješane i pune kimere, te BALB/c-Thy1.1 za singenične kimere. Splenociti navedenih sojeva su prije prijenosa obilježeni CFSE bojom kako bi njihova prolierativna sposobnost mogla biti pobliže praćena. Za razliku od opisanog u MHC-nepodudarnom modelu, u ovom modelu primjena DLI u miješanih kimera koje imaju visok postotak rezidualnih primateljevih DC stanica nije imala značajan učinak na davateljev T stanični kimerizam. Primjena dva puta veće doze splenocita imala je tek minimalan učinak na povećanje kimerizma u korist davatelja, dok je jedinu značajnu prednost u postizanju većeg postotka kimerizma imala primjena splenocita prethodno senzibiliziranih na antigene primatelja (slika 21). U ovom

eksperimentalnom modelu usprkos prisutnosti rezidualnog davateljevog DC kimerizma u limfnim čvorovima i koži, primjena DLI u punih kimera također nije dovela do indukcije dovoljno potentnog LH-GVH odgovora koji bi eradicirao otprilike 15% rezidualnih primateljevih T limfocita (slika 21). Isti rezultati su dobiveni u ponavljanim eksperimentima, uz praćenje dinamike kimerizma periferne krvi i do 100 dana nakon DLI.



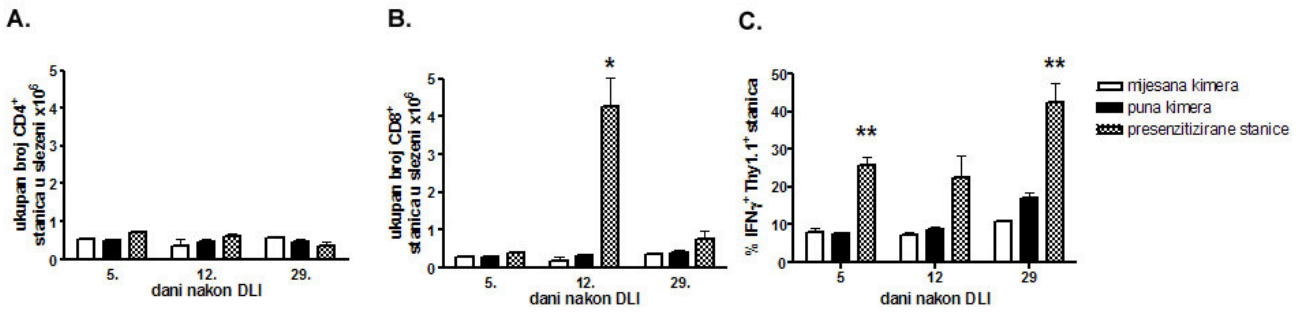
Slika 21. Analiza dinamike kimerizma periferne krvi. Osam tjedana stare miješane kimere (B10.D2 + BALB/c CD45.1 → BALB/c-CD45.1) primile su 2 x 10^7 splenocita od naivnog B10.D2 Thy1.1 miša (○, n=5), 6 x 10^7 splenocita naivnog B10.D2 Thy1.1 miša (▼, n=5); pune kimere (B10.D2 → BALB/c-CD45.1) su primile 2 x 10^7 splenocita od naivnog B10.D2 Thy1.1 miša (□, n=5), 6 x 10^7 splenocita naivnog B10.D2 Thy1.1 miša (Δ, n=5), te 2 x 10^7 splenocita od B10.D2 Thy1.1 miša presenzitiziranog na BALB/c antigene (●, n=5). Podaci izražavaju združeni $CD4^+$ i $CD8^+$ kimerizam ± SEM i predstavljaju rezultate jednog od dva neovisna eksperimenta.

U skladu s već objavljenim[97,98] nađeno je da adoptivno preneseni T limfociti, temeljeno na CFSE vizualiziranoj proliferativnoj aktivnosti, mogu biti podijeljeni u tri populacije: neproliferativne ($CFSE^{high}$), sporo proliferativne ($CFSE^{slow}$) i brzoproliferirajuće ($CFSE^{fast}$, slika 22 A). Ukupna kinetike podjele $CD4^+$ i $CD8^+$ stanica porijeklom iz DLI temeljeno na postotku neproliferiranih ($CFSE^{hi}$) stanica nije se statistički razlikovala između miješanih i punih kimera (slika 22 B), no u obje vrste kimera je bila statistički brža u usporedbi sa singeničnim kimerama ($p<0.05$) (slika 22 B) .



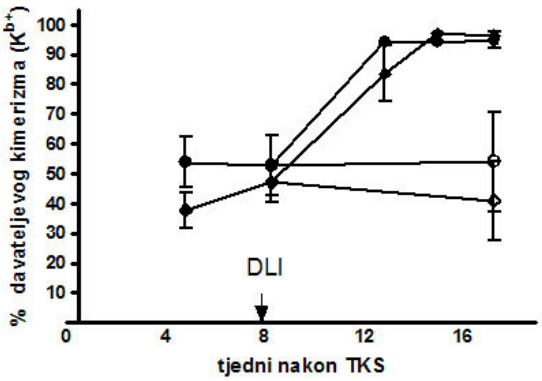
Slika 22. Analiza dinamike smanjenja CFSE^{hi} populacije porijeklom iz DLI ovisno o stupnju tkivne snošljivosti između davatelja i primatelja. Osam tjedana stare miješane kimere (B10.D2 + BALB/c-CD45.1 → BALB/c-CD45.1), pune kimere (B10.D2 → BALB/c-CD45.1), odnosno singenične kimere (BALB/c → BALB/c) primile su 2 x 10^7 splenocita od naivnog B10.D2-Thy1.1 (singenične od BALB/c-Thy 1.1) miša koje su prethodno obilježene CFSE bojom. Adoptivno prenesene stanice analizirane su protočnom citometrijom koristeći anti-Thy1.1, anti-CD4 i anti-CD8 protutijela. A. Reprezentativni CFSE profili CD8$^+$ stanica porijeklom iz DLI (dan +29 nakon DLI) i ograde koje su korištene u razdvajanju *in vivo* neproliferiranih CFSE^{hi} od sporo-proliferirajućih CFSE^{slow} i brzo-proliferirajućih CFSE^{fast} T limfocita DLI. B. CFSE dilucija CD4$^+$ stanica porijeklom od DLI u slezeni u 8 tjedana stare pune (♦) i miješane (■) kimere na dane +5, +14 i +28 nakon DLI u odnosu na diluciju T limfocita nakon adoptivnog prijenosa u singenične kimere (▼). Podaci predstavalju medijan postotka CFSE^{high}CD4$^+$Thy1.1$^+$ stanica ± SEM i predstavljaju jedan od dva novisna eksperimenta (n = 3-4 miša/grupi/vremenskoj točki).
* P<0.05 ♦ vs.▼

U slijedećoj skupini eksperimenata analiziran je ekspanzivni potencijal CD4$^+$ i CD8$^+$ stanica porijekom iz DLI te se našlo da nije bilo statistički značajne razlike između miješanih i punih kimera (slika 23 A i B), jedino je jači ekspanzivni potencijal, a ujedno i višu razinu stvaranja IFNγ (slika 23 C) pokazivala skupina miješanih kimera koja je dobila prethodno senzibilizirane stanice.



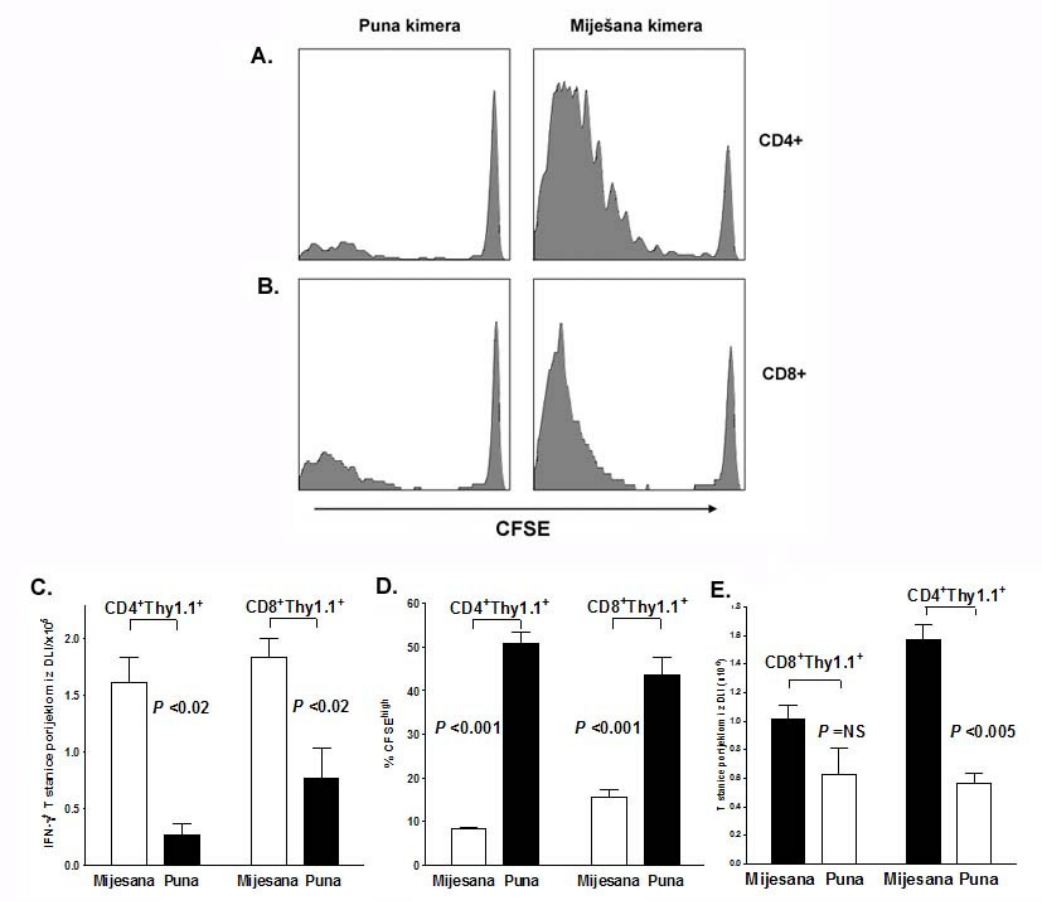
Slika 23. Analiza ekspanzivnog i efektorskog potencijala stanica porijeklom iz DLI. U *$CFSE^{high}$ populacije porijeklom iz DLI ovisno o stupnju tkivne snošljivosti između davatelja i primatelja.* Osam tjedana stare miješane kimere (B10.D2 + BALB/c-CD45.1 → BALB/c-CD45.1) primile su 2 x 10^7 splenocita od naivnog B10.D2-Thy1.1 miša dok su pune kimere (B10.D2 → BALB/c-CD45.1) primile 2 x 10^7 stanica od naivnog B10.D2 Thy1.1 ili miša koji je prethodno presenzitiziran na antigene primatelja. Sve stanice su prije primjene obilježene CFSE bojom. Protočnom citometrijom je praćen ukupan broj Thy 1.1 $CD4^+$ (A) i $CD8^+$ (B) stanica slezene na dane +5, +12 i +29 nakon primjene DLI. Na iste dana intracelularnim bojanjem na IFNγ određen je i postotak $Thy1.1^+$ stanica koje proizvode IFNγ (C). * P<0.01 ▓ vs. □ , ▓ vs. ■, ** P<0.01 dan 5 ▓ vs. □ , ▓ vs. ■, dan 29 ▓ vs. □ , ▓ vs. ■, P<0.05 □ vs. ■.

Sličan eksperiment je postavljen i u MHC-nepodudarnom modelu, u cilju procjene utjecaja zaostale populacije primateljevih DC na jačinu LH-GVH odgovora. Konstruirane su miješana kimera (B6 + BALB/c → BALB/c) i puna kimera (B6 → BALB/c). U ovom modelu dodatkom 2 x 10^7 splenocita davatelja postignut je vrlo brzo potpuni davateljev T stanični kimerizam (slika 24). [69,72]



Slika 24. Analiza dinamike davateljevog kimerizma u MHC-nepodudarne miješane kimere nakon dodatka DLI. Osam tjedana nakon MHC-nepodudarne transplantacije (B6 + BALB/c → BALB/c) kimere su primile ništa (prazni simboli) ili DLI u obliku 2 x 10^7 splenocita od davatelja B6 miša (ispunjeni simboli). Promatrane su promjene u $CD4^+$ (◊,♦) i $CD8^+$ (○,●) staničnom kimrizmu u perifernoj krvi pomoću protočne citometrije nakon bojanja stanica s anti-H2b, anti-CD4 i anti-CD8 specifičnim protutijelima. Podaci su predstavljeni kao medijan postotka kimerizma ± SEM (5 miševa/grupi)

Kako bismo omogućili razlikovanje T stanične populacije iz DLI, kao davatelji su korišteni miševi soja B6.PL-Thy1a koji se razlikuju i od primatelja i davatelja koštane srži prema izražaju Thy1.1 (CD90.1) biljega na T limfocitima, a kako bismo mogli pratiti kinetiku diobe stanica porijekla DLI iste su obilježene fluorescentnom bojom CFSE. Na dane 5 i 15 nakon adoptivnog prijenosa životinje su žrtvovane i procijenjena je kinetika proliferacije stanica porijeklom iz DLI kao i njihova akumulacija u stanicama slezene, te produkcija IFNγ. Pet dana nakon prijenosa, ukupni postotak stanica koje se još nisu podijelile bio je značajno manji u grupi miješanih kimera nego u grupi punih kimera ($p<0.01$, slika 25 A i B). Ista situacija je bila prisutna i 15 dana nakon prijenosa (slika 25 D). U skladu s tim, ukupan broj $CD4^+$ T limfocita porijeklom iz DLI prisutan u slezeni bio je značajno viši u miješanih kimera u obje točke, kao i $CD4^+$ stanice koje su producirale IFNγ (slika 25 C i E), dok je $Thy1.1^+CD8^+$ populacija pokazala značajno veću proliferaciju tek na dan 15 nakon DLI, a njihova je produkcija IFNγ bila viša u obje promatrane vremenske točke.

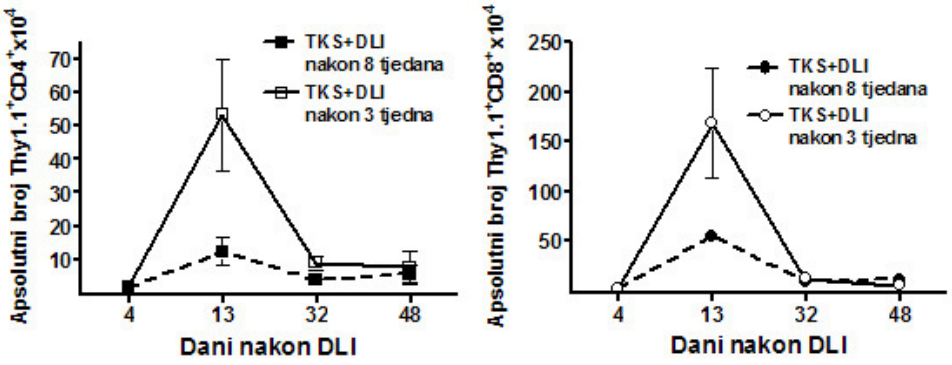


Slika 25. Nivo rezidualnih primateljevih dendritičkih stanica utječe na LH-GVH odgovor posredovan DLI u MHC-nepodudarnih kimera. Osam tjedana nakon MHC-nepodudarne transplantacije 2 x 10^7 CFSE obilježenih splenocita od B6 Thy1.1 miša adoptivno su prenesene B6+BALB/c → BALB/c miješanim, odnosno B6 → BALB/c punim kimerama. A-B Prikazani su reprezentativni histogrami CFSE, ograda stavljena na $CD4^+Thy1.1^+$ (A) odnosno $CD8^+Thy1.1^+$ (B) populaciju. Analiza učinjena 5 dana nakon adoptivnog prijenosa. C. Apsolutni brojevi T limfocita porijeklom iz DLI koje produciraju IFNγ (nakon kratke *in vitro* stimulacije) u miješanih i punih kimera 5. dan nakon prijenosa DLI. D. Postotak $CD4^+$ i $CD8^+$ stanica unutar ograde $CFSE^{high}$ koje su porijeklom iz DLI E. Ukupan broj $CD4^+$ i $CD8^+$ $Thy1.1^+$ pet dana nakon adoptivnog prijenosa stanica. Pokazani podaci predstavljaju jedan od tri neovisno učinjena eksperimenta (medijan ± SEM, n=3-4 miša/grupi.

5.7. Učinak aktivacije antigen predočnih stanica na GVH reaktivnost adoptivno prenesenih T limfocita

Adoptivno preneseni T limfociti, odnosno stanice DLI, aktiviraju se kod susreta sa dendritičkim stanicama u limfnom čvoru. Važnu ulogu u aktivaciji svakako imaju i perzistentne primateljeve LC stanice koje cirkuliraju iz kože u limfni čvor. No, u kojoj mjeri ta ipak malena rezudualna populacija u limfnom čvoru može utjecati na jačinu

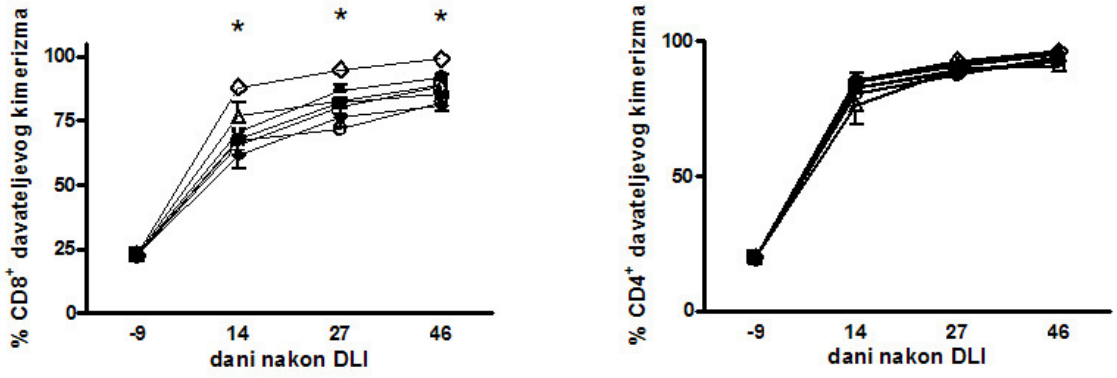
aktivacije DLI i jačinu aloreaktivne GVH reakcije? Ukoliko imaju jasnu ulogu, njihova deplecija prije dodavanja DLI trebala bi smanjiti GVH reakciju, mjereno ekspanzivnim potencijalom prenesenih limfocita. S druge strane, njihova aktivacija i pojačana migracija uzrokovat će pojačanje GVH reakcije. Kako bismo testirali prvu premisu planirano je kimere ozračiti UV zrakama, što pokazano uzrokuje eliminaciju primateljevih DC progenitorskih stanica kože i uzrokuje zamjenu dendritičkih stanica kože u one porijekla davatelja. No pokazano je da je za zamjenu dendritičkih stanica potrebno do 60 dana. [55,68] Kada smo infuziju 1.2 x 10^7 davateljevih limfocita primjenili MHC-podudarnim kimerma nakon 8 tjedana, ekspanzija $CD4^+$ i $CD8^+$ stanice porijeklom iz DLI bila je značajno manja u usporedbi s primjenom DLI nakon 3 tjedna (slika 26). Obzirom na tako neznatnu ekspanziju nakon osam tjedana u prisutnosti primateljevih DC, daljnje smanjenje razine ekspanzije koje se očekuje uklanjanjem dendritičkih stanica nakon UV zračenja bilo bi nezamjetno. Obzirom na posebnosti ovog modela nismo našli alternativnu metodu da dokažemo postavljenu premisu.



Slika 26. Utjecaj vremena adoptivnog prijenosa T limfocita (DLI) na njihovu sudbinu. Tri (prazni simboli) i osam (ispunjeni simboli) tjedana stare B6.SJL → C3H.SW kimere dobile su DLI u obliku 2 x 10^7 pročišćenih T limfocita od davatelja B6.PL $Thy1.1^+$ miša. Klonalna ekspanzija $Thy1.1^+CD4^+$ (□,■) i $Thy1.1^+CD8^+$ (○,●) stanica porijeklom od DLI u slezeni praćena je kroz vrijeme koristeći protočnu citometriju i bojanje anti-CD4, anti-CD8 i anti-Thy1.1 protutijelima. Analizirano je 3 miša/grupi/vremenskoj točki.

Druga premisa, ujedno i hipoteza ove disertacije postavlja da je aktivacijom perzistirajućih dendritičkih stanica primatelja moguće pospješiti alogeničnu reakciju izazvanu adoptivno prenesenim T limfocitima. Ispitana su dva različita pristupa: primjena *ex vivo* maturiranih dendritičkih stanica, porijekla davatelja ili od primatelja u trenutku transplantacije, odnosno aktivacija *in vivo* postojećih antigen predočnih stanica.

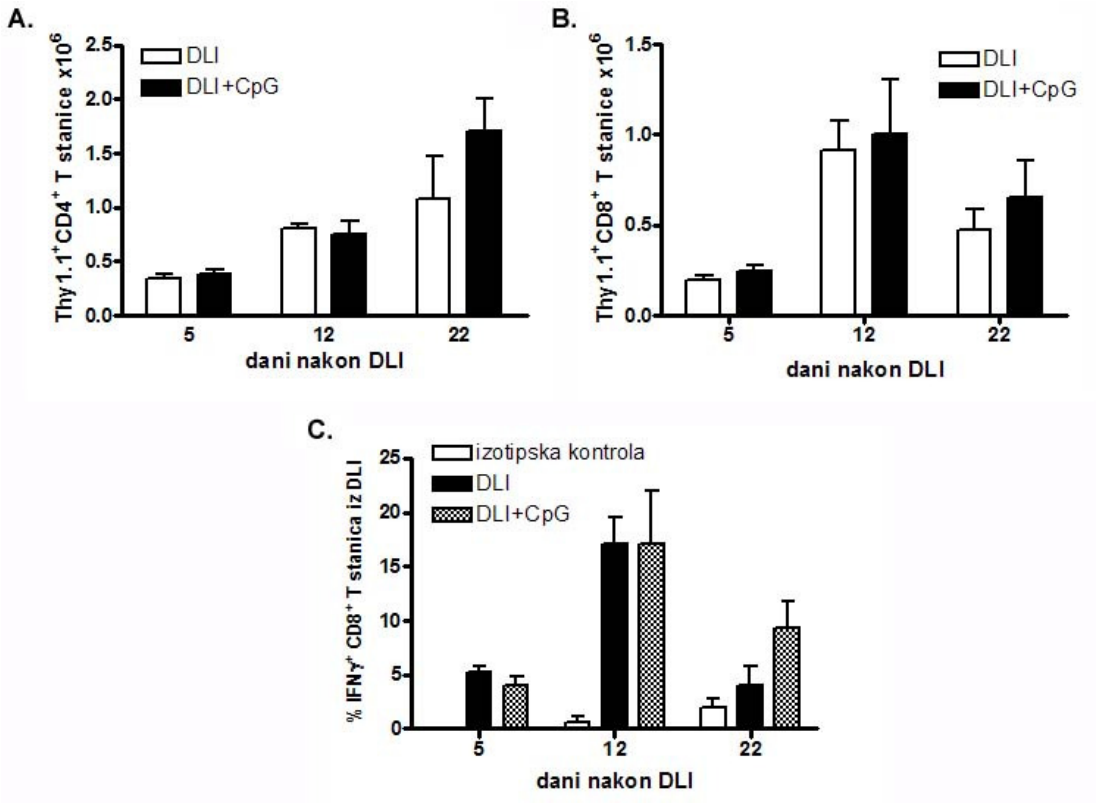
Postavljen je eksperiment u kojem je 4 tjedna nakon transplantacije C3H.SW → BL6.SJL kimerama primjenjen DLI u obliku 2 x 10^7 spenocita C3H.SW miša (□), DLI uz 2 injekcije *ex vivo* generiranih primateljevih (○) odnosno davateljevih (Δ) dendritičkih stanica administriranih intraperitonealno (ip) (na dan 0 i +7 primjenjeno je 1.5 x 10^6 dendritičkih stanica, što odgovara količini koju dobijemo izdvajanjem dendritičkih stanica jedne slezene), ili DLI uz stimulatorni CpG 1826 oligodeoksinukleotid (ODN, ◊) (150 μg/mišu ip na dane 0, +3 i +7). Imunostimulatorni CpG ODN aktiviraju DC stimulacijom TLR receptora 9 (TLR9), potiču proizvodnju IL-12 od strane DC te pomažu indukciju citotoksičnih stanica koje proizvode IFNγ, te moguće preveniraju preranu smrt adoptivno prenesenih T limfocita.[73,99-102] Uključene su i tri kontrolne skupine: miševi koji nisu dobili DLI (♦), miševi koji su dobili ODN 1982 (●) koji nema imunostimulatorno djelovanje, te miševi koji su dobili samo CpG stimulatorni ODN bez DLI (*). Nakon transplantacije praćen je kimerizam $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocita periferne krvi tijekom vremena. Administracijom kako primateljevih tako i davateljevih stanica nije dobivena bolja efektorska funkcija, mjereno konverzijom u puni davateljev kimerizam, poglavito u $CD8^+$ frakciji (slika 27). Primjenom CpG 1826 (ali ne i kontrolnog CpG 1982) potpomognuta je bolja konverzija u puni davateljev $CD8^+$ T stanični kimerizam u usporedbi s drugim grupama ($p<0.001$, slika 27), sugerirajući da je na GVH učinak stanica prenesenih kao DLI moguće utjecati *in vivo* aktivacijom dendritičkih stanica.



Slika 27. In vivo aktivacija antigen predočnih stanica agonistima TLR ali ne i prijenos ex vivo aktiviranih dendritičkih stanica potpomaže funkciju adoptivno prenesenih T limfocita. Četiri tjedna stare C3H.SW → B6.SJL kimere (transplantirane nemanipuliranim stanicama koštane srži; n= 8-10miševa/grupi) primile su ništa (♦), samo CpG1826 ODN (150 μg/mišu ip na dane 0, +3 i +7; *), 2 x 10^7 splenocita od C3H.SW miša (□), 2 x 10^7 splenocita od C3H.SW miša + 2 injekcije 1.5 x 10^6 ex vivo generiranih iz koštane srži primateljevih (○) ili davateljevih (Δ) dendritičkih stanica primjenjenih intraperitoenalno na dane 0 i +7, 2 x 10^7 splenocita od C3H.SW miša +

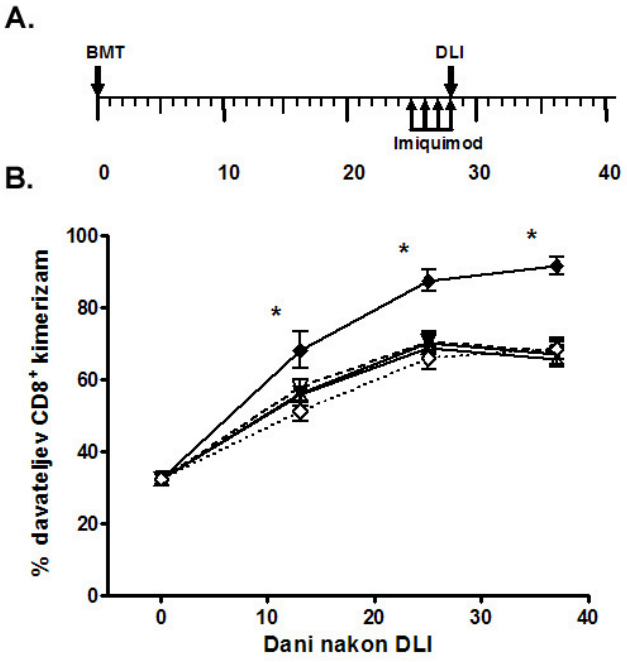
CpG1826 ODN (150 µg/mišu ip na dane 0, +3 i +7; ◊), ili 2 x 10^7 splenocita od C3H.SW miša + CpG1982 ODN (ista doza i raspored primjene kao i imunostimulatornog CpG ODN; ●). Promjene davateljevog $CD8^+$ i $CD4^+$ kimerizma mjerene su longitudinalno u perifernoj krvi (medijan ± SEM). * P< 0.001 za sve grupe vs. DLI+CpG1826 ODN. Niske razine davateljevog T staničnog kimerizma prije adoptivnog prijenosa predstavljaju vrijeme kašnjenja potrebno da se dostigne ekvilibrijum davateljevog kimerizma u perifernoj krvi versus slezene.

Primjenom T limfocita koji se od stanica koštane srži davatelja razlikuju samo u izražaju Thy1.1 biljega bilo je moguće odrediti ekspanziju $CD4^+$ i $CD8^+$ populacije porijekla DLI. Kao što je prikazano na slikama 28 A i B, nije došlo do značajnije ekpanzije stanica porijeklom iz DLI ukoliko se usporedi skupina koja je dobila samo DLI i ona koja je dobila DLI i imunostimulatorni ODN; no određivanjem količine IFNγ koju stanice porijekla DLI stvaraju, vidljivo je značajno više stvaranje IFNγ od strane $CD8^+$ stanica 22 dana nakon DLI, što govori u prilog boljoj aktivaciji stanica i jače izraženoj efektorskoj funkciji, odnosno indirektno boljoj LH-GVH reakciji (slika 28 C).



Slika 28. Istovremena primjena CpG ODN uz DLI ne utječe na ekpanzivni potencijal T limfocita porijekla DLI ali utječe na njihovu sposobnost sekrecije IFNγ. Tijekom gore opisanog ekperimenta odredili smo broj splenocita porijeklom iz DLI u tri vremenske točke u grupi koja je dobila samo DLI i grupi koja je dobila DLI + CpG. Analizirana su 3 miša/grupi/vremenskoj točki.

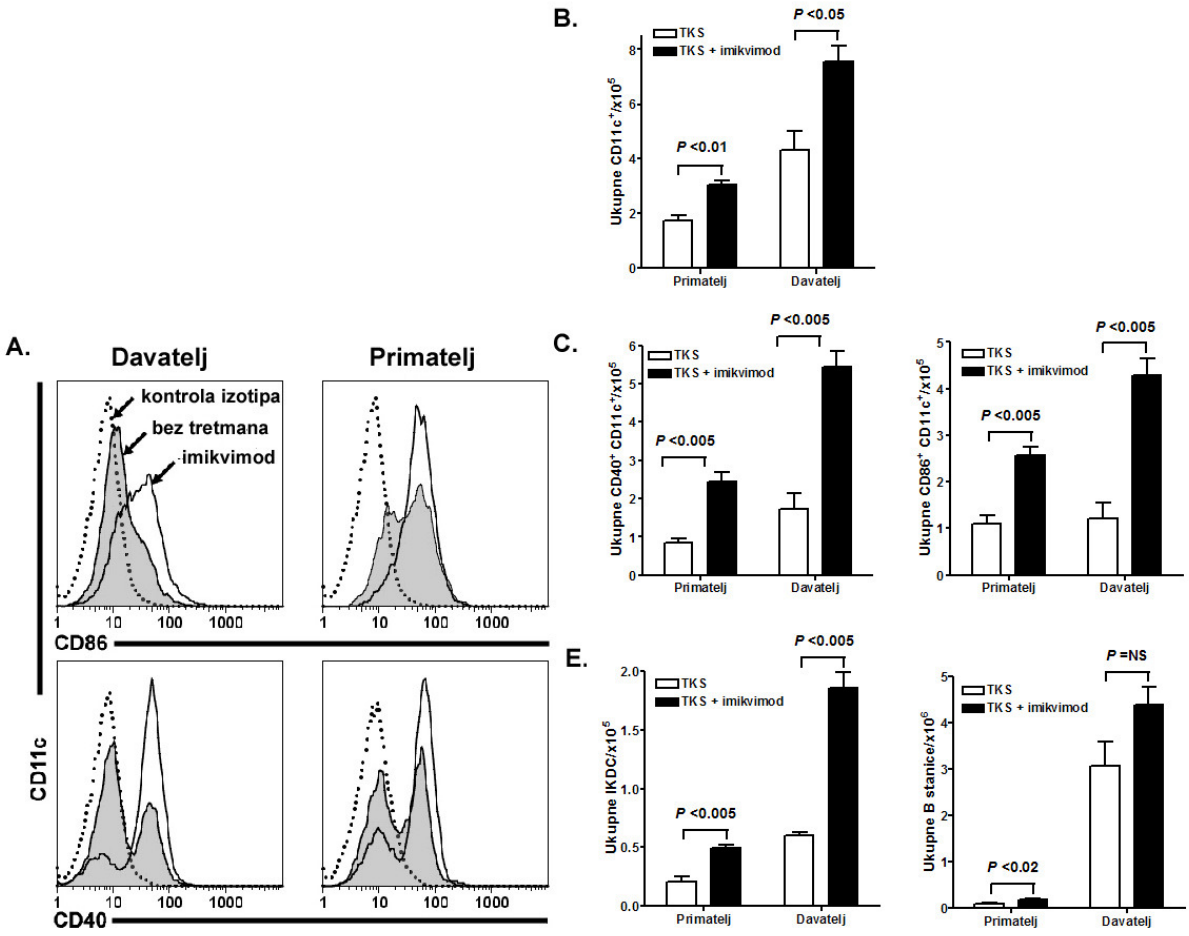
Kako bi ispitali može li se isti učinak postići upotrebom drugih TLR liganda, upotrijebljen je imikvimod, sintetički ligand TLR7 receptora. Pretpostavlja se da imikvimod djeluje potičući sekreciju IFNγ, TNFα, IL-6 i IL-12 u koži. [103,104] Ovi lokalno generirani citokini potpomažu emigraciju kožnih DC (odnosno u našem modelu primateljevih DC) i usmjeravaju reakciju prema Th1 T-staničnom odgovoru, generirajući tako citotoksične efektore. Imikvimod je primjenjen na obrijanu kožu životinja kroz tri dana prije i na sam dan adoptivnog prijenosa limfocita. Učinak imikvimoda prikazan je na slici 29. Konverzija u potpuni davateljev kimerizam dogodila se samo u skupini koja je tretirana imikvimodom ($p<0.001$).



Slika 29. Istovremena primjena imikvimoda uz DLI utječe na ekspanzivni potencijal $CD8^+$ T limfocita porijekla DLI. A. Eksperimentalna shema. B. Četiri tjedna stare C3H.SW → BL6.SJL kimere (transplantirane nemanipuliranim stanicama koštane srži; n= 8-10 miševa/grupi) primile su ništa (Δ), tretirane su imikvimodom (▼), primile su 2 x 10^7 splenocita od C3H.SW miša + 2 x 10^6 ex vivo generiranih iz koštane srži primatelja (◊), ili su pretretirane imikvimodom (♦), odnosno vehiklom (○) nakon čega su primile DLI u formi 2 x 10^7 splenocita od C3H.SW miša. Promjene davateljevog $CD8^+$ kimerizma su određene serijski iz periferne krvi i predstavljene kao medijan postotka davateljevog kimerizma ± SEM. Eksperiment je ponovljen tri puta. * P<0,001 za sve grupe versus grupe koja je dobila DLI + imikvimod.

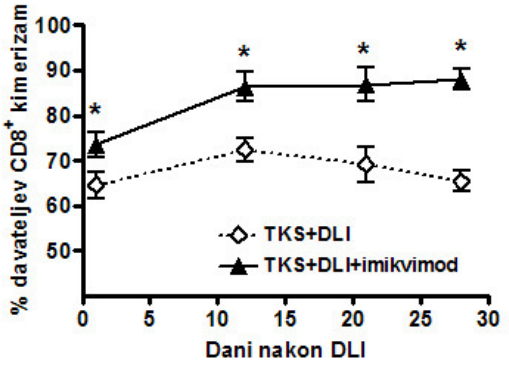
U pokušaju točnijeg određivanja učinka imikvimoda na dendritičke stanice, analizirane su $CD11c^+$ stanice iz potkožnih limfnih čvorova. U kimera koje su tretirane

imikvimodom nađena je značajno veća ukupna celularnost limfnih čvorova, te broj davateljevih i primateljevih $CD11c^+$ stanica (slika 30 B). DC porijekla primatelja su pokazivale višu razinu izražaja CD40 i CD86 kostimulatornih molekula, u skladu s prethodno pokazanim, no primjenom imikvimoda je razina izražaja CD40 i CD86 molekula značajno porasla i u primateljevih i u davateljevih DC (slika 30 A; $p<0.05$ bez primjene vs. primjena imikvimoda, mjereno srednjom vrijednosti intenziteta fluoresencije za CD40 i CD86). Isto pokazuje i analiza ukupnog broja $CD11c^+$ stanica koji imaju «zreli» fenotip ($p<0.005$ za CD40 i CD86, slika 30 C i D). Učinak imikvimoda nije bio ograničen samo na dendritičke stanice, obzirom da je njegovom primjenom uvećan broj ubilačkih DC koje stvaraju IFN, (IKDC prema *engl*. interferon-producing killer dendritic cells)[105] te primateljevih B stanica koje su pojačano migrirale u limfne čvorove (slika 30 E i F).



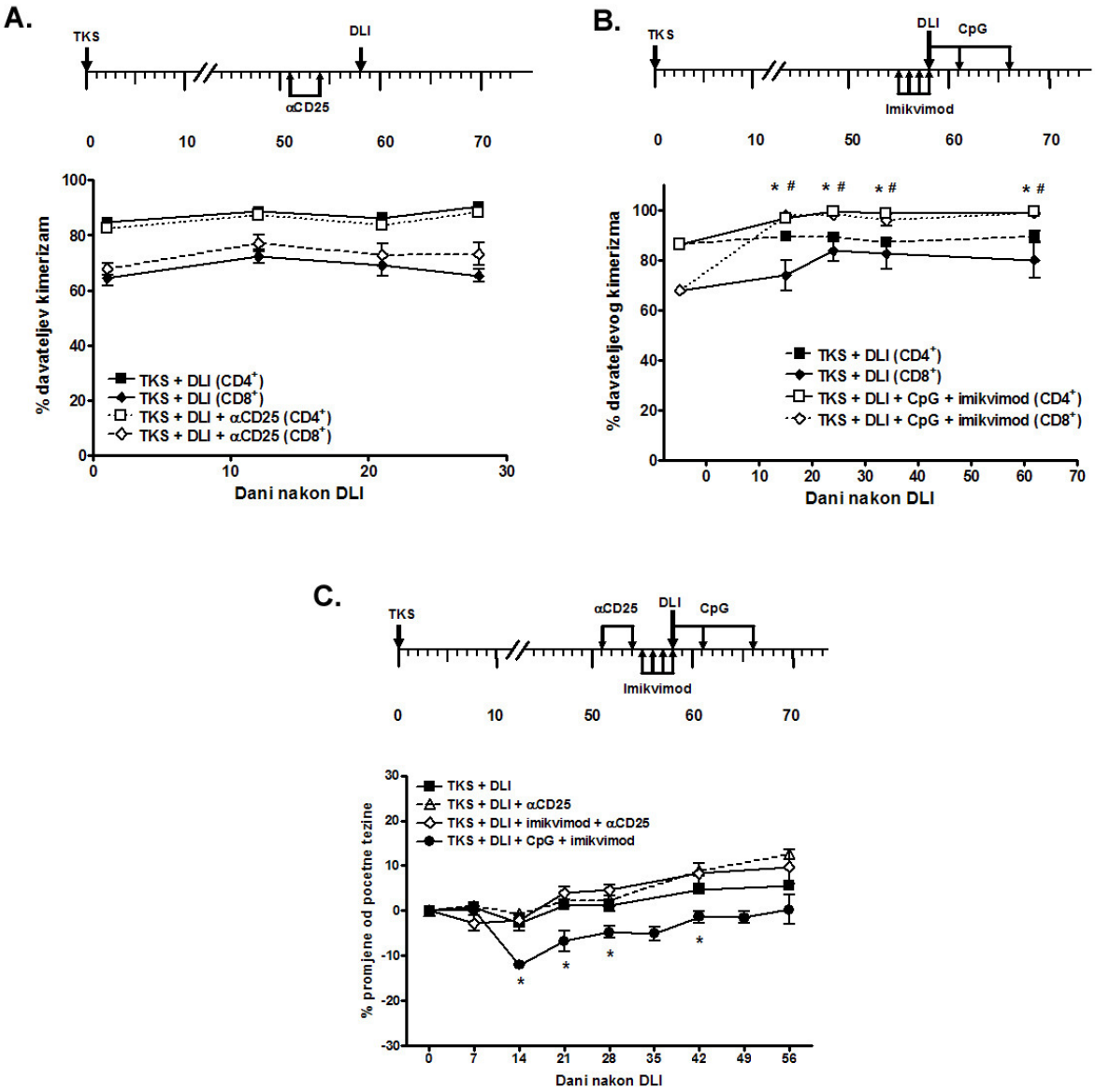
Slika 30. Istovremena primjena imikvimoda uz DLI utječe ukupan broj CD11c$^+$ stanica te razinu izražaja kostimulacijskih molekula na dendritičkim stanicama. Eksperimentalna shema je opisana gore. A. Izražaj CD40 i CD86 biljega na površini CD11c$^+$ stanica porijekla davatelja odnosno primatelja. Analizirana je CD11c$^+$ pročišćena populacija dobivena iz limfnih čvorova kimera koristeći anti-CD45.1, anti-CD11c, anti-CD40 i anti-CD86 specifično protutijelo. Prikazani podaci predstavljaju izražaj CD40 i CD86 na davateljevim odnosno primateljevim CD11c$^+$ stanicama kod miševa tretiranih imikvimodom (puna linija), te onih koji nisu tretirani imikvimodom (ispunjeni histogram). Kontrola izotipa prikazana je kao iscrtkana krivulja. C-D. Ukupan broj davateljevih i primateljevih CD11c$^+$ stanica koje izražavaju CD40 i CD86. Vrijednosti predstavljaju medijan ± SEM za združene limfne čvorove jedne kimere (n = 3-4 miša/grupi). E-F. Porijeklo i ukupan broj IKDC i B stanica u limfnim čvorovima kimera tretiranih i netretiranih imikvimodom određen je protočnom citometrijom koristeći anti-CD11c, anti-CD45.1, anti-CD49b i anti-B220 specifično protutijelo. Vrijednosti predstavljaju medijan ± SEM (N= 3-4 miša/grupi).

U životinja u kojih su DC aktivirane primjenom imikvimoda prije injiciranja DLI postignut je bolji no ipak ne željeni i potrebni 100%-tni kimerizam. Ukoliko se isti način stimulacije uz DLI imikvimodom i CpG ODN primjeni kod starijih kimera, odnosno kod kimera u kojih je od vremena transplantacije prošlo 8 tjedana, što je model reprezentativan za kasni posttransplantacijski period, učinak stimulacije je još manji, iako bi upravo aktivacijom TLR trebao biti poništen učinak vremena na daljnje smanjenje bazalne aktivacije dendritičkih stanica primatelja (slika 10). Primjena imikvimoda 8 tjedana starim kimerama ne postiže 100% kimerizam mjereno CD8$^+$ kimerizmom periferne krvi (slika 31).



Slika 31. Imikvimod pozitivno na davateljev CD8$^+$ kimerizam ali je njegov utjecaj ovisan o vremenu primjene DLI. Osam tjedana stare kimere C3H.SW → B6.SJL tretirane su imikvimodom ili vehiklom kroz tri dana prije adoptivnog prijenosa T limfocita. Promjene davateljevog CD8$^+$ kimerizma su mjerene longitudinalno u perifernoj krvi temelje diferencijalnog izražaja CD229.1 biljega na davateljevim (CD229.1 $^+$) i primateljevim (CD229.1 $^-$) T limfocitima . * $P < 0.05$.

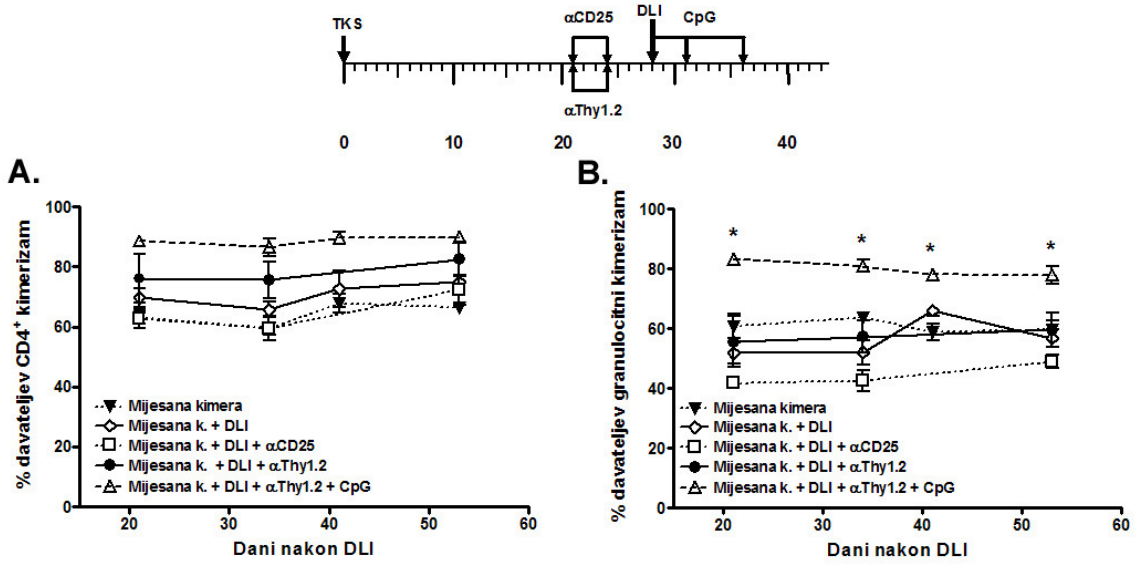
Iz navedenog je proizašla hipoteza da je smanjena DLI-posredovana aloreaktivnost u kimera starih 8 tjedana usprkos administraciji TLR7 ili 9 liganda rezultat ili u toj točki u vremenu već razvijene imunoregulatorne mreže ili različitog APC statusa. Studije su pokazale da $CD4^+CD25^+$ stanice predstavljaju najpotentnije regulatorne T limfocite (T_{reg}) u eksperimentalnom MHC-nepodudarnom modelu.[106,107] Kako bi istražili njihovu ulogu u ovom modelu, u 8 tjedana starih C3H.SW → BL6.SJL kimera primjenjen je DLI sa ili bez dodatka anti-CD25 protutijela. Anti-CD25 protutijelo kratkotrajno smanjuje $CD4^+CD25^+$ staničnu populaciju (4 do 5 puta). Kontrolna skupina nije primila anti-CD25 protutijelo. Primjenom anti-CD25 protutijela nije se značajnije mijenjao kimerizam u ovom modelu (slika 32 A). Istovremenom stimulacijom s TLR7 i TLR9 postignuta je konverzija u kompletni davateljev T stanični kimerizam ($P<0.005$ za $CD4^+$ i $P<0.05$ za $CD8^+$ stanice, slika 32 B). Ovi rezultati čvrsto podupiru tezu da aktivacijski status DC koje susreću adoptivno prenešene T limfocite temeljito utječe na LH-GVH odgovore posredovane DLI, te da je u starijih kimera, kao što su ove od 8 tjedana, potreban snažniji aktivacijski stimulus. Usprkos prolaznom gubitku na težini ovako tretiranih kimera, nisu opaženi drugi znakovi GVHD (slika 32 C).



Slika 32. Sinergističko djelovanje na TLR7 i TLR9 pojačava GVH reaktivnost adoptivno prenesenih T limfocita u 8 tjedana starih kimera. A. Osam tjedana stare C3H.SW → B6.SJL pune kimere primile su ništa ili dvije doze anti-CD25 monoklonskog protutijela na dana -7 i -4 prije adoptivnog prijenosa DLI. Promjene davateljevog T staničnog kimerizma su mjerene longitudinalno u perifernoj krvi temeljem diferencijalnog izražaja CD229.1 biljega na davateljevim ($CD229.1^+$) i primateljevim ($CD229.1^-$) T limfocitima. Podaci predstavljaju medijan davateljevog kimerizma ± SEM (n=8-10 miševa/grupi/vremenskoj točki). P = NS. B. Osam tjedana stare C3H.SW → B6.SJL pune kimere primile DLI u formi 2 x 10^7 C3H.SW splenocita sa ili bez predtretmana imikvimodom nakon kojeg je slijedila primjena CpG1826 ODN (kao na shemi). T stanični kimerizam bio je određivan serijski iz periferne krvi temeljem diferencijalnog izražaja CD229.1 biljega. Podaci su predstavljeni kao medijan postotka davateljevog kimerizma ± SEM (n=8-10 miševa/grupi/vremenskoj točki). # $P < 0.005$ za $CD4^+$ i * $P < 0.05$ za $CD8^+$ stanice u grupi TKS + DLI vs. TKS + DLI + CpG + imikvimod. C. Promjene tjelesne težine punih kimera koje su dobile DLI (■) ili su bile tretirane s anti-CD25 mAb (Δ), imikvimodom +

antiCD25 mAb (◊) ili imikvimodom + CpG1826 (●). * $P < 0.05$ označava promjenu na težini za više od 10% za ● vs sve ostale grupe u naznačenim vremenskim točkama.

Slijedeće je pokušano odrediti utječe li *in vivo* aktivacija DC na DLI-posredovanu GVH reaktivnost u MHC-podudarnih miješanih kimera. U tu svrhu u 4 tjedna stare B10.D2 + BALB/c → BALB/c kimere su dobile DLI ili DLI uz stimulaciju CpG1826 ODN, kao što je gore opisano. U suprotnosti rezultatima kod 4 tjedna starih punih kimera (vidi gore), koadministracija CpG1826 s DLI nije bila uspješna u pojačavanju LH-GVH reaktivnosti T limfocita primjenjenih kao DLI, a niti administracija anti-CD25 monoklonskog protutijela nije bila uspješna u pojačavanju LH-GVH reakcije, mjereno promjenama u $CD4^+$ i granulocitnom kimerizmu (slika 33). Obzirom na to da je glavna razlika između dva modela (miješani i puni kimerizam) količina rezidualnog T staničnog kimerizma, odlučeno je pokušati smanjiti udio primateljevih T limocita u perifernoj cirkulaciji *in vivo,* te je u tu svrhu primijenjeno anti-Thy1.2 protutijelo na dane -7 i -4 prije primjene DLI, odnosno anti-Thy1.2 protutijelo u kombinaciji s CpG stimulatornim ODN. Sam tretman anti-Thy1.2 protutijelom doveo je do povećanja kimerizma do ~82% T-staničnog kimerizma, no tek je kombinacijom upotrebe protutijela protiv rezidualnih primateljevih T limfocita i stimulatornih CpG ODN postignut značajan porast u granulocitnom kimerizmu (slika 33 B).



Slika 33. Sinergističko djelovanje deplecije rezidualnih primateljevih T limfocita i TLR9 aktivacije na GVH reaktivnost adoptivno prenesenih T limfocita u 8 tjedana starih kimera. A. Četiri tjedna stare B10.D2 Thy1.1 + BALB/c-CD45.1 ($Thy1.1^-$) → BALB/c miješane kimere

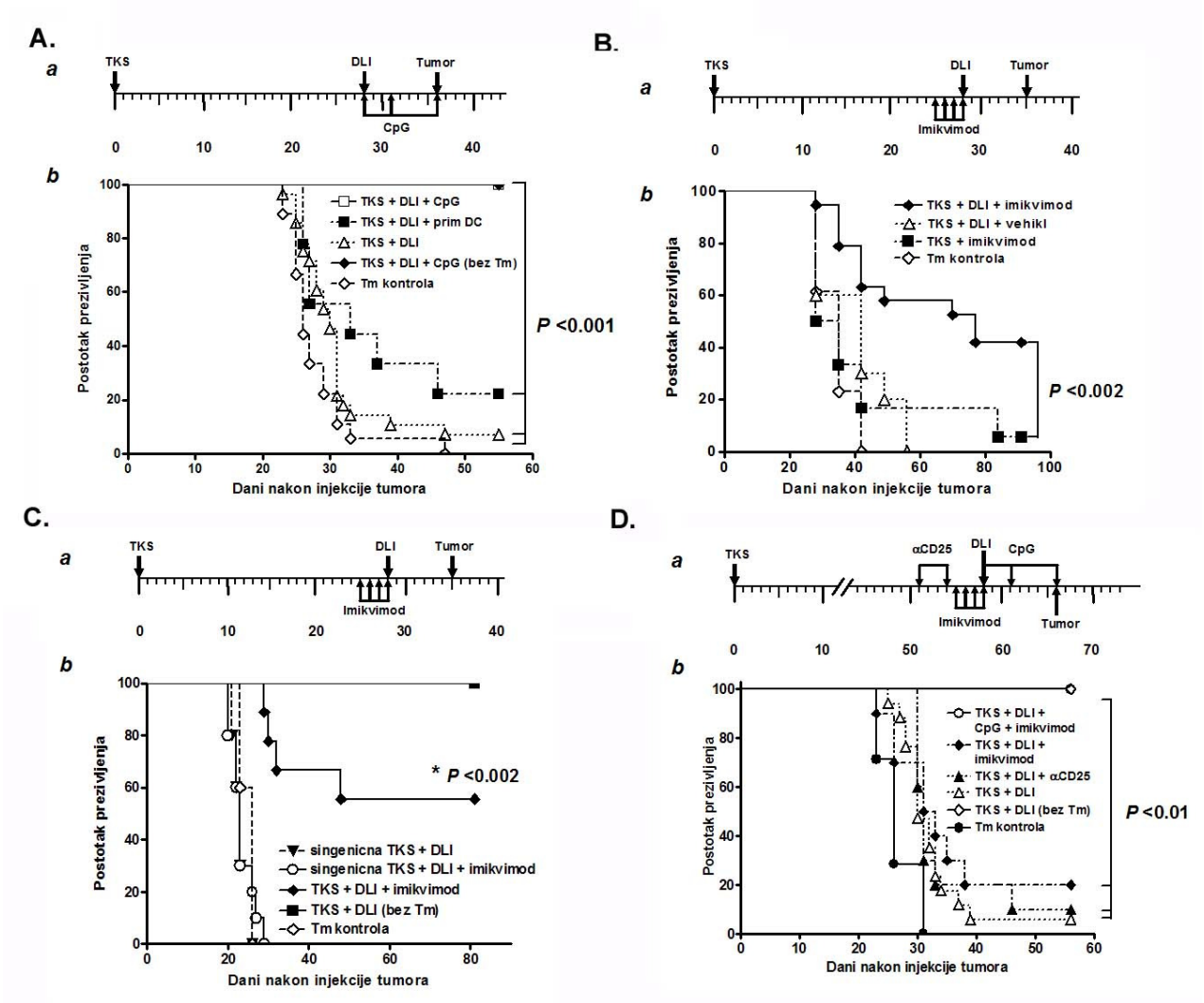
primile su ništa (▼), DLI u obliku 2 x 10^7 B10.D2 Thy1.1 splenocita (◊), anti-CD25 mAb (□) ili anti-Thy1.2 mAb (●) na dane-7 i -4 prije adoptivnog prijenosa DLI, ili anti-Thy1.2 mAb, 2 x 10^7 B10.D2 Thy1.1 splenocita te potom CpG1826 ODN na dane 0, +3 i +7 nakon DLI (Δ). Promjene davateljevog $CD4^+$ kimerizma (A) i granulocitnog kimerizma (B) mjerene su longitudinalno u perifernoj krvi temeljem diferencijalnog izražaja CD45.1 biljega. Podaci su predstavljeni kao srednja vrijednost postotka davateljevog kimerizma ± SEM (analizirano najmanje 5 miševa/grupi/vremenskoj točki).

5.8. Učinak aktivacije antigen predočnih stanica *in vivo* i adoptivno prenesenih davateljevih T limfocita na GVL reaktivnost i pojavu GVHD u MHC-podudarnom modelu

Pokazano pojačanje LH-GVH reaktivnosti DLI nakon sistemske aktivacije antigen predočnih stanica trebalo bi se očitovati boljom GVL reaktivnošću. Kako bi se to testiralo postavljen je eksperiment koristeći model tumorske protekcije.[69,108,109] Četiri 4 tjedna nakon MHC-podudarne transplantacije miševi su zaprimili DLI, DLI uz *ex vivo* maturirane DC porijekla primatelja, DLI uz CpG 1826 imunostimulatorni ODN, dok kontrolna skupina nije tretirana. Sedam dana nakon primjene DLI sve su životinje dobile letalnu dozu mišjih leukemijskih stanica porijekla soja primatelja. Kontrolnu skupinu činila je skupina B6 miševa (primatelj) koji nisu transplantirani. Svi miševi iz kontrolne skupine netransplantiranih miševa umrli su od leukemije. Skupine miševa koje su primile DLI, odnosno DLI i primateljeve DC stanice imale su bolje preživljenje u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P<0.02$, slika 34 A). Primjena DLI uz CpG1826 ODN je značajno unaprijedila preživljenje u usporedbi s skupinom koja je dobila DLI ($P<0.001$), odnosno skupinom koja je dobila DLI + primateljeve DC stanice ($P<0.001$). Potom je odlučeno ispitati GVL potencijal upotrebe imikvimoda. Primjena imikvimoda značajno je unaprijedila preživljenje kimera u istom modelu ($P<0.002$, slika 34 B), te je donesen zaključak da primjena DLI u sprezi s aktivacijom DC predstavlja potencijalno uspješnu strategiju stimulacije GVL reaktivnosti ukoliko se primjeni u MHC-podudarnom modelu rano nakon transplantacije koštane srži. Budući da su kimere u pokazanim eksperimentima bile stare svega 4 tjedna i da su još uvijek limfopenične, bilo je moguće da homeostatska proliferacija igra značajnu ulogu u GVL odgovoru.[110] U svrhu razdvajanja utjecaja homeostatske proliferacije od GVL učinka adoptivno prenesenih T limfocita dizajnirani su slijedeći eksperimenti. Postavljen je ekperiment u kojem su

C3H.SW → B6 kimere 4 tjedna nakon transplantacije dobile DLI, odnosno DLI uz stimulaciju APC imikvimodom, no ovaj put su uključene kontrolne skupine B6 → B6 transplantiranih kimera koje su također dobile DLI, odnosno DLI uz imikvimod, nakon čega su svi zaprimili letalnu dozu leukemijskih stanica. Obje grupe singeničnih kimera brzo su podlegle leukemiji, za razliku od alogenično transplantiranih kimera koje su dobile DLI i imikvimod, što govori u prilog da homeostatska proliferacija ovdje ne igra značajniju ulogu ($P<0.002$, slika 34 C).

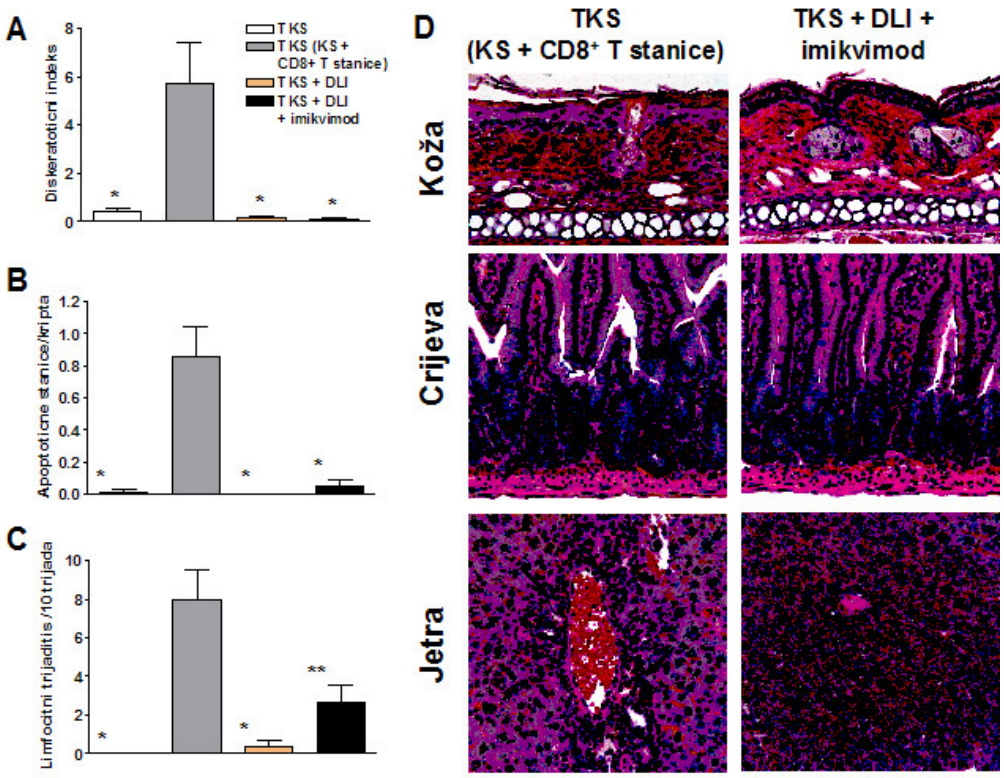
Kako bi odredili koja je strategija učinkovitija u pojačavanju GVL odgovora u kasnih kimera koje predstavljaju kaniji posttransplantacijski period, C3H.SW → B6 pune kimere su 8 tjedana nakon transplantacije primile DLI, DLI s antiCD25 monoklonskim protutijelom, DLI zajedno s imikvimodom, odnosno DLI zajedno s kombinacijom imikvimoda i CpG 1826 ODN. Tjedan dana kasnije životinje su primile letalnu dozu leukemijskih stanica. Kontrolne skupine primile su DLI ali bez tumorskih stanica, odnosno samo tumorske stanice. Pokazalo se da *in vivo* deplecija $CD25^+$ stanica prije primjene DLI nije imala značajniji učinak na preživljenje, dok je primjena imikvimoda donijela tek minimalni napredak u preživljenju u odnosu na sam DLI (P=NS, slika 34 D). Pokazalo se i da koadministracija imikvimoda i CpG1826 ODN uz DLI značajno unaprijeđuje GVL aktivnost adoptivno prenesenih T limfocita, odnosno produžuje preživljenje ($P<0.001$, slika 34 D). Tijekom eksperimenta životinje su pažljivo monitorirane i nije primjećeno kliničkih znakova GVHD.



Slika 34. CpG1826 ODN i imikvimod pojačavaju antitumorski učinak alogenične adoptivne imunoterpaije u punih MHC-podudarnih kimera. A. Četiri tjedna stare C3H.SW → B6 pune kimere (konstruirane koristeći nemanipuliranu koštanu srž davatelja) dobile su DLI u obliku 2 x 10^7 C3H.SW splenocita (Δ), DLI + 2 ip. injekcije 1.5 x 10^6 B6 (primatelj) *ex vivo* generiranih i maturiranih dendritičkih stanica na dane 0 i +7 (■) ili DLI + CpG na dane 0, +3 i +7 (□). B6 miševi koji nisu transplantirani služili su kao tumorska kontrolna skupina (◊). Sve životinje (n=9-11/grupi) primile su iv injekciju 5 x 10^4 C1498 stanica na dan +35. Dodatna grupa miševa 4 tjedna starih C3H.SW → B6 kimera koja je dobila DLI ali ne i tumor služila je kao DLI kontrola. Preživljenje bez znakova tumora je monitorirano svakodnevno i prikazano je kao funkcija vremena nakon inokulacije tumora u ovom i slijedećim eksperimentima. $P < 0.05$ (Δ vs.◊; ■ vs. Δ). B. Četiri tjedna stare C3H.SW → B6 pune kimere (konstruirane koristeći nemanipuliranu koštanu srž davatelja) tretirane su imikvimodom nakon čega su dobile ništa (■), ili DLI koji se sastojao od 2 x 10^7 C3H.SW splenocita (♦). Dodatna grupa životinja je bila pretretirana vehiklom prije primjene DLI (Δ). Sedam dana kasnije sve su grupe (n=8-15 miševa/grupi) dobile iv injekciju 5 x 10^4 C1498 stanica. Grupa koja se sastojala od 6 B6 miševa nije transplantirana, i služila je kao tumorska kontrola (◊). Ovaj je eksperiment ponavljan dva puta sa sličnim rezultatom. $P < 0.02$ (♦ vs. ■). C. Četiri tjedna stare B6→ B6 singenične kimere (konstruirane koristeći nemanipuliranu koštanu srž davatelja) dobile su DLI koji se sastojao od 2 x 10^6 B6 splenocita (▼) ili su pretretirane imikvimodom prije primjene DLI (○). Četiri tjedna stare

C3H.SW → B6 pune kimere (konstruirane koristeći nemanipuliranu koštanu srž davatelja) pretretirane imikvimodom prije DLI adminstracije služile su kao alogenična GVL kontrola (♦). Sedam dana kasnije sve su grupe (n=8-15 miševa/grupi) dobile iv injekciju 5 x 10^4 C1498 stanica. Grupa koja se sastojala od 6 B6 miševa nije transplantirana, i služila je kao tumorska kontrola (◊). Dodatna grupa 4 tjedna starih C3H.SW → B6 kimera koje su dobile DLI ali ne i tumor služila je kao DLI kontrola (■). Prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta s 8 do 12 životinja u svakoj grupi. P < 0.02 (♦ vs. ◊, ○, ▼). D. Sinergističko trigeriranje TLR7 i TLR9 pojačava GVL učinak adoptivno prenesenih T limfocita u 8 tjedana starih kimera (konstruiranih koristeći nemanipuliranu koštanu srž davatelja). C3H.SW → B6 kimere primile su samo DLI (Δ), ili su pretretirane s anti-CD25 mAb na dane -7 i -4 prije DLI (▲), imikvimodom na dane -3 do -1 prije DLI (♦) ili su pretretirane imikvimodom na dane -3 do -1 i dobile CpG 1826 ODN na dane 0, +3 i +7 (○). Sve kimere su 1 tjedan nakon DLI primile 5 x 10^4 C1498 leukemijskih stanica. B6 miševi koji nisu transplantirani služili su kao tumorska kontrola (●). Dodatna skupina 8 tjedana starih C3H.SW → B6 kimera koje su dobile DLI ali ne i tumor služila je kao DLI kontrola (◊). P < 0.02 (○ vs. Δ, ▲, ♦).

Učinjena je histološka analiza ciljnih organa GVHD (koža, jetra, crijeva) u MHC-podudarnom modelu. C3H.SW → B6 kimerima je administrirano 3 x 10^6 pročišćenih $CD8^+$ T limfocita u vrijeme transplantacije, ili odgođeno 8 tjedana nakon transplantacije uz predtretman imikvimodom, odnosno kontrolnom kremom koja ne sadržava aktivnu supstancu. Primjena davateljevih $CD8^+$ stanica letalno ozračenom mišu rezultira GVHD povezanim promjenama kože, jetre i crijeva.[71,75,111] Suprotno tomu, odložena primjena 3 milijuna davateljevih $CD8^+$ stanica životinjama tretiranim imikvimodom ili kontrolnom kremom nije uzrokovala nastanak GVHD u analiziranom tkivu. (Sl 35 A-D)



Slika 35. Odsutnost promjena uzrokovanih GVHD-om u tkivima kimera koje su primile imikvimod + DLI. Osam tjedana stare C3H.SW → B6 kimere dobile su imikvimod nakon čega su dobile DLI u obliku od 3 x 10^6 pročišćenih $CD8^+$ stanica od C3H.SW davatelja (TKS + imikvimod + DLI). Kao pozitivna kontrola služili su miševi soja B6.SJL koji su nakon što su letalno ozračeni primili istu dozu od 3 x 10^6 $CD8^+$ stanica u isto vrijeme kad i TCD koštanu srž od C3H.SW davatelja (TKS + $CD8^+$ T limfociti). Tri tjedna kasnije učinjena je histopatološka analiza znakova GVHD u tri do četiri životinje po grupi. A. Diskeratotični indeks kao indeks kožnog GVHD. Brojane su apoptotične stanice na >6 Lmm epidermisa po uzorku i izražene kao diskeratotički indeks. *, $p < 0.05$ (TKS + $CD8^+$ T limfociti vs. sve ostale grupe). B. Mikroskopska procjena GVHD crijeva. Podaci su iskazani kao broj apoptotičnih stanica po kripti. Najmanje 25 kripti su analizirane po uzorku s osvrtom na prisustvo apoptotičnih stanica. *, $p < 0.01$ (TKS + $CD8^+$ T limfociti vs. sve ostale grupe). Mikroskopska procjena jetrenog GVHD. Analizirano je najmanje 10 portalnih trijada po uzorku i podaci su izraženi kao broj zahvaćenih trijada po 10 pregledanih trijada. *, $p < 0.01$ (TKS + $CD8^+$ T limfociti vs. TKS vs. TKS + DLI); **, $p < 0.05$ (TKS + $CD8^+$ T limfociti vs. BMT + imikvimod + DLI). D. Reprezentativne fotomikrografije mikroskopskih promjena. Zamjetiti je prisustvo epidermalne stanične apoptoze (→), apoptotičnih staničnih kripti (→), i leukocitne infiltracije (→) u tkivima životinja koje su dobile TKS + $CD8^+$ T limfocite u uspodredbi s urednim izgledom kožom, crijeva i jetrenih portalnih trijada životnja koje su primile TKS + imikvimod + DLI .

6. Rasprava

6.1. Kimerizam dendritičnih stanica slezene, kože, limfnih čvorova, te mezenterijalnih limfnih čvorova, kao i T limfocita ovisan je o stupnju nepodudarnosti u MHC sustavu

Kako bi odgovorili na pitanje u kojoj mjeri inkompatibilnost u MHC sustavu utječe na kimerizam dendritičkih stanica limfocitnih organa konstruirane su MHC-podudarna, MHC-nepodudarna i kontrolna singenična kimera. Zahvaljujući razlici u izražaju alela CD45 antigena između davatelja i primatelja (odnosno H-2 MHC molekule u MHC-nepodudarnih kimera) bilo je moguće odrediti porijeklo svih hematopoetskih stanica, uključivo i dendritičke stanice. U svih kimera nađen je puni davateljev kimerizam dendritičkih stanica slezene; međutim, u ponavljanim eksperimentima u singeničnih i MHC-podudarnih kimera nađena je ostatna populacija primateljevih dendritičkih stanica u potkožnim limfnim čvorovima. Ta je populacija bila postojana (prisutna u jednakom postotku i do 6 mjeseci nakon transplantacije, u odsustvu drugih upalnih podražaja), i ograničena samo na potkožne limfne čvorove, budući da u mezenterijalnim limfnim čvorovima ona nije bila prisutna. Kako su sve kimere primile isti program pripreme za transplantaciju i kako su transplantatirane jednakim količinama stanica, može se zaključiti da razina ostatnih primateljevih DC nakon transplantacije koštane srži direktno ovisi o stupnju nepodudarnosti u MHC sustavu.

Ostatne primateljeve DC bile su prisutne samo u potkožnim limfnim čvorovima, ne i u mezenterijalnim limfnim čvorovima, stoga je bilo logično pretpostaviti da su one porijeklom iz kože, osobito uzevši u obzir rezultate koji pokazuju da LC i u mirnom stanju cirkuliraju prema regionalnim limfnim čvorovima.[50] Zanimljivo je bilo istražiti odnos primateljevih i davateljevih DC kože, te su u tu svrhu analizirane DC koje su u *in vitro* uvjetima emigrirale iz kože. Rezultati pokazuju da je većina tih stanica porijekla primatelja.

Dobiveni rezultati su u izravnoj suprotnosti s prethodnim saznanjima koja ukazuju da nakon transplantacije koštane srži iz koje su odstranjeni T limfociti zaostaje populacija DC kože, dok se dodavanjem T limfocita transplantatu odnosno transplantacijom pune koštane srži ista eliminira.[68] Osnovna razlika između naših i literaturnih pokazatelja je

eksperimentalni model; Merad i sur. su svoju tezu bazirali na eksperimentima u MHC-nepodudarnom modelu (C57BL/6 → BALB/c)[68], a ti su rezultati ponovljeni i u ovdje prikazanim eksperimentima (slika 2 A i B). Naš eksperimetalni rad u klinički relevantnijem MHC-podudarnom mHAg nepodudarnom modelu pokazao je drukčije rezultate. Klinički je relevantniji budući da se danas rutinski transplantiraju bolesnici MHC odnosno HLA podudarnih davatelja, dok su nepodudarne transplantacije rjeđe i smatraju se visoko rizičnima radi učestalog nastanka GVHD i ostalih komplikacija. Pokazani razultati značajni su iz više razloga: jasno je potvrđena uloga primateljevih dendritičkih stanica u aktivaciji[71,75,111] i efektorskoj fazi GVHD[70], obzirom da one perzistiraju i do godinu dana nakon transplantacije[112] moguća je manipulacija u svrhu postizanja boljeg GVL učinka adoptivno prenesenih T limfocita. Ti limfociti mogu predstavljati i terapijsku metu u pokušaju da se spriječi nastanak ili umanji težina GVHD. Osim toga, činjenica da postoji ostatna populacija primateljevih dendritičkih stanica sposobnih za aktivaciju adoptivno prenesenih T limfocita davatelja objašnjava zašto DLI uzrokuje GVHD reakciju i kod ustanovljenog potpunog davateljevog kimerizma (mjereno određivanjem kimerizma periferne krvi i koštane srži). Svakako treba naglasiti razliku između ostatne populacije u ovdje prikazanom modelu i kod transplantacije ljudi. Ovdje je LC populacija primatelja bila prisutna trajno, dok se LC populacija primatelja u ljudi ipak na kraju zamijeni davateljevim LC stanicama i bez dodavanja adoptivno prenesenih limfocita.[112,113] Ta je razlika uvjetovana razlikom u proporciji aloreaktivnih memorijskih stanica koje reagiraju na minor antigene, te vjerojatno i razlikom u izloženosti TLR ligandima. Ljudi su nakon transplantacije izloženi infekcijama dok su miševi zaštićeni životom u mikroizolacijskim kavezima u strogo kontroliranim uvjetima (zrak, voda, hrana).

6.2. Rekonstitucija dendritičkih stanica nakon MHC podudarne transplantacije brža je od rekonstitucije T limfocita

U ovom istraživanju procijenjena je kinetika rekonstitucije DC i T limfocita u slezeni i perifernim limfnim čvorovima MHC-podudarnih kimera. Rezultati ukazuju da vrlo brzo nakon transplantacije dolazi do gotovo potpune rekonstitucije DC slezene davateljevim stanicama (sa <5% ostatnih primateljevih DC stanica 1 tjedan nakon transplantacije).

Kinetika zamjene DC perifenih limfnih čvorova bila je sporija, uz primjetnu ostatnu populaciju primateljevih DC. Nadalje, prikazani podaci ukazuju na to da DC puno brže dostižu ukupan broj stanica u slezeni koji je normalan za taj soj miševa u usporedbi s T limfocitima. Tri tjedna nakon transplantacije, ukupan broj $CD11c^+$ stanica u slezeni dostiže polovicu broja stanica kontrolnog miša (netransplantirani miš soja davatelja), dok su u istoj vremenskoj točki T limfociti dostigli tek 15% očekivanog broja. Dva mjeseca nakon transplantacije staničnost dendritičkih stanica slezene je uredna, a u isto vrijeme su T limfociti i dalje reducirani za ~40%. Podaci sugeriraju da bi dendritičke stanice bile pogodnije za terapijske manipulacije nego T limfociti, čiji je broj i dva mjeseca nakon transplantacije gotovo upola manji od očekivanog. S druge strane, ako bi ih se aktivirajući potaknulo na ekspanziju u svrhu poticanja GVL, puno ranije bi se dosegao njihov očekivani, tj. potreban broj. Ostaje pitanje što bi to značilo za razvoj i težinu GVHD.

U isto vrijeme je analizirana i dinamika pojedinih populacija dendritičkih stanica slezene. Osam dana nakon transplantacije prevladavaju $CD4^-$ $CD8^-$ DC koje predstavljaju u tom trenutku 50% ukupne populacije DC. S druge strane $CD4^+$ stanice tek 4 tjedna nakon transplantacije postaju dominantna populacija. Točnije, tek 8 tjedana nakon transplantacije distribucija podvrsta jednaka je onoj u normalnih davatelja i primatelja. Treba naglasiti da još uvijek nije do kraja jasno kakvu ulogu imaju pojedine populacije DC u aktivaciji T limfocita. Isto tako ne postoji objašnjenje zašto prvo dolazi do oporavka i predominacije $CD4^-CD8^-$ populacije.

6.3. Dendritičke stanice porijeklom iz kože su dominantna rezidualna populacija među primateljevim dendritičkim stanica u limfnim čvorovima nakon MHC-podudarne transplantacije koštane srži, što je rezultat njihove njihove stalne migracije iz kože u mirnom stanju

Do 80% DC stanica kože porijeklom su od primatelja. Za primateljeve DC stanice prisutne u potkožnim limfnim čvorovima nakon MHC-podudarne transplantacije logično je pretpostaviti da su epitelnog porijekla. Uistinu, analiza $CD11c^+$ stanica limfnih čvorova učinjena 3 tjedna nakon transplantacije pokazala je da sve izražavaju fenotip $CD8\alpha^-DEC205^{high}$, što je sukladno s Langerhansovim stanicama. Isto je potvrđeno

bojanjem na CD326 (gp40), molekulu koja predstavlja mišji homolog humane epitelijalne adhezijske molekule. Zanimljiva je i analiza ostatnih primateljevih DC stanica limfnih čvorova u singeničnih kimera, kojih je također, kao i u MHC-podudarnih kimera bilo oko 10%. Za razliku od MHC-podudarnih kimera, u singeničnih kimera ostatna populacija se ne sastoji isključivo od $CD8\alpha^{-}DEC205^{high}$ stanica, već od svih subpopulacija, odnosno njihova distribucija nakon bojanja na CD8α i DEC205 izgleda kao u davateljeve populacije ili naivnog miša. Nedavno je objavljeno nekoliko radova koji govore u prilog stalne migracije DC kože prema limfnim čvorovima za vrijeme mirovanja, i u odsustvu upalnih podražaja.[50,91,92] Stoga je za pretpostaviti da se isto događa i u našem modelu. Opažanja da upravo populacija epDC prisutnih u potkožnim limfnim čvorovima pokazuje visoku razinu izražaja MHC klase II i drugih kostimulacijskih biljega kao što su CD86 i CD40[52,88,114] potvrđena su i u ovom istraživanju: izolirane $CD11c^{+}CD8\alpha^{-}DEC205^{high}$ stanice limfnih čvorova netransplantiranog miša pokazivale su visok izražaj MHC klase II, baš kao i primateljeva $CD11c^{+}$ $CD8\alpha^{-}DEC205^{high}$ populacija nakon MHC-podudarne transplantacije. Dodatno, $CD11c^{+}$ stanice limfnog čvora porijekla primatelja pokazivale su viši izražaj MHC klase II i CD40 biljega u usporedbi s davateljevom populacijom tri tjedna nakon transplantacije, gledano prema srednjoj vrijednosti intenziteta. No kada smo istu analizu ponovili 8 tjedana nakon transplantacije, MFI izražaja CD40, CD80 i CD86 na stanicama primateljeve populacije bila je jednaka onoj na davateljevim stanicama. Uzevši u obzir opažanje da epDC stanice mogu u mirnom stanju aktivirati $CD8^{+}$ T limfocite[114] , postavlja se pitanje mogućeg aktivacijskog utjecaja primateljevih epDC na adoptivno prenesene davateljeve stanice. S druge strane, smanjivanje kostimulacijskog potencijala primateljevih stanica kroz vrijeme može djelomično objasniti i poznat fenomen da dodatak donorske limfocitne infuzije bliže vremenu transplantacije ima bolji učinak ali uzrokuje i više GVHD nego njegova odgođena primjena.[109] Viši aktivacijski potencijal dendritičkih stanica primatelja svakako će utjecati na aktivaciju alogeničnih T limfocita davatelja.

Učinjeni eksperimenti s TRITC bojanjem pokazali su da, osim što primateljeve stanice imaju visoku razinu izražaja kostimulacijskih molekula nakon transplantacije, one i dalje posjeduju sposobnost ingestije kutano primjenjenog antigena i prenošenja u regionalni

limfni čvor. Pri tome su primateljeve stanice trebale 4 dana da stignu do limnog čvora, dok su davateljeve TRITC$^+$ DC stanice tamo bile prisutne već nakon 2 dana. Ovo kasnije pojavljivanje stanica porijekla primatelja se može objasniti na temelju prethodnih opservacija kako su označene epidermalne CD11c$^+$ dendritičke stanice najsporije migriraju.[74,95,115] CD11c$^+$ MHC klasa II^{high}, TRITC$^+$ dendritičke stanice koje se izdvajaju dva dana nakon aplikacije vjerojatno predstavljaju intersticijske stanice porijekla davatelja, ili manje vjerojatno dendritičke stanice regrutirane iz cirkulirajućih prekursora koji su ponijele TRITC do regionalnih limfnih čvorova. Prema dosadašnjim spoznajama intersticijske odnosno dermalne stanice trebaju manje vremena za migraciju do limfnog čvora.[95]

6.4. Ukupna doza zračenja i dodatak zrelih davateljevih T limfocita MHC-podudarnoj koštanoj srži utječu na rekonstituciju davateljevih dendritičkih stanica i količinu preostalih primateljevih dendritičkih stanica u potkožnim limfnim čvorovima

Rezultati jasno pokazuju da nakon mijeloablativnog kondicioniranja i transplantacije nemanipulirane koštane srži u MHC-podudarnih kimera dolazi do brze i potpune zamjene primateljevih dendritičkih stanica davateljevima u slezeni ali ne i u koži te u potkožnim limfnim čvorovima. No koje su to varijable koje utječu na dinamiku njihove izmjene? Obzirom na rad Merad et al. u MHC-nepodudarnom modelu[68], ispitivali smo utjecaj doze zračenja i prisustva davateljevih T limfocita u transplantatu kao neovisnih varijabli na zamjenu dendritičkih stanica, odnosno na veličinu rezidualne populacije primateljevih dendritičkih stanica nakon transplantacije koštane srži. U tom modelu davateljev DC kimerizam slezene raste proporcionalno dozi isporučenog ozračenja i kod doze od 700 cGy dostiže 100%. Obzirom da su eksperimenti provedeni u singeničnom modelu (modelu u kojem ne postoji imunološka barijera između davatelja i primatelja), zaključeno je se da je dimanika izmjene primateljevih za davateljeve DC slezene direktno ovisna o dozi ozračenja. Davateljev DC kimerizam limfnih čvorova očekivano nije dostigao 100%. No pri dozi od 700 cGy postignut je plato, i daljnje povećavanje doze zračenja nije povećalo davateljev DC kimerizam limfnih čvorova. I u MHC-podudarnom modelu količina ostatne populacije ovisila je donekle o dozi zračenja. Naime,

eskalacijom doze zračenja na 1100 cGy uspjelo se smanjiti ostatnu primateljevu populaciju, no i nadalje je zaostalo oko 7% ostatnih primateljevih DC stanica. Dodatak T limfocita transplantatu dodatno smanjuje njihov udio na oko 4%, no nije ih u potpunosti eliminirao. Kako bi točnije odredili utjecaj dodatka T limfocita transplantatu, učinjeni su titracijski eksperimenti u kojima su u MHC-podudarnom i -nepodudarnom modelu transplantatu dodavane rastuće doze T limfocita. Dodatak T limfocita transplantatu u MHC-nepodudarnom modelu je očekivano značajno utjecao na LC kimerizam[68], za razliku od MHC-nepodudarnog modela. Također, dodatak T limfocita transplantatu je u MHC-nepodudarnom modelu uzrokovao pojavu smrtonosnog GVHD. U MHC-podudarnom modelu GVHD je bio tek naznačen prolaznim gubitkom na tjelesnoj težini životinja. Dodatak T limfocita u transplantat je također utjecao na potencijal davateljevog GVH odgovora i smanjivao udio T staničnog kimerizma slezene. Ono što je bilo zanimljivo jest da iako su MHC-podudarne kimere koje su dobile TCD BM i T limfocite pokazale samo blage kliničke znakove GVHD, nađena je značajna razlika u celularnosti njihovih limfnih čvorova u usporedbi s limfnim čvorovima istih kimera transplantiranih samo s TCD BM. Kako je utvrđena jasna povezanost između GVH reaktivnosti i atrofije perifernog limfnog tkiva[116], logično je pretpostaviti da je staničnost limfnih čvorova u ovom modelu dobar i objektivan pokazatelj procjene subkliničke limfohematopoetske GVH (LH-GVH) reaktivnosti.

Rezultati jasno pokazuju da T limfociti, koji su u MHC-nepodudarnom modelu dostatni za eliminaciju ostatnih primateljevih dendritičkih stanica, nisu dostatni za eliminaciju istih iz tkiva kože u MHC-podudarnom modelu. Istodobno ih uspješno eliminiraju iz drugih odjeljaka (kao što su slezena ili mezenterijalni limfni čvorovi). Postavlja se pitanje zašto su T limfociti u MHC-nepodudarnom modelu sposobni eliminirati primateljeve DC stanice kože a u MHC-podudarnom modelu nisu? Jedno je moguće objašnjenje da je udio prekursora T limfocita koje reagiraju na MHC-antigene nekoliko logova veći nego T limfocita koje reagiraju na mHAg.[117] Drugo moguće objašnjenje je da MHC-aloreaktivni repertoar sadrži veći broj efektorskih memorijskih stanica koje su sposobne emigrirati u ne-hematopoetska tkiva i eliminirati LC kože.[118] U usporedbi s naivnim T limfocitima, memorijski T limfociti također imaju niži prag aktivacije, a moguće i bolje aktiviraju DC (preko CD40-CD40L sprege).

Utvrđeno je da se epidermalne dendritičke stanice obnavljaju iz progenitora prisutnih lokalno u koži, i da se, ukoliko se njih eliminira (npr. izazivanjem lokalnog upalnog procesa ili UV zračenjem), epidermalne dendritičke stanice obnove iz hematopoetskih stanica porijeklom iz koštane srži.[55,58] Isto je tako pokazano da nakon prethodne eliminacije primateljevih LC stanica kože UV zračenjem i bez dodatka T limfocita transplantatu dolazi do značajnog porasta davateljevih LC kože (>80%). To je nalaz koji koji govori u prilog pretpostavci da deplecija primateljevih LC stanica kože prije transplantacije uz pomoć UV zračenja može ograničiti izražaj GVHD kože u bolesnika koji se podvrgavaju alogeničnoj transplantaciji zbog nemalignih bolesti kao što su aplastična anemija ili anemija srpastih stanica.[68]

6.5. GVH odgovor posredovan adoptivno prenesenim T limfocitima pomaže eliminaciju rezidualnih primateljevih epDC

Zanimljivo je bilo provjeriti što se događa s ostatnom primateljevom DC populacijom nakon što MHC-podudarnoj kimeri (transplantirane nemanipuliranim transplantatom koštane srži) primjeni DLI u dozi od 1.2 x 10^7 pročišćenih T limfocita davatelja. Nakon dodatka pročišćenih T limfocita davatelja dolazi do daljnjeg smanjivanja ostatne populacije DC stanica limfnih čvorova, a istovremeno očekivano raste udio davateljevih LC kože (pokazano porastom $CD326^+$ stanica davatelja u stanicama koje emigriraju iz kože uški kimera). Ovaj se porast LC može objasniti GVH učinkom T limfocita, koji djeluju na eliminaciju progenitora iz kože. Naime, istovremeno je zabilježeno smanjenje staničnosti limfoidnih tkiva povezano s aloreakcijom, te se može zaključiti da isti mehanizmi koji djeluju na smanjenje ukupnog broja stanica limfnih čvorova (i slezene) djeluju na lokalno prisutne LC progenitore.

6.6. Rezidualni davateljev kimerizam utječe na jačinu DLI-posredovane GVH reaktivnosti samo u MHC-nepodudarnom ali ne i u MHC-podudarnom modelu

Primjena davateljevih T limfocita u obliku DLI danas se rutinski primjenjuje u kliničkoj medicini u stanjima ponovne pojave zloćudnog tumora nakon alogenične transplantacije koštane srži.[27,119,120] Donorske limfocitne infuzije mogu biti primijenjene i preventivno, u svrhu postizanja potpunog davateljevog kimerizma.[120] Naime, sa smanjenjem intenziteta

kondicioniranja smanjila se smrtnost vezana za transplantaciju i time je metoda postala dostupnija širem broju bolesnika. Takav se tip transplantacije zbog smanjenih doza kondicioniranja naziva «mini-transplantacija». Priprema koja se primjenjuje nije dostatna da postigne 100% davateljev kimerizam pa je potrebno dodavati davateljeve limfocite kako bi se postigao željeni davateljev kimerizam, čime su ostvareni preduvjeti optimalne eradikacije bolesti. Interakcije između davateljevih T limfocita i primateljevih antigen predočnih stanica u vremenu nakon transplantacije još uvijek nisu do kraja definirane. Mapara i sur.[69] su pokazali važnu ulogu primateljevih dendritičkih stanica u MHC-nepodudarnom modelu. U miješane kimere primjena DLI dovodi do povoljnijeg antitumorskog učinka, nego u miševa koji su 100% kimera. Njihova konverzija u puni davateljev kimerizam nije praćena pojavom GVHD.[69] No ti su eksperimenti provedeni u MHC-nepodudarnom modelu. Primjenjeni model nam je, temeljem razlike u izražaju alela LCA, omogućio praćenje davateljevog i primateljevog DC i T staničnog kimerizma. Davanjem T limfocita koji su singenični davatelju koštane srži ali se razlikuju u izražaju Thy1.1 antigena (CD90.1) na površini stanice, bilo moguće procijeniti ulogu ostatnog primateljevog kimerizma u ekspanziji adoptivno prenesenih T limfocita (mjereno određivanjem ukupnog broja $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocita slezene porijeklom iz DLI i određivanjem smanjenja CFSE bojanja prenesenih T limocita), te procjeniti efektorsku funkciju (mjereno njhovim potencijalom proizvodnje IFNγ nakon kratke *in vitro* stimulacije), te odrediti sposobnost konverzije primateljevog u davateljev kimerizam. Za razliku od MHC-nepodudarnog modela, u našem modelu u miješanih kimera koje su imale oko 30% stanica slezene porijekla primatelja, utvrđeno je da adoptivno preneseni T limfociti nisu pokazali značajnije veću ekspanziju, produkciju IFNγ niti uspješnu konverziju kimerizma. Isto je vrijedilo za dvostruko višu dozu, dok su tek stanice prethodno senzibilizirane za antigene primatelja imale nešto viši potencijal ekspanzije i IFNγ produkcije. Obzirom na pokazane podatke i rezultate može se zaključiti da je LH-GVH reaktivnost nakon primjene DLI ovisna primarno o reaktivnosti na glavne antigene MHC sustava, a ne na slabe antigene. Stoga teza da DLI uzrokuje jaču alogenu reakciju u miješane kimere nego u pune kimere je ustvari netočna u MHC-podudarnom sustavu. Ti su rezultati sukladni kliničkim zapažanjima.[120,121] Također, obzirom na pokazani veći potencijal T limfocita koji su prethodno senzibilizirani na antigene primatelja, može se

zaključiti da i veća frekvencija anti-mHAg reaktivnih T limfocita utječe na njihov veći aloreaktivni potencijal.

6.7. Učinak adoptivno prenesenih T limfocita u ranih kimera moguće je pojačati aktivacijom antigen predočnih stanica upotrebom TLR liganda, dok je za aktivaciju u starijih punih ili mlađih miješanih kimera potrebna upotreba kombinacije dva TRL liganda, ili deplecija primateljevih T limfocita uz aktivaciju dendritičkih stanica

Dokazano je da u MHC-podudarnom modelu, sama primjena DLI ne dovodi do konverzije punih kimera u potpuni davateljev kimerizam, što je preduvjet za eliminaciju osnovne maligne bolesti. Obzirom da imunološka reakcija davateljevih T limfocita počinje njihovim kontaktom s APC u limfnim čvorovima, logično je pretpostaviti da je ekspanziju i efektorsku funkciju moguće potaknuti kontaktom s kvalitetnijim APC, odnosno APC koje pokazuju više razine kostimulacijskih antigena. Učinjeni su eksperimenti u kojima smo pokušali omogućiti takav bolji kontakt stimulirajući DC stanica *in vivo* uz pomoć TLR agonista (CpG oligonukleotida i imikvimoda) te prijenosom DC u vrijeme DLI primjene koje su prethodno aktivirane *in vitro*. Naši rezultati pokazuju da *in vitro* aktivacija i adoptivni prijenos DC stanica kako davatelja tako i primatelja ima mali učinak na konverziju kimerizma u MHC modelu, dok se jedino učinkovitom pokazala administracija TLR liganada, što je u skladu s rezultatima objavljenim u ne-transplantacijskom modelu koji govore da je *in vivo* maturacija DC uz pomoć TLR liganada uspješniji pristup manipulacije T staničnog odgovora.[122] Možda se to najbolje i vidi u eksperimentu s imikvimodom u kojem smo pokazali da se administracijom imikvimoda postiže veća celularnost limnih čvorova i bolji izražaj kostimulacijskih molekula *in vivo*.

Aktivacija samo jednim TLR agonistom bila je uspješna samo u punih kimera (s malom ostatnom primateljevom populacijom) i to rano nakon transplantacije (3 tjedna). Kada je isti pristup pokušan u starijih punih kimera ili mlađih miješanih kimera, nije se uspjelo postići isti učinak. U skladu s tim je i studija koja je identificirala vrijeme davanja DLI kao ključni čimbenik za učinkovitost adoptivne terapije.[109] Jedno od objašnjenja zašto isti pristup nije efikasan u kasnom razdoblju vjerojatno su već razvijeni supresorski

mehanizmi koji onda djeluju protiv adoptivno prenesenih stanica. Supresorske stanice su prvi put opisane prije više od 20 godina, i dokazane su u životinjskim modelima[123,124] i kod ljudi.[125] Nekoliko studija je pokazalo da T_{reg} porijekla davatelja[106,126] i primatelja[127,128], kao i mijeloidne $Mac1^+$ supresorske stanice[127] mogu utjecati na aloimune odgovore donorskih lifmocitnih infuzija u miša. U našoj studiji privremena deplecija $CD4^+CD25^+$ stanica nije pokazala veći učinak kod 8 tjedana starih kimera. Obzirom na objavljene rezultate o sinergističkom djelovanju TLR agonista[129,130], pokušali smo istodobno potaknuti TLR9 i TLR7. Na taj način je postignuta konverzija u davateljev kimerizam, bez istodobnog razvoja GVHD (primjetan značajan ali prolazan gubitak na težini).

Mogući uzrok slabijeg djelovanja DLI u miješanih kimera je „iscrpljenje" davateljevih T-limfocita u prisutnosti velikih količina antigena porijekla primatelja, odnosno velikih količina primateljevih APC i T limfocita. Ovo saznanje posredno potvrđuju pokazatelji da se primjenom protutijela koje je specifično za primateljeve T limfocite značajno mjenja stanični kimerizam. Tek istovremenom primjenom TLR agonista (u ovom slučaju CpG ODN) postignut je napredak i u granulocitnom kimerizmu (slika 32). Evidentno je da u MHC-podudarnom modelu, za razliku od MHC-podudarnog modela, miješani kimerizam odnosno veća količina ostatne primateljeve populacije nije dovoljna za optimalnu ekspanziju adoptivno prenesenih T limfocita. Ovdje je, osim količine ostatne populacije, i kako je već prije pokazano vrste adoptivno prenesenih stanica (presenzibilizirane vs. naivne) važno i vrijeme primjene limfocita. Kasnije vrijeme primjene zahtijevalo je bolju dodatnu aktivaciju APC sinergističkim djelovanjem dva TLR liganda. Temeljem tih pokazatelja jasno je da je u MHC-podudarnom modelu važnija aktivacija nego količina ostatne populacije dendritičkih stanica, kako rano nakon transplantacije tako i kasnije.

6.8. Aktivacijom antigen predočnih stanica in vivo pojačava se GVL reaktivnost adoptivno prenesenih davateljevih limfocita u MHC-podudarnom modelu bez znakova GVHD

Kako bi provjerili GVL potencijal primjene TRL agonista s adoptivno prenesenim limfocitima učinjeni su ekperimenti u kojima je korišten model tumorske protekcije.[69,108,109] Primjena CpG ODN kao i imikvimoda značajno je poboljšala

preživljenje životinja u ovom tumorskom modelu. Imikvimod nije bio učinkovit u zaštiti životinja od nakadno primjenjenih leukemijskih stanica, ako je DLI primjenjen 8 tjedana nakon transplantacije, dok istodobna primjena dva TLR agonista (CpG i imikvimoda) značajno produljila preživljenje životinja u ovom modelu. Praćenje životinja tijekom eksperimenta je pokazalo da istodobna primjena TLR agonista ne potiče GVHD (prema kliničkim znacima i težini životinja). Isto tako imikvimod ne dovodi do subkliničkog GVHD što je dokazano u patohistološkim preparatima. Imikvomid primjenjen s $CD8^+$ stanicama ne pokazuje histološke značajke GVHD u analiziranom tkivu (koža, jetra, crijeva), za razliku od kontrolne skupine koja je dobila $CD8^+$ stanice s transplantatom. Prikazani rezultati nadopunjuju objavljene podatke koji sugeriraju da je TLR signalni put važan u T staničnoj aloimunosti.[131] Pokazani podaci jasno pokazuju da GVL reaktivnost DLI pojačana TLR aktivacijom je posredovana primarno anti-mHAg odgovorima, dok homeostatska proliferacija nema značajnijeg utjecaja. TLR signalni put može doprinijeti DC da bolje aktiviraju T limfocite budući da potiče bolje predočenje antigena, bolju kostimulaciju, kao i lučenje citokina koji usmjeravaju odgovor prema Th1 populaciji.[132,133] Saznanje da TLR ligandi pojačavaju GVL učinak bez indukcije letalnog GVHD može biti značajna u kontekstu nemijeloablativne transplantacije, u kojoj je odgođena konverzija u potpun davateljev kimerizam. To je i preduvjet za eradikaciju bolesti. [134-136] Potencijalnu korist od istodobne primjene DLI i TLR agonista mogu imati i oboljeli od brzoprogredirajućih bolesti, kao što je npr. akutna leukemija, kod kojih odgođeno djelovanje DLI na konverziju kimerizma time može biti ubrzano i daljnja progresija bolesti na vrijeme spriječena.

6.9. Završna razmišljanja

GVHD predstavlja najveću prepreku u kliničkoj primjeni transplantacije koštane srži, posebice u terapiji nemalignih oboljenja. Već duži niz godina istraživači u ovom području nastoje odvojiti GVHD od poželjnog GVL. U nastanku GVH/GVL reakcije važnu ulogu imaju antigen predočne stanice. Naime, ključan trenutak u započinjanju svake imunosne reakcije je onaj u kojem se susreću T limfocit i antigen predočna stanica. Do sada objavljene studije dijelom su prijeporne u tumačenju uloge odnosno nužnosti

primateljevih APC u započinjanju i održavanju GVHD reakcije. Ovdje prikazani eksperimenti pokazali su da u klinički relevantnom MHC-podudarnom modelu nakon mijeloablativne transplantacije nemanipulirane koštane srži (one koja sadrži T limfocite), zaostaje populacija primateljevih Langerhansovih stanica u koži. Ta populacija nakon transplantacije, u mirnom stanju, putuje prema regionalnim limfnim čvorovima i iskazuje visoku razinu MHC klase II, a rano nakon transplantacije i ostalih kostimulacijskih antigena.[137] Ta ostatna populacija primateljevih DC nije dovoljna za indukciju GVHD u MHC-podudarnom modelu, kako je prethodno bilo sugerirano.[67,71,138] Klinički su zanimljivi i rezultati eksperimenata s TLR ligandima koji su pokazali da imikvimod u kombinaciji s DLI može poboljšati davateljev kimerizam, to jest inducirati jaču LH-GVH reakciju, bez indukcije GVHD.[139] Obzirom na to, i na podatke dobivene eksperimentima s miješanim i punim kimerama, moguće je pretpostaviti da je za aloreaktivnost posredovanu DLI važnija razina aktivacije primateljevih dendritičkih stanica od njihovog broja, te da je za indukciju GVHD potrebna, osim prisutnih primateljevih DC, i aktivacija TLR kao i dodatno oštećenje tkiva koje onda omogućuje emigraciju aktiviranih T limfocita u ciljna tkiva. U odsutnosti tkivnog oštećenja aktivacija TLR receptora je moguće dovoljna samo za indukciju limfohematopoetske GVH reakcije i konverziju kimerizma, ali ne i za indukciju GVHD bolesti, što je opet u suprotnosti s podacima do sada objavljenim u MHC-nepodudarnom modelu.[73,140] Važnost stimulacije TLR očituje se i u smanjenju pojavnosti akutnog GVHD nakon dekontaminacije intestinalne flore (odnosno uklanjanja liganda TLR4, lipopolisaharida iz stanične stijenke gram negativnih bakterija crijeva).[141] Dodatak DLI nakon MHC-podudarne transplantacije u našem modelu nije uzrokovao GVHD. Međutim treba istaknuti kako u ljudi dodavanje DLI HLA podudarnih davatelja često izaziva pojavu GVHD. To je moguće objasniti većim postotkom memorijskih T limfocita u perifernoj krvi svakog čovjeka, što je rezultat stalne izloženosti bakterijama i virusima tijekom života, te širokom izloženošću TLR ligandima primatelja (kao rezultat konkomitantnih infekcija ili preko oštećenih sluzničkih membrana nakon kondicioniranja odnosno kemoterapije).

Dendritičke stanice su važne u aktivaciji davateljevih T limfocita nakon transplantacije i u adoptivnoj imunoterapiji. Potencijalno su izvrstan medij za terapijske manipulacije, i to iz više razloga. Jedan od njih je činjenica da se njihov broj nakon transplantacije vrlo

brzo oporavlja, puno brže nego broj ukupnih T limfocita. Ostatne primateljeve LC svakako su bitne u predočenju antigena davateljevim T limfocitima, no i davateljeve DC imaju mogućnost predočenja primateljevih antigena davateljevim T limfocitima (križna prezentacija antigena), te i one predstavljaju potencijalnu metu za manipulaciju. Spoznaja da je UV zračenjem moguće eliminirati ostatnu populaciju LC primatelja u koži i time spriječiti nastanak GVHD kože svakako ima mogućnost kliničke aplikacije, osobito u slučajevima liječenja nemalignih bolesti alogeničnom transplantacijom.

Dugo vremena je cilj istraživanja osobito u tumorskoj imunologiji bilo iznaći način za promicanje efektorske funkcije T limfocita. Aktivacija DC preko TLR receptora je potencijalno siguran, jednostavan i široko dostupan način bolje stimulacije T limfocita. Svakako treba naglasiti da aktivacija DC stanica preko TLR receptora ne predstavlja konačni način razdvajanja GVL od GVHD, takozvani „sveti gral“ transplantacijske imunologije, ali sigurno predstavlja jedan korak boljem razumijevanju događaja u pred- i poslijetransplantacijskom rezdoblju, te jedan mali korak bliže tom cilju.

7. Zaključci

1. Kimerizam dendritičnih stanica kože i limfnih čvorova koji dreniraju kožu ovisan je o stupnju nepodudarnosti u MHC sustavu. U MHC-podudarnom, mHAg-nepodudarnom modelu transplantacije koštane srži u potkožnim limfnim čvorovima i koži, za razliku od slezene i mezenterijalnih limfnih čvorova, zaostaje populacija dendritičkih stanica porijeklom od primatelja, dok u MHC-nepodudarnom modelu dolazi do potpune zamjene dendritičkih stanica ukoliko transplantat sadrži kompetentne T limfocite. Populacija rezidualnih primateljevih dendritičkih stanica čini oko 10% ukupnog broja $CD11c^+$ stanica u limfnom čvoru i čak 90% $CD11c^+$ stanica u koži, te je prisutna do 6 mjeseci nakon transplantacije. Te su stanice $DEC205^{high}$ i $CD326^+$, što govori da su epitelijalnog porijekla, odnosno Langerhansove stanice. Primateljeve epDC rano nakon transplantacije pokazuju visoku razinu izražaja kostimulacijskih molekula, kao i molekule MHC klase II, te pokazuju sposobnost primanja antigena s kože i njihovog prijenosa do regionalnih limfnih čvorova.

2. Povećanjem doze zračenja tijekom kondicioniranja kao i dodatkom T limfocita u transplantat postiže se veći davateljev kimerizam dendritičkih stanica slezene i potkožnih limfnih čvorova. No, za razliku od objavljenih rezultata u MHC-nepodudarnom modelu, nije bilo moguće moguće postići potpuni davateljev kimerizam potkožnih limfnih čvorova eskaliranim dozama zračenja kao niti većim brojem dodanih limfocita; to je postignuto tek primjenom UV zračenja prije transplantacije. Također, dodatak T limfocita kasnije nakon transplantacije, u obliku donorskih limfocitnih infuzija smanjuje broj rezidualnih primateljevih epDC.

3. Rezidualni davateljev kimerizam utječe na jačinu DLI-posredovane GVH reaktivnosti samo u MHC-nepodudarnom ali ne i u MHC-podudarnom modelu. Na dendritičke stanice nakon transplantacije moguće je utjecati upotrebom liganada za TLR receptore i na taj način postići bolju aktivaciju adoptivno prenesenih T limfocita davatelja, te bolju GVL reaktivnost bez uzrokovanja pojave GVHD. U kimera rano nakon transplantacije taj je učinak moguće postići primjenom samo jednog TLR liganda, dok je u kimera kasnije nakon transplantacije ili kimera s većim postotkom primateljevih stanica

potrebno primijeniti kombinaciju dva TRL liganda, ili učiniti depleciju primateljevih T limfocita uz aktivaciju dendritičkih stanica.

4. U MHC-podudarnom modelu aktivacijom antigen predočnih stanica in vivo pojačava se GVL reaktivnost adoptivno prenesenih davateljevih limfocita bez uzrokovanja pojave GVHD.

8. Sažetak

Transplantacija koštane srži uvriježena je metoda liječenja mnogih malignih i nemalignih hematoloških oboljenja, a u posljednje vrijeme se njena indikacija širi i na liječenje oboljenja kao što su razne autoimune bolesti ili metaboličke deficijencije. Dva su osnovna ograničenja metode: razvoj GVHD i povrat osnovne bolesti. Ovo istraživanje imalo je za cilj proučiti načine za postizanje bolje aktivacije i jače efektorske funkcije T-stanica koje se primjenjuju u adoptivnoj imunoterapiji nakon transplantacije te istražiti ulogu dendritičkih stanica primatelja, napose Langerhansovih stanica kože. Rezultati su pokazali da u MHC-podudarnom, mHAg-nepodudarnom modelu transplantacije koštane srži u potkožnim limfnim čvorovima i koži, za razliku od slezene i mezenterijalnih limfnih čvorova, zaostaje populacija dendritičkih stanica porijeklom od primatelja, koja izražava biljege specifične za Langerhansove stanice. Za razliku od MHC-nepodudarne transplantacije, dodavanjem većeg broja T limfocita transplantatu ne eliminiraju se rezidualne primateljeve dendritičke stanice, dok je primjenom UV zračenja to moguće postići. Iako rano nakon transplantacije rezidualne primateljeve dendritičke stanice pokazuju visoku razinu izražaja kostimulacijskih molekula i molekule MHC klase II, te pokazuju sposobnost primanja antigena s kože i njihovog prijenosa do regionalnih limfnih čvorova, ne induciraju bolji GVH, odnosno njihov veći broj ne znači i bolji GVH odgovor nakon adoptivnog prijenosa davateljevih limfocita, kao što je to pokazano u MHC-nepodudarnom modelu. No stimulacijom TLR receptora dendritičkih stanica bilo je moguće postići bolju aktivaciju davateljevih T limfocita i bolji GVL učinak, bez indukcije jačeg GVHD, što govori u prilog tvrdnji da u aktivaciji T limfocita nakon transplantacije nije presudan broj rezidualnih dendritičkih stanica porijekla primatelja već razina njihove aktivacije, na koju je moguće utjecati, što predstavlja potencijalni terapijski pristup.

9. Summary

Nadira Durakovic, MD: The role of host dendritic cells in adaptive immunotherapy after bone marrow transplantation; 2008

Bone marrow transplantation is a routine method of treatment for many malignant and non-malignant hematological diseases; lately it has been used for treatment of some autoimmune diseases as well as metabolic deficiencies. There are two main limitations to the method: development of GVHD and disease relapse. This research was aimed at exploring ways to achieve better activation and effector function of adoptively transferred T cells after bone marrow transplantation, and at investigating the role of host dendritic cells, namely Langerhans cells. Results have shown that in MHC-matched, mHAg-mismatched murine model of bone marrow transplantation there is a residual population of host dendritic cells present in the skin and skin draining lymph nodes, but not spleen or mesenteric lymph nodes. That residual host dendritic cell population expresses markers specific for Langerhans cells. Unlike already shown in MHC-mismatched model, addition of more T cells to the original graft does not eliminate the residual host dendritic cell population, while UV irradiation does. Although early after transplantation residual host dendritic cell population shows high expression of co-stimulatory molecules and class II MHC molecule, and also show the ability to ingest antigens applied to the skin and carry them to the draining lymph node, they do not induce better GVH response. Their higher number does not imply better GVH response, as it has been shown in MHC-mismatched model. However, by using TLR agonists it was possible to achieve better activation of donor T cells and, by that, better GVL effect without inducing serious GVHD. It shows that it is not the number of residual host dendritic cells that is crucial for induction of T cell response, rather their activation level, which can be influenced through TLR signaling pathway, and that can be potentially explored as a treatment strategy.

10. Literatura

1. Thomas ED SR, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation. N Engl J Med. 1875;292:895-902.
2. Lorenz E UD, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl Cancer Inst 1951;12:197-201.
3. Ford CE HJ, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. Nature. 1956;177:452-454.
4. Bach FH AR, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. Lancet. 1968;2:1364-1366.
5. Gatti RA MH, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet. 1968;2:1366-1369.
6. Thomas ED SR, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Funk DD, Lerner KE. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. Lancet. 1972;1:284-289.
7. Barnes D CM, Loutit J, Neal F. Treatment od murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. Preliminary communication. Br Med J. 1956;2:626-630.
8. Barnes D LJ. Treatment od murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. Br J Haematol. 1957;3:241-252.
9. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Adoptive Immunotherapy of Acute Leukemia: Experimental and Clinical Results. Vol. 25; 1965:1525-1531.
10. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. Vol. 49; 1977:511-533.
11. Greer JP FJ, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B ed Wintrobe's Clinical Hematology. Vol. 1 (ed 2nd). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
12. Janeway CA TP, Walport M, Schlomchik MJ. Immunobiology (ed 5th). New York: Garland Publishing; 2001.
13. Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. Vol. 157; 1997:125-140.
14. Thomas ED CJ, Herman EC Jr, Ferrebee JW Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. Blood. 1962 19:217-228.
15. Deeg HJ SR, Weiden PL, Raff RF, Sale GE, Atkinson K, Graham TC, Thomas ED. Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance. Transplantation. 1982 34:30-35.
16. Deeg HJ SR, Appelbaum FR, Kennedy MS, Graham TC, Thomas ED. Combined immunosuppression with cyclosporine and methotrexate in dogs given bone marrow grafts from DLA-haploidentical littermates. Transplantation. 1984 37:62-65.
17. Anasetti C HJ. Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. Transfus Sci. 1994 15:221-230.
18. Nash RA PM, Storb R, Longton G, Pettinger M, Anasetti C, Appelbaum FR, Bowden RA, Deeg HJ, Doney K, et al. Acute graft-versus-host disease: analysis of risk

factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. Blood. 1992 80:1838-1845.
19. Billingham R. The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect. 1966-1967;62:21-78.
20. Korngold R SJ ed T cell subsets in graft-vs.-host disease. In: Burakoff SJ DH, Ferrara J, Atkinson K ed. Graft-vs-host disease: Immunology, Patophysiology, and Treatment. New York: Marcel Dekker; 1990.
21. Kernan NA CN, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. Blood. 1986.;68:770-773.
22. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. Semin Hematol. 2006;43:3-10.
23. Ferrara JLM CK, Deeg HJ ed Graft-vs.-Host Disease (ed 3rd). New York: Marcel Dekker; 2005.
24. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. N Engl J Med. 1979;300:1068-1073.
25. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. N Engl J Med. 1981;304:1529-1533.
26. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood. 1990;75:555-562.
27. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood. 1990;76:2462-2465.
28. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. Blood. 1995;86:2041-2050.
29. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. Blood. 2004;103:767-776.
30. Slavin S, Naparstek E, Nagler A, et al. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. Vol. 87; 1996:2195-2204.
31. Slavin S, Morecki S, Weiss L, Or R. Donor Lymphocyte Infusion: The Use of Alloreactive and Tumor-Reactive Lymphocytes for Immunotherapy of Malignant and Nonmalignant Diseases in Conjunction with Allogeneic Stem Cell Transplantation. Vol. 11; 2002:265-276.
32. Heinzinger M, Waller, C.F, Berg, A, Rosenstiel, A, Lange, W. Generation of dendritic cells from patients with chronic myelogenous leukemia. Annals of Hematology. 1999;78:181-186.
33. Steinman RM CZ. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med. 1973 137:1142-1162.
34. Guermonprez P VJ, Zitvogel L, Therey C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimualtion by dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2002;20:621-667.

35. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;392:245-252.
36. Förster R SA, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. Cell. 1999 99:23-33.
37. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. Immunity. 2004;21:279-288.
38. Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, et al. Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node: Impact on T Lymphocyte Traffic and Priming. Vol. 198; 2003:615-621.
39. Bousso P RE. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. Nat Immunol. 2003;4:579-585.
40. Cavanagh LL, Bonasio R, Mazo IB, et al. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. Nat Immunol. 2005;6:1029-1037.
41. Bonasio Roberto vAUH. Generation, migration and function od circulating dendritic cells. Current opinion in Immunology. 2006;18:503-511.
42. Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. Immunity. 2001;14:495-498.
43. Gallucci S MP. Danger signals: SOS to the immune system. Curr Opin Immunol 2001;13:114-119.
44. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunology Letters. 2003;85:85-95.
45. Tsuneyasu K, Shizuo A. Toll-like receptor function and signaling. The Journal of allergy and clinical immunology. 2006;117:979-987.
46. Henri S, Vremec D, Kamath A, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. J Immunol. 2001;167:741-748.
47. Vremec D ZM, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. J Exp Med. 1992;176:47-58.
48. Fazekas de St Groth B. The evolution of self-tolerance: a new cell arises to meet the challenge of self-reactivity. Immunology Today. 1998;19:448-454.
49. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. Vol. 194; 2001:863-870.
50. Hemmi H, Yoshino M, Yamazaki H, et al. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. Int Immunol. 2001;13:695-704.
51. Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. Vol. 145; 1990:2833-2838.
52. Stoitzner P, Holzmann S, McLellan AD, et al. Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207. J Invest Dermatol. 2003;120:266-274.

53. Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. Blood. 2002;100:1734-1741.
54. Wilson NS VJ. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. Immunol Cell Biol. 2004 82:91-98.
55. Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. Nat Immunol. 2002;3:1135-1141.
56. Bogunovic M, Ginhoux F, Wagers A, et al. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. J Exp Med. 2006;203:2627-2638.
57. Diao J, Winter E, Cantin C, et al. In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue. J Immunol. 2006;176:7196-7206.
58. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. Nat Immunol. 2006;7:265-273.
59. Korngold R, Sprent J. Features of T cells causing H-2-restricted lethal graft-vs.-host disease across minor histocompatibility barriers. J Exp Med. 1982;155:872-883.
60. Korngold R, Sprent J. Variable capacity of L3T4+ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. J Exp Med. 1987;165:1552-1564.
61. Korngold R, Sprent J. Graft-versus-host disease in experimental allogeneic bone marrow transplantation. Proc Soc Exp Biol Med. 1991;197:12-18.
62. Blazar BR, Taylor PA, Vallera DA. CD4+ and CD8+ T cells each can utilize a perforin-dependent pathway to mediate lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex-disparate recipients. Transplantation. 1997;64:571-576.
63. Brochu S, Rioux-Masse B, Roy J, Roy DC, Perreault C. Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. Blood. 1999;94:390-400.
64. Graubert TA, DiPersio JF, Russell JH, Ley TJ. Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. J Clin Invest. 1997;100:904-911.
65. Schmaltz C, Alpdogan O, Horndasch KJ, et al. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. Blood. 2001;97:2886-2895.
66. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. Nat Med. 2005;11:1244-1249.
67. Matte CC, Liu J, Cormier J, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. Nat Med. 2004;10:987-992.
68. Merad M, Hoffmann P, Ranheim E, et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. Nat Med. 2004;10:510-517.
69. Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. Blood. 2002;100:1903-1909.

70. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. Nat Med. 2002;8:575-581.
71. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. Science. 1999;285:412-415.
72. Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. Blood. 2001;98:3456-3464.
73. Blazar BR, Krieg AM, Taylor PA. Synthetic unmethylated cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides are potent stimulators of antileukemia responses in naive and bone marrow transplant recipients. Blood. 2001;98:1217-1225.
74. Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. J Immunol. 2000;165:6762-6770.
75. Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, Rivera AJ, Emerson SG. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. J Clin Invest. 2002;109:1335-1344.
76. Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J Exp Med. 1985;161:526-546.
77. Allan RS, Smith CM, Belz GT, et al. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. Science. 2003;301:1925-1928.
78. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. Blood. 1996;88:3230-3239.
79. Hill GR, Cooke KR, Teshima T, et al. Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. J Clin Invest. 1998;102:115-123.
80. Jones SC, Murphy GF, Friedman TM, Korngold R. Importance of minor histocompatibility antigen expression by nonhematopoietic tissues in a CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease model. J Clin Invest. 2003;112:1880-1886.
81. Ferrara J, Guillen FJ, Sleckman B, Burakoff SJ, Murphy GF. Cutaneous acute graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model: histologic analysis and correlation to clinical disease. J Invest Dermatol. 1986;86:371-375.
82. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. Blood. 1997;90:3204-3213.
83. Kolb H, Sale GE, Lerner KG, Storb R, Thomas ED. Pathology of acute graft-versus-host disease in the dog. An autopsy study of ninety-five dogs. Am J Pathol. 1979;96:581-594.
84. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Alloreactive memory T cells are responsible for the persistence of graft-versus-host disease. J Immunol. 2005;174:3051-3058.
85. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol. 2002;2:151-161.

86. Edwards AD, Chaussabel D, Tomlinson S, Schulz O, Sher A, Reis e Sousa C. Relationships among murine CD11c(high) dendritic cell subsets as revealed by baseline gene expression patterns. J Immunol. 2003;171:47-60.
87. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. J Immunol. 2000;164:2978-2986.
88. Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, et al. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. Blood. 2003;102:2187-2194.
89. Borkowski TA, Nelson AJ, Farr AG, Udey MC. Expression of gp40, the murine homologue of human epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), by murine dendritic cells. Eur J Immunol. 1996;26:110-114.
90. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. Nature. 1979;282:324-326.
91. Randolph GJ. Is maturation required for Langerhans cell migration? J Exp Med. 2002;196:413-416.
92. Yoshino M, Yamazaki H, Nakano H, et al. Distinct antigen trafficking from skin in the steady and active states. Int Immunol. 2003;15:773-779.
93. Huang FP, Platt N, Wykes M, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. J Exp Med. 2000;191:435-444.
94. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2003;21:685-711.
95. Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K. Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. J Immunol. 2000;165:4910-4916.
96. Mackall CL HF, Gress RE. Restoration of T-cell homestasis after T-cell depletion Semin Immunol. 1997;9:339-346.
97. Alpdogan O, Muriglan SJ, Eng JM, et al. IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J Clin Invest. 2003;112:1095-1107.
98. Min B, Yamane H, Hu-Li J, Paul WE. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. J Immunol. 2005;174:6039-6044.
99. Davila E, Velez MG, Heppelmann CJ, Celis E. Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naive and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment. Blood. 2002;100:2537-2545.
100. Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to Listeria monocytogenes challenge. J Immunol. 1998;161:2428-2434.
101. Beloeil L, Tomkowiak M, Angelov G, Walzer T, Dubois P, Marvel J. In vivo impact of CpG1826 oligodeoxynucleotide on CD8 T cell primary responses and survival. J Immunol. 2003;171:2995-3002.
102. Schwarz K, Storni T, Manolova V, et al. Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. Eur J Immunol. 2003;33:1465-1470.
103. Burns RP, Jr., Ferbel B, Tomai M, Miller R, Gaspari AA. The imidazoquinolines, imiquimod and R-848, induce functional, but not phenotypic, maturation of human epidermal Langerhans' cells. Clin Immunol. 2000;94:13-23.

104. Wang B, Amerio P, Sauder DN. Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. J Leukoc Biol. 1999;66:33-39.
105. Chan CW, Crafton E, Fan HN, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. Nat Med. 2006;12:207-213.
106. Johnson BD, Konkol MC, Truitt RL. CD25+ immunoregulatory T-cells of donor origin suppress alloreactivity after BMT. Biol Blood Marrow Transplant. 2002;8:525-535.
107. Xia G, Truitt RL, Johnson BD. Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras. Biol Blood Marrow Transplant. 2006;12:397-407.
108. Johnson BD, Truitt RL. Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. Blood. 1995;85:3302-3312.
109. Billiau AD, Fevery S, Rutgeerts O, Landuyt W, Waer M. Crucial role of timing of donor lymphocyte infusion in generating dissociated graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses in mice receiving allogeneic bone marrow transplants. Blood. 2002;100:1894-1902.
110. Dummer W, Niethammer AG, Baccala R, et al. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. J Clin Invest. 2002;110:185-192.
111. Zhang Y, Shlomchik WD, Joe G, et al. APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8+ T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease. J Immunol. 2002;169:7111-7118.
112. Perreault C, Pelletier M, Belanger R, et al. Persistence of host Langerhans cells following allogeneic bone marrow transplantation: possible relationship with acute graft-versus-host disease. British Journal of Haematology. 1985;60:253-260.
113. Collin MP, Hart DN, Jackson GH, et al. The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. J Exp Med. 2006;203:27-33.
114. Mayerova D, Parke EA, Bursch LS, Odumade OA, Hogquist KA. Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. Immunity. 2004;21:391-400.
115. Garg S, Oran A, Wajchman J, et al. Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells in vivo. Nat Immunol. 2003;4:907-912.
116. Lapp WS, Ghayur T, Mendes M, Seddik M, Seemayer TA. The functional and histological basis for graft-versus-host-induced immunosuppression. Immunol Rev. 1985;88:107-133.
117. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. Annu Rev Immunol. 1993;11:385-402.
118. Burakoff SJ, Finberg R, Glimcher L, Lemonnier F, Benacerraf B, Cantor H. The biologic significance of alloreactivity. The ontogeny of T-cell sets specific for alloantigens or modified self antigens. J Exp Med. 1978;148:1414-1422.
119. Luznik L, Fuchs EJ. Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation. Cancer Control. 2002;9:123-137.

120. Bethge WA, Hegenbart U, Stuart MJ, et al. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. Blood. 2004;103:790-795.
121. Peggs KS, Thomson K, Hart DP, et al. Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism, and disease responses. Blood. 2004;103:1548-1556.
122. Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. Nat Immunol. 2004;5:508-515.
123. Weiden PL, Storb R, Tsoi MS, Graham TC, Lerner KG, Thomas ED. Infusion of donor lymphocytes into stable canine radiation chimeras: implications for mechanism of transplantation tolerance. J Immunol. 1976;116:1212-1219.
124. Tutschka PJ, Ki PF, Beschorner WE, Hess AD, Santos GW. Suppressor cells in transplantation tolerance. II. maturation of suppressor cells in the bone marrow chimera. Transplantation. 1981;32:321-325.
125. Tsoi MS, Storb R, Dobbs S, Thomas ED. Specific suppressor cells in graft-host tolerance of HLA-identical marrow transplantation. Nature. 1981;292:355-357.
126. Johnson BD, Becker EE, LaBelle JL, Truitt RL. Role of immunoregulatory donor T cells in suppression of graft-versus-host disease following donor leukocyte infusion therapy. J Immunol. 1999;163:6479-6487.
127. Blazar BR, Lees CJ, Martin PJ, et al. Host T cells resist graft-versus-host disease mediated by donor leukocyte infusions. J Immunol. 2000;165:4901-4909.
128. Billiau AD, Fevery S, Rutgeerts O, Landuyt W, Waer M. Transient expansion of Mac1+Ly6-G+Ly6-C+ early myeloid cells with suppressor activity in spleens of murine radiation marrow chimeras: possible implications for the graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactivity of donor lymphocyte infusions. Blood. 2003;102:740-748.
129. Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. Nat Immunol. 2005;6:769-776.
130. Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, et al. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. Blood. 2006;108:544-550.
131. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. J Clin Invest. 2003;111:1571-1578.
132. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2001;1:135-145.
133. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216.
134. Baron F, Baker JE, Storb R, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. Blood. 2004;104:2254-2262.
135. Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. Blood Rev. 2005;19:153-164.

136. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. J Clin Oncol. 2005;23:1993-2003.
137. Durakovic N, Bezak KB, Skarica M, et al. Host-Derived Langerhans Cells Persist after MHC-Matched Allografting Independent of Donor T Cells and Critically Influence the Alloresponses Mediated by Donor Lymphocyte Infusions. J Immunol. 2006;177:4414-4425.
138. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. J Immunol. 2004;172:7393-7398.
139. Durakovic N, Radojcic V, Skarica M, et al. Factors governing the activation of adoptively transferred donor T cells infused after allogeneic bone marrow transplantation in the mouse. Blood. 2007;109:4564-4574.
140. Chakraverty R, Cote D, Buchli J, et al. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. J Exp Med. 2006;203:2021-2031.
141. Heidt PJ VJ. Experimental and clinical gnotobiotics: influence of the microflora on the graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. J Med. 1992;23:161-173.

11. Životopis

Rođena sam 1975. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. 2000. diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2001. do 2004. godine radila sam kao znanstveni novak na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Johns Hopkins u Baltimoreu, USA, pod mentorstvom dr. Lea Luznika. Od 2004. godine radim kao znanstveni novak na projektu prof.dr. Damira Nemeta. 2003. godine upisala sam doktorski studij «Biomedicina i zdravstvo» na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2006. godine sam na specijalizaciji iz interne medicine za Katedru za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Moj glavni znanstveni interes predstavljaju hematološke maligne bolesti, biologija transplantacije koštane srži te bolest davatelja protiv primatelja (GVHD).