Doktori (Ph.D.) – értekezés

# A CD44 ÉS L-SZELEKTIN LEUKOCITA-ENDOTÉL INTERAKCIÓKBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA GYULLADÁSOS EGÉRMODELLEKBEN

Készítette:

# GONDA ANDREA DR.

Programvezető:

Prof. Dr. Zeher Margit M.D., D.Sc. Témavezetők:Prof. Dr. Hunyadi János, M.D., D.Sc.

Prof. Dr. Mikecz Katalin, M.D., Ph.D.

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum DEBRECEN 2006

1. BEVEZETÉS	3
2. CÉLKITŰZÉS	11
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	12
3.1. CD44, L-szelektin, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerek	12
3.2. Immunizáció, OVA indukált allergiás dermatitisz,	
ill. antigén indukált artritisz (AIA) létrehozása	13
3.3. OVA és BSA specifikus antitest meghatározás	14
3.4. Antigén specifikus immunválasz meghatározása, citokinek mérése	15
3.5. Áramlási citometria	15
3.6. Intravitális mikroszkópia (IVM)	16
3.7. Fülvastagság mérése, hisztológia, immunhisztokémia	
3.8. Statisztikai analízis	

<ul> <li>4.1. Sejtfelszíni CD44 és L-szelektin expresszió mBSA-immunizált vad típusú, CD44, ill. L-szelektin deficiens, valamint CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben 20</li> <li>4.2. OVA specifikus immunválasz a vad típusú, CD44, L-szelektin, ill.</li> </ul>	
ill. L-szelektin deficiens, valamint CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben 20 4.2. OVA specifikus immunválasz a vad típusú, CD44, L-szelektin, ill.	
4.2. OVA specifikus immunválasz a vad típusú, CD44, L-szelektin, ill.	0
CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben.	1
4.3. Antigén specifikus immunválasz mBSA-val immunizált vad típusú, CD44,	
L-szelektin ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben. 23	3
4.4. Fülkagyló ödéma kialakulása az OVA intradermális injekciója után2	5
4.5. Térdízületi duzzanat létrejötte mBSA intraartikuláris injekciója után20	6
4.6. Leukocita-endotél interakciók az egérfül posztkapilláris venuláiban 22	7
4.7. Leukocita-endotél interakciók a gyulladt térdízület szinoviális membránjában30	0
4.8. Az OVA injektált fülek szövettani feldolgozása33	3
4.9. Egér térdízületek szövettani feldolgozása 33	5
4.10. Leukociták az artritiszes izületben ill. periferiás vérben a vad típusú, CD44,	
L-szelektin, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben3	7
5. MEGBESZÉLÉS 4	0
6. ÚJ EREDMÉNYEK 49	9
	1
7. USSZEFUGLALAS 5.	T
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS53	3
9. RÖVIDÍTÉSEK 54	4
10. HIVATKOZÁSOK 55	5
11. A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS BESZÁMOLÓK	-
JEGYZÉKE6	3

### BEVEZETÉS

A szervezetet érő gyulladásos stimulus hatására intenzív fehérvérsejt áramlás indul az érintett szövet felé. A posztkapilláris venulák területén végbemenő leukocita extravazációt a gyulladásos sejtek érfallal történő laza kapcsolódása előzi meg, mely megteremti a feltételét az endotél mentén végbemenő gördülő mozgásnak (rolling) (1). Ez utóbbi reverzibilis tapadás során a leukociták mozgása lelassul, a lokálisan felszabaduló kemokinek hatására a fehérvérsejtek aktiválódnak, és alkalmassá válnak az immár irreverzibilisnek tekinthető szoros ("firm") adhézióra, mely közvetlenül megelőzi a fehérvérsejtek érpályából történő kilépését (2). Hasonló, többlépcsős folyamat megy végbe a leukociták nyirokszövetbe vándorlása (homing) során is.

Ez a máig nem minden részletében ismert folyamat különböző, a fehérvérsejtek, ill. az endotélsejtek felszínén lévő adhéziós molekulák közötti specifikus interakció eredménye. A laza kapcsolódás és gördülő mozgás létrejöttében a szelektinek (L-szelektin , Eszelektin, P-szelektin) és karbohidrát ligandjainak kapcsolódása döntő jelentőséggel bír (2;3).

Az L(leukocita)-szelektin (CD62L) а fehérvérsejtek felszínén konstitutívan expresszálódik. A limfociták perifériás nyirokcsomóba történő vándorlását kísérő rollingban ennek a szelektin molekulának tulajdonítanak elsősorban szerepet (4), de meghatározó jelentőségű az inflammatórikus folyamatokban is. Néhány perccel a szöveti sérülést követően ugyanis a gyulladás generálásában részt vevő fehérvérsejtek az érintett szövetet ellátó erekbe vándorolnak, és a felszínükön lévő L-szelektin molekula segítségével lazán, reverzibilisen kapcsolódnak az endotéllel. Ezt a jelenséget segíti a molekula elhelyezkedése a fehérvérsejtek mikrovillusainak tetején (5;6). Kimutatták, hogy az L-szelektin molekulához kapcsolódó karbohidrát komponensek (sialyl Lewis<sup>x</sup>) a vaszkuláris E- és P-szelektinek számára is ligandként szolgálnak, emellett a gyulladásos sejtek lelassulását egy szekunder adhéziós mechanizmus, a sejt felszíni L-szelektin valamint a fehérvérsejtek PSGL-1 (P-szelektin glikoprotein ligand-1) molekulái közötti kapcsolódás, tehát egy leukocita-leukocita interakció is segíti (7). A keringő, illetve nem aktivált fehérvérsejtek nagy mennyiségben expresszálnak L-szelektint, majd az érfallal történő kapcsolódás, valamint neutrofil aktiváció után a molekula denzitása annak leválása ("shedding") miatt jelentősen csökken (8).

Az E-és P-szelektinek gyulladásos stimulus hatására az endotél sejtek felszínén expresszálódnak, ligandjaik a leukociták felszínén található glikoproteinek (pl.PSGL-1) (3;9). A P-szelektin molekula az endotél sejtek un. Weibel-Palade testecskéiben, és a vérlemezkék  $\alpha$ -granulumaiban preformáltan van jelen, és akut gyulladás esetén innen rapidan mobilizálódik, míg az E-szelektin IL-1, TNF $\alpha$ , vagy más citokinek hatására de novo szintetizálódik (10;11).

Proinflammatórikus vagy "homing" kemokinek hatására a gördülő mozgást végző fehérvérsejtek felszínén  $\beta_1$  (másnéven VLA-4, "very late activation Ag"), vagy  $\beta_2$  (Mac-1 vagy LFA-1,"Leukocyte-Function-Ag") integrin aktiváció történik (12), melyek az endotél membránján lévő megfelelő receptoraikkal (VCAM-1, vagy ICAM-1) reakcióba lépve a leukociták megállását és a véráramlás által már nem megszüntethető szoros adhézióját biztosítják (13-15). A VLA-4 molekula kivételével (16) az integrinek nem képesek a keringő fehérvérsejtek sejtfalhoz kötésére megelőző rolling mozgás nélkül (2). A CD44 molekula egy transzmembrán glikoprotein, mely hasonlóan a szelektinekhez a leukociták érfal menti gördülését segíti az aktivált endotél felszínén található hialuronsav felismerése és megkötése révén (17;18). A CD44 számos sejttípus membránjában megtalálható, beleértve a fehérvérsejteket és endotél sejteket is. Ezt a molekulát az aktivált T sejtek gyulladásos szövetbe történő vándorlásában kulcsfontosságúnak tartják

(18-20). Mindemellett malignus tumorok hematogén úton végbemenő metasztatizálásában is szerepet tulajdonítanak a CD44 expresszió mértékének (21-24) (1. ábra).



**1. ábra.** A leukocita-endotél interakciókban résztvevő molekulák és kapcsolódások. A gyulladásos stimulus hatására végbemenő fehérvérsejt extravazáció folyamata.

Proinflammatórikus stimulusok hatására a CD44 molekulának mind sejtfelszíni denzitása, mind hialuronsav kötő képessége változik, ugyanakkor az endotél felszínén is fokozódik a hialuronsav expresszió, s ez a magas lokális ligand sűrűség tovább segíti a CD44 molekula dependens interakciók erősségét (17;25-28). A CD44 citoplazmatikus "farok" részén ezrinnel (29;30) interakcióba lépő szakasz, ill. ankirin kötő hely is található (31). Ezen citoszkeletális molekulákkal való kapcsolatnak szerepe lehet a CD44 molekula által mediált folyamatokban. A CD44 citoplazmatikus doménjének foszforilációja (32;33) ugyanis nem csak a hialuronsavon történő sejtmigrációhoz (33), de ezzel egyidőben a CD44 és ezrin kapcsolódásához is szükséges (32;33). Saját korábbi kísérleteinkben azonban, amikor *in vitro* körülmények között, immobilizált hialuronsav felszínén, folyadék áramlás alatt vizsgáltuk a CD44 molekula különböző szakaszain (extracelluláris, transzmembrán, vagy citoplazmatikus régió) létrejött mutációk hatását a rollingra és sejt adhézióra, azt tapasztaltuk, hogy a citoplazmatikus domén kevésbé, sokkal inkább az extracelluláris régió bizonyos defektusai befolyásolták a sejtek gördülő mozgását és kitapadását.

A CD44–ről kimutatták, hogy a fehérvérsejtek felszínén, szemben más adhéziós molekulákkal, melyek a mikrovillusok csúcsán találhatóak (L-szelektin, α4 integrin), inkább a citoplazmatikus kitüremkedések közötti membrán szakaszon foglal helyet (5;6). A sejtadhézióban részt vevő, hasonló lokalizációjú molekulákkal ellentétben, *in vitro* áramlási körülmények között, immobilizált ligandon a CD44 molekula képes rollingot iniciálni (6;34).

A CD44 és L-szelektin molekulák működését, esetleges működéskiesésük következményeit számos gyulladásos állatmodellben vizsgálták. A kapott eredmények néha ellentmondásosak, ami az adhéziós folyamatban részt vevő molekulák ill. interakcióik még nem teljesen feltérképezett voltára enged következtetni.

Anti-CD62L antitest autoimmun diabétesz egérmodelljében megakadályozta a betegség kialakulását (35), míg nem befolyásolta a Staphylococcus okozta szeptikus artritisz (36), valamint az experimentális allergiás enkefalomielitisz (EAE) súlyosságát (37). A CD44 molekula antitesttel történő blokkolása jelentősen csökkentette egerekben a kollagén- és proteoglikán indukálta artritisz (38-40), az EAE (37), a szuperantigén-indukált peritonitisz (19), valamint asztma bronchiale gyulladásos paramétereit (41;42).

A fenti két adhéziós molekula működését nemcsak antitestek használatával, hanem CD44 ill. L-szelektin deficiens egerekben is vizsgálták. Az L-szelektin molekulát kódoló génszakasz hiánya akut gyulladásos reakciók intenzitását csökkentette, pl. kontakt dermatitiszben, tioglikolát-indukálta peritonitiszben, és allograft rejekció során (43). Gyulladásos folyamatban a musculus cremaster posztkapilláris venuláiban CD62L molekula hiányában jelentősen mérséklődött a neutrofil extravazácio mértéke (44). Megjegyzendő azonban, hogy T sejt mediált inflammáció, mint pl. késői típusú túlérzékenységi reakció (45), vagy EAE (46) nem indukálható L-szelektin deficiens egerekben. Mivel a naiv T sejtek nyirokcsomóba vándorlásához, ill. a memória sejtek kialakulásához az L-szelektin molekula elengedhetetlen, az antigén specifikus T sejt válasz elmaradása miatt CD62L hiányában a gyulladásos reakció kialakulásának lehetősége jelentősen korlátozott (45;47).

A CD44 molekula expressziójának hiánya csökkentette DBA/1 egerek kollagén-indukált artritiszre való hajlamát (48). Ezzel ellentétben CD44 deficiens egerekben fokozódott a tüdőkárosodás mértéke bleomycin és Escherichia coli-indukált pneumoniában, míg ez nem volt megfigyelhető Streptococcus pneumoniae okozta pulmonális folyamatban (49;50).

Munkám során CD44, L-szelektin és CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben létrehozott két különböző gyulladásos modellben vizsgáltam a CD44, valamint Lszelektin molekulák izolált vagy együttes hiányának szisztémás antigénspecifikus immunválaszra, a gyulladásos reakciók morfológiai paramétereire, illetve az inflammált szövet posztkapilláris venuláiban zajló endotél-fehérvérsejt interakciókra kifejtett hatását. 1, Intraperitoneálisan csirke ovalbuminnal immunizálva az egyes egércsoportokat, majd meghatározott idő után ugyanazzal az antigénnel az egyik oldali fület intradermálisan oltva, abban allergiás dermatitiszt váltottunk ki, mely gyulladás több szempontból hasonlít az atopiás dermatitisz akut fázisára.

Az atópiás dermatitisz veleszületett atopiás hajlam alapján kifejlődő, multifaktoriális úton öröklődő, viszketéssel, száraz bőrrel járó, recidíváló gyakori bőrbetegség, mely legtöbbször már gyermekkorban megjelenik (51;52). A betegek közel 80%-ában különböző antigénekkel szemben termelt magas IgE szint mutatható ki (51-53). A betegség tüneteinek kifejlődésében a T sejtek kiemelt szereppel bírnak. Immunhisztológiai vizsgálatokkal a dermiszben makrofágok mellett mononukleáris sejtinfiltrációt lehet igazolni, mely főleg aktivált CD4+ T sejtekből áll (54). A gyulladás akut lézióiban szignifikánsan nő az IL-4, IL-5 citokineket termelő sejtek száma, utalva a Th2 típusú sejtek dominanciájára ebben a szakaszban. Krónikus fázisban mindemellett nagy számú Th1 limfocita is jelen van a dermatitisz területén (55).

Kísérleti állatok protein antigénnel (pl. ovalbumin) történő szenzitizálása után, ugyanazon antigénnel való lokális stimuláció egy bifázisos, Th2 típusú limfociták dominanciájával járó válaszreakciót eredményez (56). A humánhoz hasonlóan, az állatmodellekben kialakuló, atopiás dermatitiszre emlékeztető gyulladásos reakció az antigén expozíciót követően masztociták beáramlásával, illetve szöveti oedemával jellemezhető "azonnali válasszal" kezdődik ("immediate-phase response", IPR) (57). 4-6 órával később ezt egy "késői reakció" ("late-phase response", LPR) követi, melyet nagy számú fehérvérsejt dermiszbe áramlása (szövettanilag mononukleáris sejtek, neutrofilek, bazofil és eozinofil leukociták), illetve a szöveti duzzanat további fokozódása jellemez (58).

Az általam használt állatmodellben az intraperitoneálisan adott ovalbuminnal létrehozott szenzibilizálást követően adott antigén expozíció hatására (57;59) kialakuló allergiás dermatitis dinamikáját tekintve bifázisos jellegű és dominálóan Th2 típusú limfociták vesznek részt benne. Mindemellett az egerekben emelkedett ovalbumin specifikus IgE termelést igazoltunk (60), mely paraméter az előzőekkel együtt megerősíti a fülben kialakult bőrgyulladás atópiás dermatitiszhez való hasonlóságát (52-54;61).

2, Metilált borjú-szérum-albuminnal (mBSA) végzett szubkután/intradermális, illetve intraperitoneális immunizációt követően a vizsgálati egerek egyik oldali térdízületébe ugyanazon antigént injektálva abban artritiszt hoztunk létre (antigén-indukált artritisz, AIA) (62-65). A kialakult gyulladás hasonlóságokat mutat a reumatoid artritisszel (gyulladásos leukociták szinoviális infiltrációja, szinoviális hiperplázia, porcerozió) (65;66). Az egér artritiszek szisztémás autoimmun formáival szemben az AIA kezdete jobban meghatározható, hiszen az intraartikuláris injekció után rövid időn belül kialakul, emiatt a gyulladás paramétereinek időfüggő változásai jobban vizsgálhatók.

Mind az egérfül, mind a térdízület (67) alkalmas intravitális mikroszkópiával (IVM) végzett vizsgálatokra. Így az antigén-specifikus immunválaszok, illetve a létrejövő inflammációk morfológiai jellemzőin kívül IVM segítségével betekintést nyertünk a gyulladásban részt vevő effektor sejtek mozgásának kinetikájába is.

Munkám eredményeképpen megállapítható volt, hogy a Th2 sejtek által mediált allergiás dermatitisz kifejlődésében a CD44 molekula kritikus jelentőséggel bírt, míg az L-szelektin molekula hiánya nem befolyásolta szignifikánsan a gyulladás paramétereit.

Ezzel szemben az AIA esetében az L-szelektin hiánya késleltette a gyulladásos sejtek ízületbe vándorlását, míg a CD44 molekula csak kismértékben befolyásolta a granulocita influx mértékét.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során CD44, L-szelektin, és CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben ovalbuminnal intraperitoneálisan, illetve mBSA-val intrakután/szubkután, valamint intraperitoneálisan végzett immunizációt követően a megfelelő antigénnel allergiás dermatitisz, illetve antigén indukált artritiszt hoztunk létre.

A fenti állatmodellek segítségével választ kerestem a következő kérdésekre:

1, Intraperitoneális immunizációt követően, L-szelektin hiányában kiváltható-e lokális gyulladásos reakció?

2, Az egyes adhéziós molekulák hiánya hogyan befolyásolja a kialakult inflammatórikus folyamatok morfológiai jellemzőit?

3, A CD44 és L-szelektin molekulák együttes hiánya additív vagy szinergista módon negatív hatással van-e a vizsgált gyulladásos folyamatok paramétereire?

4, Intravitális mikroszkópiával vizsgálva milyen a gyulladásban részt vevő leukociták és az endotél sejtek kölcsönhatásának kinetikája, és ezt hogyan befolyásolják a vizsgált adhéziós molekulák?

## 3.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 3.1. CD44, L-szelektin, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerek

CD44 deficiens egereket célzott gén diszrupcióval hoztunk létre (48), míg az L-szelektin hiányos állatok beszerzése a The Jackson Laboratory-ból (Bar Harbor, ME) történt. Mindkét géndeficiens vonalat BALB/c egerekbe kereszteztük vissza hat generáción keresztül (68;69). A visszakeresztezéshez felhasznált BALB/c törzsek a National Cancer Institut (Frederick, MD) állományából származtak. A CD44 és L-szelektin hiányos állatokat egymással keresztezve kaptuk meg a mindkét molekulára nézve deficiens egereket (dupla knockout).

A genomikus DNS szűrésére polimeráz láncreakciót (PCR) használtunk, mellyel kimutatható volt a *cd44*, ill. *cd62l* gén, ill. a neomycin (*neo*) és puromycin (*puro*) rezisztencia gének jelenléte a *cd44* (48) és *cd62l* (70) locusok targetált konstrukcióiban.

A vizsgálatokban vad típusú  $(cd44^{+/+}/cd62l^{+/+})$ , CD44 deficiens  $(cd44^{-/-}/cd62l^{+/+})$ , Lszelektin deficiens  $(cd44^{+/+}/cd62l^{-/-})$ , valamint dupla deficiens  $(cd44^{-/-}/cd62l^{-/-})$  utódokat használtunk, amelyek a targetált lokuszoktól eltekintve azonos genetikai háttérrel rendelkeztek. A géndeficiens állatok nem mutattak fokozott fogékonyságot a fertőzésekkel szemben, így azokat standard körülmények között tenyésztettük.

A kísérletes munkánkat az Animal Care and Use Committee of Rush University Medical Center ellenőrizte és hagyta jóvá.

# 3.2. Immunizáció, OVA indukált allergiás dermatitisz, ill. antigén indukált artritisz (AIA) létrehozása

### 3.2.1. Allergiás dermatitisz

8-10 hetes vad típusú, CD44, L-szelektin és CD44-L-szelektin dupla deficiens egereket 0,5 ml aluminium hidroxid gélben (6,5mg Al(OH)<sub>3</sub>) oldott és gamma sugárzással (20Gy) sterilizált 10 μg csirke ovalbuminnal intraperitoneálisan injektáltunk, majd a procedúrát azonos mennyiségű OVA-val 3 hét múlva megismételtük. A nem-szenzitizált kontroll állatoknál az OVA helyett PBS-t használtunk. 2 héttel a második intraperitoneális injekció után a lokális allergiás reakciót 10 μl steril PBS-ben bevitt 5 μg OVA-val váltottuk ki, melyet az immunizált egerek egyik fülének ventralis oldalára intradermálisan fecskendeztünk. Az ellenoldali fül bőrébe csak PBS került (57;71;72).

### 3.2.2. Antigén-indukált artritisz

Metilált borjú szérum albumint (mBSA) PBS-ben oldottunk, majd gamma sugárzással (20Gy) sterilizáltunk. Mivel az mBSA csak részlegesen oldódott, a protein koncentrációját a bicinchoninic protein assay (Pierce, Rockford, IL) segítségével 1-5mg/ml-re állítottuk be. A vad típusú és deficiens egerek 100 µl komplett Freund adjuvánsban (KFA) emulzifikált 100 µg mBSA-t kaptak szubkután a talpukba és a farok tövébe. Az állatok egy másik csoportja azonos mennyiségű antigént intraperitoneálisan kapott. A beavatkozást mindkét egércsoportban 2 hét múlva megismételtük. 2-3 héttel az immunizáció után az állatokat elaltattuk, majd a jobb térdízületbe 6 µl PBS-ben oldott 30µg mBSA-t, míg a bal térdízületbe 6 µl PBS-t (antigén nélkül) injektáltunk (64;65). Az injekciót követő 4h és 5 nap között meghatározott időpontokban monitoroztuk az egerek térdízületeit, mikrokaliperrel mérve az ízület átmérőjét.

### 3.3. OVA és mBSA specifikus antitest meghatározás

Az OVA intradermális injektálása után 24 órával, míg az artritiszes állatmodellben az intraartikuláris provokáció után 5 nappal az egereket lelöltük, szérumaikat összegyűjtöttük. Az antigén specifikus IgE szinteket ELISA technikával mértük tisztított anti-IgE antitest és biotin konjugált OVA felhasználásával (59). A Maxisorp mikrotiter lemez (Nunc, Rochester, NY, USA) lyukait patkányban termelt egér ellenes IgE monoklonális antitesttel fedtük (0,15µg/lyuk) (klón R35-72, BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA, USA). A nem specifikus kötődést 3%-os BSA-t (Sigma) tartalmazó PBS-sel blokkoltuk. A szérumokat növekvő higításban (1:50-1:12500) vittük fel a lyukakra, és egy éjszakát 4°C-on inkubáltuk. A lekötődött OVA specifikus IgE molekulák kimutatása céljából a lemezt biotinilált OVA jelenlétében 2 órán keresztül inkubáltuk, majd a HRPO ("horseradish peroxidase")-konjugált streptavidin (Zymed, San Francisco, CA, USA), ill. *o*-phenylendiamin és hidrogén-peroxid jelenlétében kialakult színreakciót 490nm-en ELISA leolvasóval mértük. A koncentrációk pontos meghatározásához standardként biotinilált egér ellenes IgE (klón R35-92) segítségével detektált, növekvő koncentrációjú tisztított egér IgE (BD Pharmingen) szolgált.

Az OVA és BSA specifikus IgG1 és IgG2a antitestek mérése szintén ELISA technikával történt. A Maxisorp lemez (Nunc, Roskilde, Dánia) lyukait 0,5 μg OVA-val, ill. 0,1 μg BSA-val fedtük. A szérumok növekvő higításait a nem specifikus kötődés kivédése után meghatározott ideig inkubáltuk. Az OVA- ill. BSA-specifikus antitestek izotípusainak koncentrációját peroxidáz-konjugált patkány anti-egér IgG1-el és IgG2a-val (Zymed, San Francisco, CA, USA), mint szekunder antitestekkel határoztuk meg (68;69;73) A szérum antitest koncentrációkat a megfelelő egér IgG izotípus standardok (valamennyi a Zymedtől) vagy tisztított egér IgG (Sigma-Aldrich) révén számítottuk ki (68;69;73).

### 3.4. Antigén specifikus immunválasz meghatározása, citokinek mérése

A leölt állatok lépéből frissen izolált sejteket az OVA és BSA specifikus T sejt válaszok mérésére használtuk (48;74). Az OVA-ra adott specifikus válasz mérésénél a sejteket 10% fötális borjú szérum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA) jelenlétében Dubecco's Modified Eagle mediumban (DMEM, Sigma) szuszpendáltuk, majd 3x10<sup>5</sup> sejt/lyuk mennyiségben 96 lyukú lemezbe helyeztük. BSA stimulációnál az inkubációs tápfolyadék szérum mentes HL-1 medium (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) volt. Az antigén specifikus válaszokat 50 µg OVA/lyuk ill. 50µg/ml BSA jelenlétében négy párhuzamos mintában mértük. A T sejt proliferációt az ötödik napon határoztuk meg megmérve a <sup>3</sup>H-timidin beépülést (68;69;73;75). Az antigén specifikus T sejt választ (a direkt T sejt proliferációt) stimulációs indexben fejeztük ki, amely az antigén stimulált tenyészetekben és a nem stimulált kultúrákban jelenlétő inkorporált <sup>3</sup>H-timidin percenkénti beütésszámának arányaként definiálható.

Az OVA intradermális injektálása után 24 órával az egerek szubmandibuláris nyirokcsomóiból is izoláltunk limfocitákat, és a fent leírt módon határoztuk meg az antigén specifikus T sejt választ.

Az interferon-γ (IFNγ), interleukin-4 (IL-4) antigén specifikus termelődését, pontosabban a citokinek koncentrációját a sejttenyészet felülúszójában ( $3x10^6$  sejt/ml), a tenyésztés negyedik napján ELISA technikával mértük meg (BD Biosciences, San Diego, CA, USA vagy R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (68;69;73).

### 3.5. Áramlási citometria

A sejtfestéshez felhasznált antitesteket az anti-CD44 monoclonális ellenanyag (IRAWB14) kivételével a BD Pharmingen-től (San Diego, CA) szereztük be (76;77). Az AIA indukció után 1 nappal az állatok egy részét (minden egércsoportban) leöltük, lépsejtjeit izoláltuk, anti

egér CD62L (MEL-14), ill. IRAWB14 antitestekkel inkubáltuk, majd fikoeritein(PE)konjugált streptavidinnel festettük (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A korai aktivációs limfocita marker CD69 expresszió meghatározásánál kettős fluoreszcens festést alkalmaztunk (anti-CD3-PE és anti-CD69-FITC a T sejteknél, valamint biotinilált anti-CD19 és streptavidin-PE anti-CD69-FITC kombinációt a B sejteknél) (74).

Emellett gyulladásos sejteket gyűjtöttünk a térdízületekből 4, 24 órával, ill. 5 nappal az intraartikuláris mBSA injekció után. Az ízületi üregből, ill. szinoviális membránról PBS-be finoman belekapart sejtek felszínén (csoportonként 4-4 ízületből gyűjtve) a CD44 ill. CD62L molekulákon kívül a granulocita marker Gr1 (Ly-6G, klón RB6-8C5), ill. CD3 (klón 145-2C11) expressziót is vizsgáltuk.

Az ízületi mBSA injekció után 4, ill. 24 órával az anesztetizált állatok retroorbitális üregéből vért vettünk, majd ennek hemolizálása után a leukociták granulocita specifikus adhéziós molekuláit vizsgáltuk (L-szelektin, Mac-1, LFA-1, VLA-4, PSGL-1) kettős fluoreszcens festéssel, melynek során a sejteket együtt inkubáltuk biotinilált, vagy PE-konjugált anti Gr-1-gyel valamint biotinilált, vagy PE-konjugált adhéziós molekula specifikus monoklonális antitesttel. A biotinnal jelzett antitestek kötődését AlexaFluor488-konjugált streptavidinnel tettük láthatóvá (Molecular Probes).

A szimpla ill. dupla festésű áramlási-citometria FACScan berendezéssel és CellQuest analysis software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) segítségével valósult meg.

### 3.6. Intravitális mikroszkópia (IVM)

### 3.6.1. Egérfül ereinek IVM vizsgálata

Az atopiás dermatitiszre emlékezető allergiás reakció kezdeti fázisának vizsgálata során külön csoportokban vizsgáltuk az oltás előtti (0h), valamint az OVA expozíciót követő 1, 2, 6, 12 és 24 órával kialakult leukocita áramlást. A mikroszkópizálás előtt az állatokat

intramuszkulárisan adott ketamin-xylazin koktéllal elatattuk, majd minden egér retroorbitális plexusából vért vettünk fehérvérsejt meghatározás céljából. A konstans testhőmérsékletet fenntartandó az állatok köré gézt csavartunk, majd üveglapra helyeztük őket. A vizsgálandó fület óvatosan kisimítottuk, majd immerziós olaj segítségével rögzítettük és az intravitális mikroszkóp 10x-es nagyítású objektívje alá helyeztük (model E600FN, Nikon, Garden City, NY, USA). A fehérvérsejteket intravénásan adott, *in vivo* adhéziójukat nem befolyásoló, fluorescens, sejt-permeabilis, DNS-hez kötődő rhodamine 6G festékkel tettük láthatóvá (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (78;79).

### 3.6.2. Egér térdízület IVM vizsgálata

A BSA-val injektált térdízület szinoviumát az ízület elülső oldaláról közelítettük meg (67). Az egereket ketamin-xylazin keverékkel anesztetizáltuk, majd hátukra fektetve egy üveglemezre helyeztük. A térdízületet speciális gumitámaszték segítségével rögzítettük. A bőr átmetszése után a ligamentum patellae-t sterilen felpreparáltuk. Mivel a térdszalag és az alatta fekvő lágy szövetek között közvetlen érösszeköttetés nincs (80), a ligametum felemelése a vizsgálandó erek sérülése nélkül elvégezhető volt. Ezután az állatokat az intravitalis mikroszkóp alá helyeztük. A nyitott térdízület szinoviális membránját folyamatosan áramoltatott steril meleg (37°C) PBS-sel tartottuk nedvesen. A posztkapilláris venulákat 40x-es nagyítással vizsgáltuk. Hasonlóan az egérfül vizsgálatánál leírtakkal, a procedúra előtt vért vettünk az egerek retroorbitális plexusából fehérvérsejt meghatározás céljából, ezt követte a leukociták festése rhodamin 6G segítségével.

### 3.6.3."Real-time"felvételek, leukocita-endotél interakciók analízise

Az egérfül ill. térdízület szinovium postcapilláris venuláiban jelentkező fehérvérsejt áramlásról a meghatározott időpontokban 1-1 percig készítettünk felvételeket egy, a mikroszkóphoz csatlakoztatott digitális kamera segítségével (CoolSnap, RS Photometrics, Trenton, NJ, USA). "On-screen" caliper alkalmazásával hasonló átmérőjű ereket

választottunk ki (d= $35\pm5\mu$ m). A felvételek visszajátszásakor a kapott eredményket Metavue image analízis számítógépes programmal értékeltük. Vizsgálataink során a következő paramétereket határoztuk meg.:*a*, a rolling interakciók frekvenciája (az endotélium mentén egy perc alatt gördülő mozgást végző sejtek száma (81;82), *b*, rolling sebesség (µm/sec), *c*, adherens (szorosan tapadó) sejtek száma (legalább 30 másodpercig mozdulatlan sejtek), melyet a vizsgált venula 100µm hosszú szakaszára vonatkoztattunk.

A vizsgálat elején levett vérmintákban Türk oldat segítségével meghatároztuk a fehérvérsejtszámot, ill. Giemsa-val történt festést követően a polimorfonukleáris és mononuclearis sejtek arányát.

### 3.7. Fülvastagság mérése, hisztológia, immunhisztokémia

Az egérfül vastagságát mikrokaliper (Wilha Werkzeuge GmbH, Germany) segítségével határoztuk meg az intradermális oltás előtt (0 h), valamint 1, 6, 12 és 24 órával az antigén expozíciót követően. Az 1 és 24 órás mérések után az egerek egy részét leöltük, és az érintett füleket szövettani feldolgozás céljából eltávolítottuk. Az anyagot részben paraffinba ágyaztuk, a metszeteket hematoxilin eozinnal, ill. szafranin O-val festettük, utóbbit a mastociták identifikálása céljából. A dermiszt infiltráló leukociták és mastociták számát fénymikroszkóppal (Nikon Microphot-FXA mikroszkóp, Nikon, Garden City, NY, USA) 100x-os nagyítás mellett metszetenként 10-10 "nagy nagyítású látótérben" (high power field, HPF, méretét tekintve 160 μm átmérőjű, tehát 2x10<sup>4</sup> négyzetmikron területű) határoztuk meg, és az értékeket átlagoltuk (állatcsoportonként 6-6 egeret felhasználva).

A fülek másik részéből immunhisztokémiai vizsgálatok céljából fagyasztott metszetek készültek (48). Az acetonnal fixált mintákon a nemspecifikus kötődést 5%-os normál kecske szérummal védtük ki. A granulocitákat és T helper sejteket biotinilált patkány anti-egér Gr-1 (BD Pharmingen), ill. anti CD4 (R&D Systems) monoklonális antitestekkel jelöltük, majd a

kötődést HRPO-konjugált streptavidin, hidrogén-peroxid és diaminobenzidin kromogén (DAB tabletta, Sigma) segítségével tettük láthatóvá. A Gr-1 ill. CD4 pozitív, valamint az ezekkel az antitestekkel nem festődő leukociták számát egyaránt meghatároztuk.

A BSA-val injektált ízületek szövettani feldolgozása során (az oltás után 4, 24 órával ill. 5 nappal) a térdízületeket formalinban fixáltuk, dekalcifikáltuk, majd paraffinba ágyazás után metszettük, és hematoxilin eozinnal festettük.

### 3.8. Statisztikai analízis

Statisztikai analízist az SPSS program 7.5 verzióját használva végeztünk (SPSS, Chicago, IL, USA). Mann-Whitney és Wilcoxon teszteket alkalmaztunk csoportok közötti összehasonításra. A 0,05-nél kisebb P értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## **4.EREDMÉNYEK**

# 4.1. Sejtfelszíni CD44 és L-szelektin expresszió mBSA-immunizált vad típusú, CD44 ill. L-szelektin deficiens, valamint CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben

A gén-targetált egerek frissen izolált lépsejtjeinek felszínén áramlási citometria segítségével határoztuk meg a CD44 ill. L-szelektin expressziót (2.ábra).



**2. ábra**. CD44 és L-szelektin expresszió az mBSA-val immunizált vad típusú (A,E), CD44 deficiens (B,F), L-szelektin (CD62L) deficiens (C,G) és dupla knockout egerek (D,H) lépsejtjeinek felszínén. Az izotípus kontroll áramlási citometriás görbéje pontozott vonallal, a vizsgált adhéziós molekulák sejtfelszíni denzitása kitöltött hisztogrammal van jelölve. A fluoreszcencia intenzitás mértéke az X, míg a sejtszám az Y tengely mentén van ábrázolva.

Ahogy várható volt, az egyes knockout csoportokban hiányzott az adott, "kiütött" gén által termelt molekula (a dupla knockout csoportban értelemszerűen mind a CD44, mind az L-szelektin sejtfelszíni megjelenése). Hasonlóan a CD44 deficiens egerek II típusú kollagénnel

történő immunizációja során tapasztaltakhoz (74), mBSA-immunizálás után a CD44 hiányos egerek lépsejtjeinek felszínén szignifikánsan kevesebb L-szelektin expresszálódott, mint a vad típusú állatoknál. Ugyanakkor az L-szelektin molekula hiánya nem befolyásolta a CD44 sejtfelszíni denzitását.

# 4.2. OVA specifikus immunválasz a vad típusú, CD44, L-szelektin, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben.

OVA-val történt intraperitoneális szenzitizáció, ill. intradermális injekció mérhető mennyiségű antigén-specifikus IgE termelődést eredményezett mind a négy állatcsoportban, megerősítve ezzel a bőrreakció allergiás jellegét (3. ábra) (59;71).



**3. ábra**. OVA-specifikus szérum IgE szintek összehasonlítása a vad típusú, CD44 deficiens, L-szelektin deficiens és CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben OVA-val történt intraperitoneális-szenzitizációt követő intradermális OVA injekció után.

Az OVA-specifikus szérum IgG1 szint többszöröse volt az antigén ellen termelődött IgG2a mennyiségének, mely az allergiás reakcióban részt vevő T sejtek populációján belül elsősorban a Th2 típusú sejtek dominanciájára utal (4. ábra, A, B).

A vizsgált antigén-specifikus immunglobulinok egyikénél sem tapasztaltunk a mért mennyiségek vonatkozásában szignifikáns különbséget az egyes egércsoportok között.

Az intraperitoneálisan PBS-Al(OH<sub>3</sub>) kombinációval injektált állatok szérumában OVA specifikus antitest nem volt kimutatható.



**4. ábra**. Szérum IgG1 (A) és IgG2a (B) szintek a vizsgált állatcsoportokban OVA expozíciót követően. A kontroll egerek (kontroll, PBS-inj) technikailag azonos módon, de PBS-sel voltak "kezelve". Az oszlopok csoportonként 6-8 állat adatait ábrázolják. (átlag±SD)

Az IgG1 izotípusú OVA-specifikus immunglobulin nagyobb mennyisége mellett az antigénstimulált lépsejtek felülúszójában meghatározott citokin profil is (5.ábra) megerősítette a Th2 limfociták domináns szerepét.



**5. ábra.** Lépsejtek felülúszójában mért IFN- $\gamma$  és IL-4 szintek az OVA-val szenzitizált állatokban. Csoportonként 6 egér mintájában mért értéket ábrázoltunk (átlag±SD). Sem az IFN- $\gamma$  sem az IL-4 esetében nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes egércsoportok között. Megjegyzendő, hogy az IFN- $\gamma$  koncentráció 50pg/ml alatt volt a PBS-sel injektált állatok lépsejtjeinek felülúszójában, míg ugyanezekben a mintákban IL-4-et nem tudtunk detektálni.

Az ovalbuminnal immunizált vad típusú és deficiens egerek lépsejtjeit *in vitro* OVA-Al(OH<sub>3</sub>)dal stimulálva azok mérhető mennyiségű Th1 típusú immunválaszra jellemző IFNγ-t termeltek. Ez a citokin szint azonban körülbelül ezredrésze a hasonló genetikai hátterű (BALB/c) egerek Th1 típusú immunválasz irányába polarizáló antigén-adjuváns (pl.kollagén-KFA) komplexszel történő immunizálása során mért értékeknek (83). Az izolált lépsejtek a Th2 típusú immunválaszra jellemző IL-4-ből is detektálható mennyiséget termeltek in vitro OVA-Al(OH<sub>3</sub>) stimulációt követően. Ez a citokin Th1 dominanciájú reakcióban hasonló vizsgálatban csak nyomokban mutatható ki. Az L-szelektin deficiens, ill. CD44-L-szelektin dupla knockout állatok lépsejt-szupernatánsaiban valamivel kevesebb IL-4 termelést mértünk, de a vad típusú egerek megfelelő értékéhez képest ez a különbség nem volt szignifikáns. Összehasonlítva a lépsejtek, illetve az OVA intradermális expozíciója után 24 órával gyűjtött szubmandibuláris nyirokcsomó sejtek OVA hatására létrejövő stimulációjának mértékét azt

tapasztaltuk, hogy L-szelektin izolált hiányában szignifikánsan alacsonyabb volt a stimulációs index a nodális limfociták esetében a lépsejtekéhez képest, tehát károsodott a regionális nyirokcsomókba irányuló limfocita "homing" (6.ábra).



**6. ábra.** OVA intradermális expozíciója után 24 órával gyűjtött submandibuláris nyirokcsomó sejtek OVA hatására létrejövő stimulációjának mértéke (SI: stimulációs index±SD). Az L-szelektin deficiens állatokban szignifikánsan alacsonyabb SI mérhető a vad típushoz képest, mely a limfocita "homing" sérülésére utal. (n=6/csoport)

# 4.3.Antigén specifikus immunválasz mBSA-val immunizált vad típusú, CD44, Lszelektin ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben.

Az antigén-indukált artritisz "hagyományos" kivitelezési módja során az intraartikuláris antigén injekciót szubkután és/vagy intradermális immunizáció előzi meg (84;85), melynek eredményeként az antigénprezentáció ill. az antigénspecifikus T sejtek kialakulása az injekció helyének megfelelő regionalis nyirokcsomókban megy végbe. Azonban ismert, hogy L-szelektin molekula hiányában a "naiv" T sejtek nyirokcsomóba irányuló "homingja"

korlátozott (4), ezért kután immunizáció során nem alakul ki tökéletes immunválasz az újabb antigén expozíciót követően (45). Kísérleteink során szubkután/intradermális mBSA immunizációkor az L-szelektin deficiens egerekben valóban szignifikánsan alacsonyabb T sejt stimulációt mértünk, mint a vad típusú, vagy CD44 knockout állatokban, míg az mBSA specifikus IgG termelést nem befolyásolta az L-szelektin molekula hiánya (7.ábra A, B).



**7. ábra** Immunválasz a vad típusú, CD44-deficiens, L-szelektin-deficiens és dupla KO egerekben s.c. (A, C) ill. i.p. (B, D) mBSA immunizációt követően. 8 nappal az immunizáció után határoztuk meg az Ag-specifikus T-sejt proliferációt (A, B) ill. mBSA specifikus IgG-t (C, D) (csoportonként 12 állat paramétereinek statisztikai átlaga). A szignifikás különbségeket csillaggal jelöltük (p<0,05). SI: stimulációs index.

Az mBSA intraperitoneális injektálásakor (mikor a regionalis nyirokszerv a lép) az Lszelektin deficiens egerekben is a vad típushoz hasonló normális T sejt választ detektáltunk (7. ábra C, D). Ez a tény megerősíti azt a feltételezést, hogy a limfociták lépbe történő vándorlása (és ottani aktiválódása) nem L-szelektin függő folyamat (86). A lépben történő azonos aktivációs státusz tényét támasztja alá, hogy a korai aktivációs marker CD69 molekulát (87) expresszáló szplenikus T ill. B sejtek aránya nagyon hasonló volt a vad típusú, ill. L-szelektin deficiens egerekben 24 órával az intraartikuláris mBSA injekció után  $(CD69^+/CD3^+ \text{ sejtek}: 35,7\pm8,2\% \text{ az L-szelektin hiányos egerekben, } 38,1\pm6,7\% \text{ a vad típusban; } CD69^+/CD19^+ \text{ sejtek aránya: L-szelektin knockoutban } 62,4\pm11,0\%, \text{ vad típusban } 58,5\pm8,9\%)$ . CD44 deficiens állatok lépsejtjeinek aktivációs státusza szintén nem mutatott szignifikáns különbséget a vad típusú egerekben meghatározott értékekhez képest  $(CD69^+/CD3^+ \text{ sejtek: } 41,1\pm12,2\% \text{ és } CD69^+/CD19^+ \text{ sejtek aránya: } 56,9\pm4,7\%)$ .

### 4.4. Fülkagyló ödéma kialakulása az OVA intradermális injekciója után

Az azonnali típusú immunválasznál leírtakhoz hasonlóan (57) 1 órával az OVA intradermális injektálása után a fülkagylók vastagsága növekedni kezdett mind a négy genotípusban (8.ábra).



**8. ábra**. Fülkagyló duzzanat kialakulása az OVA szenzitizált vad típusú (sötét kör), CD44 KO (üres négyzet), L-szelektin KO (üres háromszög) és dupla KO (üres kör) egerekben az idő függvényében intradermális OVA, vagy PBS injektálása után (kereszt). A fülvastagságot mikrokaliper segítségével mértük a 0. illetve az oltást követő 1., 6., 12., és 24. órában csoportonként 6-6- állatban. A szignifikáns különbségeket (p<0.05) csillaggal jelöltük.

Mivel a kontrollként használt PBS bőr alá juttatása is okozott az első órában enyhe oedemát, ez a korai fülduzzanat részben a fülmérethez képest nagy mennyiségű (10µl) folyadéknak, esetleg a szúrás okozta minor sérülésnek is lehet köszönhető. Az OVA oltást követő 6. és 24.

óra között a vad típusú, ill. L-szelektin deficiens állatokban az érintett fülkagylók vastagsága fokozatosan nőtt, és a kaliperrel meghatározott méretek szignifikánsan különböztek az ellenoldali, PBS injekció után kialakult oedemához képest. Ehhez képest CD44 molekula hiányában, ill. a dupla deficiens egerekben csak minimális vastagság növekedést észleltünk.

### 4.5. Térdízületi duzzanat létrejötte mBSA intraartikuláris injekciója után

Az intraperitoneális immunizációt követően a vad típusú, CD44, valamint L-szelektin deficiens, ill. CD44-L-szelektin dupla knockout egerek jobb térdízületébe mBSA-t, a bal oldalra steril PBS-t oltottunk. Az ezt követő 4. óra ill. 5. nap között meghatározott időpontokban monitoroztuk az artritisz létrejöttét (9.ábra).



**9.ábra**. Térdízületi duzzanat léterjöttének kinetikája AIA során a vad típusú, CD44 deficiens, L-szelektin deficiens és dupla KO egerekben. A térdízület átmérőjét frontális megközelítésben (csoportonként 15-15 állatban, átlag érték±SD) mikrokaliper segítségével mértük. A szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük (x: p<0.05; xx: p<0.001).

PBS injektálás után az ízületben gyulladásra utaló jeleket nem láttunk, bár az első órákban az érintett ízület átmérőjének minimális növekedését (<0.1mm) tapasztaltuk. mBSA hatására azonban mind a négy vizsgálati csoportban ízületi duzzanat jelentkezett, melynek kiteljesedését az oltást követően 24 órával láttuk. Az L-szelek, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens állatokban a térd megvastagodása szignifikánsan kisebb mértékű volt a vad típusú

egerekéhez képest minden vizsgálati időpontban, az oltást követő 12. óra, ill. 5. nap közötti intervallumban. A CD44 knockout egerekben is enyhébb duzzanat jelentkezett, de a mért értékek csak az 1. és 2. nap között voltak szignifikánsan alacsonyabbak a vad típusnál detektáltakhoz képest.

### 4.6. Leukocita-endotél interakciók az egérfül postcapilláris venuláiban

Mivel mind a CD44, mind az L-szelektin molekula szerepet játszik a leukocita-endotél interakciókban, érdekesnek ígérkezett annak vizsgálata, hogyan viselkednek a leukociták az egérfül vénáiban egy dominálóan Th2 limfocita populáció által mediált allergiás dermatitiszben, ha egyik vagy másik, illetve mindkét molekula hiányzik. A fehérvérsejtek gördülő mozgását, ill. szoros adhézióját vizsgáltuk az egérfül postcapilláris venuláiban OVA intradermális injekciója után intravitalis mikroszkopia (IVM) segítségével. Intravitális vizsgálatokat végeztünk közvetlen az OVA oltás előtt (0 h), valamint 1, 6, 12, és 24 órával az antigén expozíció (ill. PBS injekció) után. A videókról készült pillanatfelvételek ("snapshot") jól mutatják, hogy a vad típusú egerek fülében minimális leukocita áramlást tapasztaltunk az OVA injekció előtt, ugyanakkor számos fluoreszkáló, az endotéllel kapcsolatba lépő fehérvérsejtet detektáltunk 1, ill. 12 órával az antigén expozíció tkövetően (10.ábra).

 OVA injekció előtt - 0 óra
 OVA injekció után - 1 óra
 OVA injekció után - 12 óra

**10. ábra.** Pillanatfelvételek vad típusú, OVA-val immunizált, majd intradermálisan oltott egérfül posztkapilláris venulájáról az oltás előtt (A), valamint 1 (B) ill. 12 órával (C) az OVA injektálása után. A kontroll (A) fül szinte üresnek tűnik, mivel nagyon kevés leukocita lépett interakcióba az endotéllel, illetve a fehérvérsejtek nagy sebességgel haladtak át az adott érszakaszon, ami a felvételen nem rögzíthető. 1 órával az antigén expozíciót követően a leukocita-endotél interakciók száma jelentősen nőtt, amit a felvételen a fluoreszkáló sejtek

(fehér foltok) jelenléte jelez. (B). A fehérvérsejt forgalom 12 órával az OVA intradermális oltása után még kifejezettebb (C).

PBS hatására csak néhány gyorsan mozgó leukocitát, míg OVA expozíció után 1 órával mind a négy állatcsoportban gördülő mozgást végző és szorosan tapadó fehérvérsejtet egyaránt rögzítettünk a video felvételeken. Ez a jelenség, együtt az oltást követően rövid idő múlva megjelenő fül ödemával, az allergiás dermatitisz azonnali típusú komponensének felel meg.

Az IVM felvételek adatainak részletes feldolgozása során a vad típusú egereknél az OVA oltást követő 1. és 12. óra között a gördülő mozgást végző sejtek számának kontinuus növekedése, ill. ezt követően a rolling interakciók fokozatos csökkenése volt megfigyelhető (11. ábra).

A CD44 deficiens állatok esetében minden vizsgálati időpontban magas volt a gördülő sejtek száma, míg L-szelektin molekula hiányában a rollingban részt vevő fehérvérsejtek mennyisége fokozatosan csökkent az 1. és 24. óráig tartó intervallumban, illetve emelkedett az OVA oltást követő 6.és 24. óra között a dupla deficiens egerekben.

A gördülő mozgás sebessége az oltást követően mért magasabb értékhez képest mind a négy állatcsoportban fokozatos csökkenést mutatott az idő előrehaladtával. Ennek mértéke a dupla knockout egerekben volt a legkisebb. A rolling sebesség 1 órával az antigén expozíció után a CD44 ill. L-szelektin deficiens csoportban volt a legmagasabb, de az 1. és 6. óra között a lassulás mértéke kifejezettebb volt az L-szelektin hiányos állatokban, mint a CD44 knockout egerekben.

A szorosan adheráló sejtek mennyisége fokozatosan emelkedett az első 12 órában, majd ezt követően csökkent a vad típusú, ill. L-szelektin deficiens állatokban. CD44 és dupla knockout egerekben azonban minden vizsgálati időpontban csak néhány kitapadt sejtet detektáltunk, tehát az endotéliummal szoros kapcsolatba lépő fehérvérsejtek száma ebben a két genotípusban szignifikánsan kevesebb volt, mint a vad típusú állatok fülében.

A videomikroszkópia előtt levett vénás vérben meghatározott fehérvérsejtszám mind a négy állatcsoportban hasonló értéket mutatott.



**11. ábra**.Leukocita-endotél interakciók kinetikája az OVA-val injektált egérfülekben a vad típusú, CD44 KO, L-szelektin KO és CD44-L-szelektin dupla KO egerek esetében. A rolling mozgást végző fehérvérsejtek számát (rollingoló sejtek száma/perc) (A), a rolling sebességet (μm/másodperc) (B), és a szorosan tapadó sejtek számát (sejt/100 μm venuláris szegment) (C) az OVA expozíciót követő meghatározott időpontokban ábrázoltuk. Az eredmények statisztikai átlagok±SD (csoportonként 8-11 egér minden időpontban). A vad típusú és KO csoportok közötti szignifikáns különbségeket a grafikonok mellett tüntettük fel.

### 4.7. Leukocita-endotél interakciók a gyulladt térdízület szinoviális membránjában

A szinoviális szövet felszabadítása anatomiai okokból vaszkuláris sérülés nélkül volt véghezvihető. A fiziológiáshoz hasonló körülményeket a szinovium meleg PBS-sel történő folyamatos "fürdetésével" biztosítottuk. Annak érdekében, hogy bepillantást nyerjünk az antigén indukált artritisz korai és késői fázisának leukocita forgalmába, 4, 12 és 24 órával ill. 5 nappal az mBSA intraartikuláris oltása után intravitális mikroszkópiával vizsgáltuk az érintett térdízületeket. Minden esetben az ellentétes oldali, PBS-sel injektált ízület szolgált referenciaként. A nem gyulladt, kontroll ízület szinoviumában csak néhány gördülő mozgást végző (sebesség>30µm/s) sejtet detektáltunk, míg szorosan tapadó leukocita egyáltalán nem volt. Ez a megfigyelés cáfolja az injekció, ill. az ízület feltárásához társuló szignifikáns trauma létrejöttét.



**12.ábra**. Leukocita-endotél interakciók kinetikája AIA-ben intravitális mikroszkópiával vizsgálva. A szinoviális membrán posztkapilláris venuláiban rolling mozgást végző sejtek ferkvenciáját (A) és a szorosan tapadó sejtek számát (B) 4, 12, 24 óra ill. 5 nappal az mBSA intraartikuláris oltását követően határoztuk meg. Az oszlopokban csoportonként 5-5 egér (mindegyiknél 2-3 érszakasz vizsgálva) esetében mért értékek statisztikai átlagát±SD

tüntettük fel. A vad típusú és KO csoportok közötti szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük.

A vad típusú egerek térdízületében intenzív leukocita áramlást találtunk az mBSA adása után (12. ábra). Az endotéllel interakcióba lépő sejtek nagy része szorosan tapadt az érfalhoz 4 órával az antigén injektálás után. Az AIA ezen korai fázisában a CD44 deficiencia ettől eltérő reakciót eredményezett: a szinoviális venulákban szignifikánsan több fehérvérsejt végzett gördülő mozgást, azonban csak kevés adheráló leukocita volt megfigyelhető. Hasonló mértékű volt a szoros tapadás redukciója az L-szelektin deficiens, ill. dupla knockout állatokban is. Az antigén expozíció után 12 órával a rollingoló sejtek frekvenciája kissé nőtt a vad típusú szinoviumban, ill. csökkent CD44 hiány esetén, míg az adheráló sejtek száma nem változott szignifikánsan a korábbi időponthoz képest. A szoros adhézió vonatkozásában a vad típusú, ill. deficiens egércsoportok között az AIA indukciója után 24 órával is jelentős különbség volt kimutatható.

A fehérvérsejt-endotél kölcsönhatás mértéke a gyulladás 1. napjára jelentősen csökkent,

és az 5. napon is alacsony maradt. Mivel a perifériás vérben meghatározott fehérvérsejtszám az intraperitoneális immunizáció után hasonló volt minden vizsgálati csoportban, a leukocitaérfal interakciók egyes genotípusok között talált különbségeit a kapott értékek cirkuláló fehérvérsejtre vonatkoztatott normalizációja nem befolyásolta.

A fehérvérsejtek minden deficiens csoportban gyorsabban gördültek, mint a vad típusú sejtek. Ez a jelenség legkifejezettebben 4 órával az mBSA oltás után volt detektálható. Az átlagos rolling sebesség minden knockout egérben magasabb volt a vad típushoz képest, de ez a különbség egyik vizsgálati időpontban sem volt szignifikáns.

A reprezentatív videofelvételek pillanatképein (13. ábra) jól látszik, hogy számos fluoreszcens leukocita lépett kapcsolatba az endotéllel a vad típusú állatok térdízületében 4 órával az antigén injekciót követően, míg ennél kevesebb fehérvérsejtet sikerült kimutatni az érfal

mentén a CD44, L-szelektin, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens állatcsoportban. A teljes videofelvételek kiértékelése során az AIA ezen korai fázisában a vad típusú és géndeficiens csoportok között a leukocita-endotél interakciók (rolling +szoros adhézió) szempontjából nagyobb különbséget várnánk. Azonban figyelembe kell vennünk, hogy a vad típusú szinoviális venulában a fehérvérsejtek nagy része kitapadt, míg a többi genotípusban inkább nagy sebességgel gördült (>60µm/s). Azok a sejtek pedig, amelyek ilyen gyorsan "rollingolnak", gyakorlatilag nem, vagy ritkán láthatók egy pillanatfelvételen.



**13.ábra**. Intravitális mikroszkópiával végzett vizsgálatok során készült pilanatfelvételek (A-D) a szinoviális membrán posztkapilláris venuláiról, illetve a megfelelő erek hisztológiai képe (E-H) a vad típusú (A és E), CD44-deficiens (B és F), L-szelektin-deficiens (C és G) és dupla KO (D és H) egerekben. Az intravitális felvételek jól mutatják a fluoreszcens fehérvérsejtek felszaporodását és adhézióját 4 órával az mBSA i.a. oltása után. Az adherens, ill. lassan rollingoló sejteket világos foltok jelzik, míg a gyorsan áthaladó sejtek gyakorlatilag nem ábrázolódnak. A szövettani képek a venula körüli extravazálódott sejteket mutatják közvetlenül a mikroszkópos vizsgálat után.(HE festés).

A gyulladásos sejtek endotélhez kapcsolódását egy szekunder adhéziós mechanizmus, a sejtfelszíni L-szelektin, valamint a fehérvérsejtek PSGL-1 molekulái közötti kapcsolódás is segíti (7). A vad típusú egerek szinoviális venuláiról készített videofelvételeken gyakran

láttuk a beáramló fehérvérsejtek laza kapcsolódását, ill gördülését már kitapadt leukocitákon. A legtöbb esetben ez a szekunder interakció a gördülő leukocita megállását eredményezte. A géndeficiens állatcsoportokban az összeütköző gördülő sejtek között kialakult kapcsolódások rövid életidejűek voltak, és ritkán vezettek szoros adhézióhoz.

### 4.8. Az OVA injektált fülek szövettani feldolgozása

Az OVA oltást követő 1 óra múlva feldolgozott fülek szövettani metszetén minden állatcsoportban kismértékű dermális ödéma volt megfigyelhető. Míg ovalbumin injekció előtt fehérvérsejtet, ill. masztocitát csak minimális mennyiségben találtunk a fül szöveteiben (átlagosan 0,3 leukocita és 0,1 masztocita/HPF), egy órával az antigén expozíciót követően mindkét sejttípusból ennek kb. tízszeresét tudtuk kimutatni a dermisben (2,6-3,3 leukocita/HPF és 0,8-1,2 masztocita/HPF) mind a 4 egércsoportban. 24 órával az antigén beszúrása után a vad típusú és L-szelektin deficiens állatok füleinek hám alatti kötőszövetében masszív fehérvérsejt infiltrátumot találtunk, míg láthatóan kevesebb gyulladásos sejt extravazálódott a CD44, ill. CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben (14. ábra, A). A szövetet infiltráló leukociták mennyiségének szemiquantitatív meghatározása során (HE metszeten) a CD44, ill. dupla deficiens állatokban szignifikánsan kevesebb fehérvérsejt hagyta el az érpályát, mint a vad típusú, ill. L-szelektin knockout egerek esetében (14. ábra, B). A sejtinfiltrátum nagy mennyiségben tartalmazott polimorfonukleáris sejtet, ill. néhány degranulált masztocitát (1,1-1,4sejt/HPF). Fagyasztott metszeten leukocita subpopuláció-specifikus antitestek használatával a fehérvérsejt gyülem területén elsősorban granulocitákat, ill. CD4<sup>+</sup> T sejteket detektáltunk a vad típusú, ill. L-szelektin hiányos fülekben, míg ezen sejtek mennyisége jelentősen kevesebb volt CD44, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiencia esetében. A sejtinfiltrátum "egyéb" kifejezéssel jelölt komponensei vonatkozásában az egyes genotípusok között nem volt szignifikáns különbség.



**14.ábra**. OVA-val injektált egérfülek hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálata 24 órával az oltást követően. A vad típusú ill. L-szelektin-deficiens egerek HE-nal festett metszeteiben (A) denz leukocita infiltrátum figyelhető meg a fülben, míg sokkal kevesebb az extravazálódott sejtek száma a CD44 KO és dupla deficiens állatokban. A kialakult ödéma (a korábban leírtaknak megfelelően) láthatóan nagyobb a vad típusban, ill. L-szelektin hiány esetén, mint a másik két vizsgálati csoportban. A füleket ért egyszeri OVA expozíció nem okozott epidermális hiperpláziát, annak kialakulásához az antigénnel való többszöri találkozás szükséges. A szövettani metszetek alatt (B) a különböző gyulladásos fehérvérsejtek szemikvantitatív meghatározásának eredményei láthatóak 24 órával az OVA intradermális injektálása után. Párhuzamos metszeteket festettünk granulocita markerrel (Gr-1+, kék oszlop), és CD4 monoklonális antitesttel (rózsaszín oszlop). A sárga oszlop ("egyéb" sejtek) fogalma alatt a HE-nal festett, de Gr-1,vagy CD4 monoklonális antitestekkel pozitivitást nem mutató sejteket értjük. Az ábrázolt értékek csoportonként 6-6- állat feldolgozása során kapott, HPF-re ( $2x10^4 \mu m^2$ ) vonatkoztatott leukocita szám statisztikai átlaga±SD. A vad típus és a KO csoportok közötti szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük (p<0.05).

### 4.9. Egér-térdízületek szövettani feldolgozása

Szövettani metszeteken (15. ábra) 4 órával az mBSA injektálása után kifejezett leukocita gyülem volt megfigyelhető a vad típusú, ill. valamivel kevésbé kifejezetten a CD44 deficiens egerek szinoviális szövetében. A sejtek nagy része az ereken kívül helyezkedett el, ami arra utal, hogy a gyulladásos folyamat már az oltást követő 4. óránál korábban kezdődött. Az L-szelektin, ill. dupla knockout állatok térdízületében ebben az időpontban azonban még alig volt sejtinfiltráció, ill. a leukociták nagy része még intravazálisan helyezkedett el. PBS oltás egyik egércsoportban sem eredményezett szövettanilag identifikálható gyulladást.

Később a vad típusú egerekben a szinovitisz rapid progressziója jelentkezett. 1 nappal az mBSA expozíció után masszív leukocita infiltráció volt látható a szinovium-porc kapcsolódás területén, ill. a ligamentum patellae alatt. A sejtgyülem főleg polimorfonukleáris leukocitákból állt. CD44 hiány esetében ez az infiltrátum valamivel kisebb volt a vad típusban megfigyelthez képest, míg ugyanebben az időpontban csak szolid, neutrofileket és limfocitákat egyaránt tartalmazó sejtszaporulat volt kimutatható az L-szelektin, ill. dupla knockout csoportban.

Míg az AIA kezdeti időszakában a térdízületek hisztológiai jellemzői különbözőek voltak a géndeficiens állatokban a vad típushoz képest, addig a gyulladás 5. napján ezek a különbségek már nem voltak kimutathatóak. Ebben a stádiumban a szövettani metszeteken szinoviális hiperplázia mellett masszív granulocita infiltrátum jelenléte volt jellemző.



**15. ábra**. mBSA-val injektált térdízületek hisztopatológiai vizsgálata a vad típusú, CD44 és L-szelektin deficiens, valamint dupla knockout egerekben az AIA kifejlődésének különböző időpontjaiban. A térdízületeket 4 (A-D), 24 órával (E-H), valamint 5 nappal (I-L) az antigén

expozíciót követően dolgoztuk fel. A nyilak (E-H) gyulladásos leukocitákból álló infiltrátumot jelölnek az izületi lágy szövetben.

# 4.10. Leukociták az artritiszes izületben, ill. periferiás vérben a vad típusú, CD44, Lszelektin, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben.

Az mBSA-val injektált egérízületekben áramlási citometriával quantitatíve is meghatároztuk a gyulladásos infiltrátum celluláris összetételét (16. ábra). 4 órával az antigén expozíciót követően a gyulladásos sejtek 88-92%-a expresszálta a Gr-1 granulocita markert a vad típusú, ill. a CD44 deficiens állatok ízületében, míg ez az arány csak 29-36% volt az L-szelektin, ill. dupla knockout egerekben. Ebben az időpontban minden genotípusban csak kevés számú sejtet sikerült gyűjteni. 24 órával az oltást követően a Gr-1 pozitív sejtek aránya a vad típusban, ill. CD44 hiányban meghaladta a 98%-ot, ugyanakkor a másik két állatcsoportban is növekedést mutatott, de ennek ellenére relative alacsony maradt (48-76%). Az artritisz indukciója után 5 nappal a korábbi különbségek már nem voltak detektálhatók, a Gr-1 pozitivitás minden egércsoportban 90% fölött volt.

Anti-CD3 antitest segítségével meghatároztuk a limfociták arányát is a sejtinfiltrátumon belül. A 4 órás időpontban, minden genotípusban, a begyűjtött sejtek kevesebb, mint 4%-a mutatott CD3 pozitivitást. Ez az arány aztán minden vizsgált ízületben lassan növekedetett (legmagasabb, >20% arányt a dupla knockout egerekben mértünk 24 órával az injekció után), majd az 5. napra csökkenést tapasztaltunk.

Az mBSA intraartikuláris injektálása után 24 órával az érintett térdízületekből gyűjtött sejtek felszínén meghatároztuk a CD44, ill. L-szelektin kifejeződést is. Hasonlóan a lépsejteknél tapasztaltakhoz, a CD44 deficiens sejtek felszínén az L-szelektin expressziója csökkent (főleg a neutrofileknél), míg az L-szelektin hiánya nem befolyásolta a CD44 sejtfelszíni megjelenését.

Ismerve azt, hogy a neutrofil aktiváció az L-szelektin expresszió csökkenésével, ill. a Mac-1 (CD11b) kifejeződés fokozódásával jár (8), az L-szelektin csökkent expressziója a CD44 deficiens állatokban felveti a lehetőségét annak, hogy ez a jelenség esetleg egy, a vad típushoz képest nagyobb mértékű neutrofil aktiváció következménye lehet. A mBSA-val immunizált, és térdízületen szúrt vad típusú és CD44 deficiens egerek periferiás vérében keringő leukociták áramlási cytometriás analízise során CD44 hiányában az L-szelektint intenzíven expresszáló sejtek gyakorlatilag hiányoztak. Ugyanakkor a Mac-1 expresszió vonatkozásában nem volt különbség a két csoport között, cáfolva a fokozott aktiváció teóriáját a CD44 géndefektusos állatokban. Mindezen felül 24 órával az artritisz indukció után mindkét vizsgált genotípusban szignifikánsan alacsonyabb volt az L-szelektin expresszió az ízületi granulociták felszínén a perifériás vér fehérvérsejtjeihez képest, ami arra enged következtetni, hogy az L-szelektin molekula leválása ("shedding") a sejtek felszínéről az extravazáció során történik. A CD11b molekulához hasonlóan a CD18 ( $\beta_2$  lánca az LFA-1-nek és Mac-1-nek), a VLA-4 és PSGL-1  $\alpha_4$  és  $\beta_1$  láncának expressziója azonos mértékű volt a a keringő fehérvérsejtek felszínén minden genotípusban.



**16.ábra**. Az AIA létrejötte során az ízületben kialakuló leukocita infiltrátum összetételének (A-H), ill. az infiltráló sejtek felszíni CD44 és L-szelektin kifejeződésének (I-P) meghatározása áramlási citometriával a vad típusú, CD44-deficiens, L-szelektin deficiens és dupla KO egerekben. A sejtösszetétel vizsgálatánál (4, 24 órával ill. 5 nappal az mBSA i.a. injektálása után) granulocita (Gr-1) és T limfocita (CD3) markereket használtunk. A fluoreszcencia intenzitást az x, míg a sejtszámot az y tengely mentén jelöltük. A áramlási citometriás méréseket csoportonként 4-4 állat térdízületéből nyert és "poolozott" sejtcsoporton végeztük el. Az ábrázolt panelek szériánként 3-3 mérésből tevődtek össze.

### MEGBESZÉLÉS

A CD44 és L-szelektin adhéziós molekulák gyulladásos stimulus indukálta leukocita kivándorlásban betöltött szerepét különböző inflammatorikus modelleken vizsgálták. Ezeknek a molekuláknak elsősorban a fehérvérsejtek endotélen végbemenő gördülő mozgásában van jelentőségük, melyben más adhéziós molekulákkal együttműködve gyakorlatilag "előkészítik" a leukocita extravazációt. Mivel hiányuk, ill. blokkolásuk az egyes állatmodellekben olykor egymásnak ellentmondó eredményeket adott (35-40;43;44), megerősíti azt a tényt, hogy a gyulladás iniciális fázisában kulcsfontosságú fehérvérsejt-endotél interakciók molekuláris háttere, ill. az egyes adhéziós molekulák működése nem teljesen tisztázott.

A keringő fehérvérsejtek és az érendotél közötti interakciók intravitális mikroszkópia segítségével *in vivo* vizsgálhatók. Alkalmazásával mind a "normál állapot", mind az inflammatorikus stimulusok hatására beinduló leukocita áramlás kinetikája feltérképezhető. A bőr az a szerv, melyben a posztkapilláris venulák vizsgálata a legkevesebb előkészítést igényli, biztosítva ezzel egy, a fiziológiáshoz leginkább hasonló állapotot. Ugyanakkor megfelelő technika alkalmazásával az adott szövet sebészi preparációja (pl. ízület szinoviális membrán, m.cremaster ) (44) sem befolyásolja jelentősen a leukocita-endotél interakciók vizsgálata során kapott eredményeket.

Munkám során vad típusú, CD44-, L-szelektin-, illetve CD44-L-szelektin dupla deficiens egereken, két különböző gyulladásos modellben intravitális mikroszkópia segítségével vizsgáltam a fehérvérsejt-endotél interakciók kinetikáját az antigén specifikus immunválasz, ill. a gyulladásos reakciók morfológiai paraméterei mellett.

Csirke ovalbuminnal (OVA) végzett intraperitoneális szenzitizáció után a vizsgált egerek fülébe intrakután OVA-t adva az atopiás dermatitisz akut fázisának kezdeti stádiumára több szempontból hasonlító, dominálóan Th2 típusú sejtcsoport aktivációjával járó allergiás reakciót váltottam ki. Egy másik egérpopuláción borjú szérum albuminnal történt immunizációt, majd ugyanazon antigén intraartikuláris injektálását követően egy, korábbi vizsgálatok alapján, mechanizmusát tekintve inkább Th1 típusú (88) immunválasszal járó artritiszt hoztam létre.

Az L-szelektin molekula expressziója elengedhetetlen a "naiv" T sejtek regionális nyirokcsomókba történő vándorlásához (homing), ill. nyirokcsomón belüli aktivációjához (4). A homing folyamatának defektusa a nyirokcsomók sejtszegénységét eredményezi L-szelektin hiányos állatokban (4;45). L-szelektin deficiens egerekben epikután szenzibilizáció után kontakt dermatitisz nem, vagy csak minimális mértékben váltható ki (60). Saját vizsgálatunkban, az allergiás dermatitisz modelljében, intradermális OVA szenzitizálás után a regionális szubmandibuláris nyirokcsomók T sejtjeinek antigén specifikus immunválasza szignifikánsan kisebb volt az L-szelektin és CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben a vad típusúakhoz képest, ill. az mBSA indukált T sejt proliferáció mértéke szubkután/intradermális immunizációt követően L-szelektin hiányában szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll vad típusú egerekben mért értékhez viszonyítva. Intraperitoneális immunizációt követően a fenti különbségek egyik egérmodellben sem voltak kimutathatók, alátámasztva azt a feltételezést, hogy intraperitoneálisan adva az antigént, az először a lépbe kerül, mely folyamat az L-szelektinől függetlenül zajlik le (45;86).

Míg intraperitoneális szenzitizáció után az antigén specifikus immunválaszok vonatkozásában egyik egérmodellben sem volt jelentős különbség az egyes állatcsoportok között, addig az egyes adhéziós molekulák genetikus hiánya morfológiai különbségeket eredményezett a vad típusú egerekben tapasztaltakhoz képest.

Az OVA oltást követő első órában, valamint a 6 és 24 óra között a vad típusú, ill. L-szelektin deficiens állatokban az érintett fülkagylók vastagsága fokozatosan nőtt, és a kialakult ödéma mértéke szignifikánsan nagyobb volt az ellenoldali, PBS injekció után kialakult mérethez képest. CD44 hiányában az antigénnel injektált fül azonban csak minimálisan vastagodott ugyanazon időtartam alatt, utalva a gyulladáshoz társuló vaszkuláris permeabilitás kisebb mértékű növekedésére.

Szövettani feldolgozás során az első órában mérsékelt ödémát, ill. a PBS-sel oltott kontroll fülhöz képest tízszeres leukocita és mastocita gyülemet, míg 24 órával az antigén expozícióját követően masszív fehérvérsejt infiltrátumot találtunk a vad típusú és L-szelektin deficiens állatok füleinek hám alatti kötőszövetében. Ezzel szemben az extravazálódott gyulladásos sejtek mennyisége láthatóan kevesebb volt CD44 expresszió hiányában, utalva a CD44 molekula prominensebb szerepére az effektor sejtek gyulladt bőrbe való vándorlása során a Th2 dominanciájával jellemezhető típusú limfociták allergiás bőrreakcióban. Immunhisztokémiai vizsgálatok megerősítették a CD44 molekula hiányának a T helper sejtek és a polimorfonukleáris leukociták (beleértve az eozinofileket is) transzendoteliális migrációjára kifejtett negatív hatását.

Az AIA modelljében az mBSA-val injektált térdízületek vastagsága a CD44 deficiens egerekben az oltást követő 2 napban, míg L-szelektin hiányában az 5 napos vizsgálati periodusban végig szignifikánsan kisebb volt a kontroll vad típusú állatokéhoz képest.

Az érintett ízületek szövettani feldolgozása, ill. a szinoviumot infiltráló sejtek áramlási citometriás analízise az AIA korai fázisában a vad típusú ill. CD44 hiányos állatokban rapidan növekvő neutrofil granulocita influx tényét igazolta. Ezzel ellentétben az L-szelektin deficiens és CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben a leukocita extravazáció késleltetését, a neutrofil sejtek lassabb akkumulációját észleltük. 5 nappal az antigén expozíciót követően

azonban mind a 4 genotípusban masszív ízületi leukocita gyülemet találtunk, mely dominálóan neutrofil sejtekből állt.

Neutrofil granulociták jelenlétét leírták autoimmun experimentális artritiszes állatmodellekben az ízületi résben (77;89;90), ill. ez a sejttípus dominál a szinoviális folyadékban rheumatoid artritisz akut stádiumában is (91). Azonban az AIA egyébként T-sejt dependens állatmodelljében tapasztalt, a T sejtekhez képest igen kifejezett szinoviális neutrofil invázió egy nem várt jelenség volt. Ennek egyik lehetséges magyarázata az mBSA és mBSA specifikus szérum ellenanyagok által létrehozott, és az ízületben lerakódott immunkomplexek jelenléte lehet. Egy korábbi vizsgálat (63) nagy mennyiségű immunkomplex depozitumot mutatott ki az AIA modelljében az immunizált állatok ízületében. A komplement rendszer aktiválása mellett az immunkomplexek neutrofil kemotaxist eredményező kemokinek lokális termelődését indukálják (92;93).

A granulocitákkal ellentétben, az L-szelektin molekula hiánya a T sejt extravasatiót nem befolyásolta az AIA korai fázisában. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a gyulladás kezdeti szakaszában meginduló neutrofil influx L-szelektin nélkül sérül, míg a T sejtek transzendoteliális migrációja az L-szelektintől független folyamat.

Érdekes jelenség a CD44 deficiens egerekben az L-szelektin "down-regulációja" a fehérvérsejtek felszínén, melyet először collagén-indukált artritiszben írtak le (74). Az L-szelektin leválása (shedding) "normál" körülmények között a leukocita aktiváció velejárója (8;94), melyet a megfelelő aktivációs markerek (Mac-1; CD69) expressziójának fokozódása kísér (8;87). A CD44 hiányos egerek fehérvérsejtjeinek felszínén sem a Mac-1, sem a CD69 molekulák kifejeződése nem különbözött a vad típusban megfigyeltekhez képest, mely arra utal, hogy az L-szelektin expressziójának csökkenése CD44 hiányában nem a mutáns sejtek excesszív aktivációjának köszönhető, sokkal inkább az L-szelektin expresszió megváltozott regulációja állhat a háttérben.

Mindkét állatmodellben azt vártuk, hogy az L-szelektin és CD44 molekulák együttes hiánya additív vagy szinergista módon negatív hatást gyakorol a fülben, ill. az ízületben kialakult gyulladásra, azonban a dupla knockout egerekben kialakult inflammáció morfológiai paraméterei az OVA indukált allergiás dermatitiszben a CD44 deficiens, míg AIA-ban az L-szelektin hiányos állatokban tapaszataltakhoz képest nem különbözött, utalva az említett molekulák domináns szerepére a megfelelő modellben.

Intravitális mikroszkópiával vizsgálva az injektált egérfül mikrocirkulációját, új információkat nyertünk az atopiás dermatitiszre emlékeztető hiperszenzitivitási reakció korai (IPR) és késői (LPR) fázisában kialakuló leukocita-endotél interakciókról. Míg a gyulladás során az ödéma létrejötte bifázisos mintát követett, addig a vad típusú ill. L-szelektin deficiens állatokban 12 óránál tetőzött a leukocita beáramlás, vagyis a gyulladásos sejtek fülbe vándorlása nem volt kétfázisú. Az inflammáció klinikai tünetei, valamint a fehérvérsejt mozgás kinetikája közötti diszkrepancia lehetséges magyarázata, hogy IPR fázisban a masztociták rapid beáramlása és felszabaduló sejtproduktumaik, míg az LPR szakaszban az intravasculárisan folyamatosan akkumulálódó, majd extravazálódó aktivált leukociták eredményezik a fokozott vaszkuláris permeábilitást és következményes ödemát (54;57). Először alkalmazva IVM technikát allergiás dermatitisz állatmodelljében azt találtuk, hogy L-szelektin deficiens és L-szelektin-CD44 dupla knockout állatokban az endotél mentén gördülő sejtek száma OVA injekciót követően 6 ill.12 órával alacsonyabb volt a vad típushoz képest, de nem különbözött attól a 24.órában. Mivel a CD44 molekula a hyaluronsavban gazdag endotélium mentén történő gördülő mozgást mediálja (18), a molekula hiányában a rollingoló sejtek számának csökkenését várhattuk. Ezzel szemben CD44 hiányos állatokban a rolling interakciók frekvenciája az oltást követően 1 nappal szignifikánsan magasabb volt a vad egerekben

tapasztaltakhoz képest. Más gyulladásos modelleken végzett korábbi tanulmányok is leírták a leukociták gördülő mozgásának megváltozását CD44 deficiencia esetén (95), bár a jelenség háttere még nem tisztázott.

A vaszkuláris endotélium, ill. a fehérvérsejtek aktivációs állapotának növekedése a rolling sebesség csökkenését vetítette előre (2;96). A 24 órás megfigyelési periódus első felében valóban csökkent a gördülő leukociták sebessége mind a négy genotípusban. A CD44 hiányos, ill. dupla knockout állatokban azonban a sejtek gyorsabban gördültek a vad típusban mért értékekhez képest. Mindemellett ugyanezen két deficiens genotípusban az adherens sejtek száma jóval alacsonyabb volt, mint a vad egerekben. A gyorsabb rolling és kisebb mértékű adhézió jelensége egymással szorosan összefügg, hiszen a lassabban gördülő leukocitákra intenzivebben hatnak az integrin aktivációt, s ezáltal a szoros tapadást indukáló, lokálisan felszabaduló kemokinek (1;13). Az irreverzibilis adhézió teremti meg az alapját a gyulladásban részt vevő effektor sejtek extravazációjának, ill. szöveti inváziójának (1:96). Ennek elmaradása, ill. csökkent volta a szöveti gyulladás mértékének redukciójához vezet, mint ahogy ezt a CD44, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerek esetében tapasztaltuk. Megfigyeléseink összhangban állnak más vizsgálatokkal, melyekben CD44 hiányában normál rollingot, illetve csökkent adhéziót, valamint extravazációt írtak le gyulladásos folyamatokban (95). Bár a CD44 molekula elsősorban a fehérvérsejtek gördülő mozgásában játszik szerepet, a sejtfelszíni integrinekkel való együttműködése miatt a leukocita adhézió stabilizálásában is jelentőséggel bírhat. Siegelman és munkatársai kimutatták, hogy a normál egér T sejtek felszínén expresszálódó CD44 fizikai kontaktusban van a plazmamembrán VLA-4 molekulájával. Gyulladásos stimulus hatására a CD44 molekula közreműködésével létrejövő rolling a VLA-4 aktivációjához, majd a leukocita szoros adhéziójához vezet (97). CD44 hiány esetén tehát feltételezhetően nemcsak a gyorsabb rolling, hanem a CD44-VLA-4 interakció hiánya is hozzájárul a fehérvérsejtek csökkent mértékű adhéziójához.

Az antigén idukált artritisz modelljében a gyulladt térdízületek szinoviális ereiben a legintenzívebb leukocita áramlást az mBSA oltást követő 4. órában tapasztaltuk. A vad típusú egerek esetében már ebben az időpontban is jelentős számú fehérvérsejt adherált az érfalhoz, míg a gördülő sejtek száma elenyésző volt. Ehhez képest a rolling frekvencia szignifikánsan nagyobb, míg a kitapadt leukociták mennyisége szignifikánsan kisebb volt a CD44 deficiens állatoknál. Azt gondolhattuk, hogy az intenzívebb rollingért jelen esetben az L-szelektin felelős, azonban L-szelektin hiányában a gördülő mozgás frekvenciája még intenzívebb volt. Az L-szelektin hiányát nem kompenzálta a CD44 molekula, hiszen a rolling és adhézió kinetikája az L-szelektin és L-szelektin-CD44 dupla deficiens egereknél csaknem azonos volt. Az a tény, hogy a CD44 expresszió elmaradása az L-szelektint nem termelő sejtek felszínén csökkent L-szelektin expresszió detektálható, felveti annak lehetőségét, hogy az ízületbe irányuló mérsékelten csökkent leukocita "influx" CD44 deficiencia esetén inkább a csökkent L-szelektin kifejeződésnek, semmint a CD44 funkció hiányának tudható be.

Annak ismeretében, hogy irodalmi adatok alapján CD44 specifikus antitestek segítségével az artritisz különböző formáiban (beleértve az AIA-t is) sikerrel csökkentették a gyulladás mértékét (38-40), meglepő volt, hogy a CD44 molekula komplett hiánya csak minimálisan befolyásolta az AIA kifejlődését. Két tanulmány, mely gén expresszió hiány (P-szelektin, ICAM-1), illetve blokkoló antitestek gyulladásra kifejtett hatását vizsgálta ugyanabban a modellben, az antitest "kezelés" rapidabb antiinflammatorikus effektivitásáról számolt be (98;99). Bár nem direkt összehasonlítás során, de hasonló diszkrepancia igazolódott antiCD44 terápia (38), illetve CD44 genomiális deficiencia (48) viszonyításában collagen indukált artritisz modelljében is. A jelenség hátterében részben az állhat, hogy a CD44 ellenes antitestek más mechanizmusokon keresztül befolyásolják a leukociták viselkedését, mint a

genetikailag determinált CD44 hiány, bár a folyamat részletes feltárása további vizsgálatokat igényel.

A vad típusú egerekben detektáltakhoz képest tehát mindegyik géndeficiens genotípusban a rolling frekvencia emelkedett volt. Mivel az L-szelektin vagy hiányzott, vagy csökkent mértékben expresszálódott, illetve úgy tűnik, hogy ebben a modellben a CD44 hiány befolyásoló hatása elenyésző volt, a sejtek ,feltételezhetően, elsősorban a PSGL-1, ill. VLA-4 molekulák segítségével gördültek az érfal mentén (16;100). Ez a mechanizmus azonban kevésbé volt effektív az L-szelektin mediált rollinghoz képest, hiszen kevesebb sejt tapadt ki az érfalhoz L-szelektin hiányában, mint a vad típusú állatoknál. Korábbi tanulmányokkal összhangban (15;101), eredményeink alapján a a neutrofilek integrin mediálta adhéziójának előkészítésében az L-szelektin effektívebb , mint a PSGL-1 (az edotheliális P/E-szelektinhez kötődve), vagy a VLA-4 (VCAM-1-et felismerve). Mindemellett L-szelektin hiányában az L-szelektin-PSGL-1 interakció (7), tehát a leukocita-leukocita kapcsolódás is sérül, hozzájárulva a gyulladásos sejtek ízületbe vándorlásának késleltetéséhez.

A két gyulladásos modellben fellépő, IVM-mel vizsgált leukocita-endotél interakciók különböző kinetikájának, ill. az egyes adhéziós molekulák eltérő szerepének hátterében több tényező állhat.:

a, Míg az allergiás dermatitisz esetében a T sejt (és dominálóan a Th2 típusú limfociták) kivándorlása dominál, addig AIA-ban döntően neutrofil leukociták áramlanak a szinoviális membránba.

b, A domináló sejttípus eltérő volt, az allergiás bőrgyulladásban mért magas IgE más kemokin profilt, eltérő sejtmozgósítást eredményez.

c, A gyulladásos reakciókban domináló sejtek típusa befolyásolja az adhéziós molekulák interakcióját más, adherenciában részt vevő molekulákkal. Így pl. CD44 hiánya negatív

hatású lehet a VLA-4 mediált kitapadásra, mely folyamat elsősorban a T sejt mediált reakcióknál jön szóba (97), míg a neutrofilek által uralt folyamatokban az L-szelektin hiányzó expressziójának köszönhetően elmarad az L-szelektin-PSGL-1 kötődés, tehát a leukocita-leukocita kapcsolódás, mely hozzájárul a gyulladásos sejtek késleltetett extravasatiojához.

A rolling interakciók frekvenciája, illetve a gördülő mozgás sebessége számos faktor által befolyásolt paraméterek. A fehérvérsejt-endotél interakciókban szerepet játszó receptorok, illetve ligandjaik sejtfelszíni denzitása, az adhéziós molekulák aviditása és membránban való eloszlása, valamint a lokálisan felszabaduló chemokinek specificitása és koncentrációja mind hatással lehet a leukocita-ér kapcsolódás folyamatára (44;92;102-104). Addicionális faktorok (az érintett szövet adhéziós molekuláinak eltérő "mintázata", a gyulladásos folyamatban részt vevő effektor sejtek típusa, immunkomplexek jelenléte az érintett szövetben, az adott szöveti mikrokörnyezetre specifikus kemokinek stb.) szintén befolyásolhatják a CD44, illetve L-szelektin molekulák hiánya miatt egyébként is destabilizálódott leukociták viselkedését, következményesen az indukált inflammáció morfológiai paramétereit.

## ÚJ EREDMÉNYEK

Munkám során a világon először hoztunk létre Th2 típusú T sejtek által mediált, protein antigén indukált allergiás dermatitiszt CD44-, L-szelektin- ill, CD44-L-szelektin dupla knockout egereken, illetve immun mediált artritiszt L-szelektin, és CD44-L-szelektin dupla deficiens állatokban.

Intraperitoneális immunizációval mindkét gyulladásos modellt sikerrel indukáltuk L-szelektin hiányában is, megerősítve azt a feltételezést, hogy a hasüregbe adott antigén "első útja" a lépbe irányul, mely folyamat L-szelektintől függetlenül megy végbe.

Intravitális mikroszkópia alkalmazásával betekintést nyertünk a vizsgált gyulladásos folyamatok kezdeti fázisára jellemző leukocita mozgás kinetikájába.

A Th2 sejtek által mediált allergiás dermatitisz esetében a CD44, míg az antigén indukált artritisz modelljében elsősorban az L-szelektin molekula hiánya okozott a vad típustól eltérő leukocita-endotél interakciókat.

Eredményeink alapján a fenti adhéziós molekulák az egyik hiánya esetén egymást nem kompenzálták, expressziójuk együttes elmaradása sem additív, sem szinergista módon negatív hatással nem bírt.

Az OVA immunizáció után kiváltott dermatitisz esetében a kialakult fül ödéma kétfázisú dinamikájával ellentétben a gyulladásos leukociták fülbe vándorlása az oltást követő első 12 órában fokozatosan nőtt, majd ezt követően csökkent (a vad típusú, ill. L-szelektin deficiens egereknél), tehát ebben a vonatkozásban bifázisos jelleg nem igazolódott.

CD44 expresszió hiányában a rollingoló leukociták száma és sebessége a vizsgálati periodusban végig magasabb volt, tehát az endotél és a fehérvérsejtek aktivációs állapotának növekedése a várttal ellentétben nem eredményezte a sejtek lelassulását ezeknél az állatoknál, mely jelenség fontos motívuma az adhéziós képesség csökkenésének.

Az AIA modelljében az érintett ízületek szövettani feldolgozása során a szinovium gyulladásos sejtgyüleme elsősorban neutrofil leukocitákból állt, melynek hátterében az ízületekben lerakódó immunkomplexek, ill. azok által kiváltott immunológiai mechanizmusok állhatnak.

Az mBSA intraartikuláris injectiója után L-szelektin hiányában a (ill. a dupla deficiens egereknél is) a neutrofil extravazáció késleltetett volt, de a gyulladás 5. napján már nem találtunk különbséget az inflammáció súlyosságát illetően a vad típusú állatok, ill. a géndeficiens csoportok között. A T sejtek ízületbe vándorlását nem befolyásolta az adhéziós molekulák hiánya.

Intravitális mikroszkópia segítségével derült fény arra is, hogy az AIA korai fázisában nem csak a CD44, de az L-szelektin molekula hiánya is magasabb rolling frekvenciát eredményezett. Azt várhattuk, hogy az L-szelektin expresszió elmaradása miatt a PSGL-1-P-szelektin interakció dominálni fog, és a rolling lelassul, azonban ez jelen esetben nem volt igazolható.

Ebben a modellben a CD44 deficiencia csak minimális mértékben befolyásolta az ízületi gyulladás kialakulását, mely a vad típushoz képest nem volt szignifikáns. A kismértékű változás hátterében elsősorban a leukociták felszínén CD44 hiányában kialakuló csökkent L-szelektin expresszió állhat.

## **ÖSSZEFOGLALÁS**

Munkám során CD44, L-szelektin, valamint CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben létrehozott két különböző egérmodellen dolgoztam.

Intraperitoneálisan csirke ovalbuminnal 2 alkalommal immunizált állatokban az egyik oldali fülbe intradermálisan adott ugyanazon antigénnel allergiás dermatitiszt váltottam ki. A magas antigén specifikus IgE szinttel, emelkedettebb IL-4 termeléssel járó bőrgyulladásban dominálóan Th2 típusú limfociták vettek részt. A kialakult inflammáció emiatt több szempontból is hasonlóságot mutatott az atopiás dermatitisz akut fázisával.

Intradermálisan/szubkután, valamint ugyancsak a hasüregbe, majd meghatározott idő után az egerek egyik oldali térdízületébe injektált mBSA-val antigén-indukált artritiszt hoztunk létre.

Az immunizáló ágensekre adott specifikus válaszreakciók (immunglobulin termelés, T sejt proliferáció) meghatározása mellett a gyulladásos folyamatokban részt vevő leukociták és az endotél sejtek közötti interakciók kinetikájának tanulmányozása céljából a fülek, ill. az érintett ízületek szinoviális membránjának posztkapilláris venuláit intravitális mikroszkópiával vizsgáltuk.

Az antigén specifikus immunválaszok szignifikánsan egyik modell esetében sem különböztek a vad típus, ill. géndeficiens egércsoportok között, azonban a kialakuló gyulladásos reakciók morfológiai eltérést mutattak az egyes adhéziós molekulák hiányában.

Az OVA intradermális injektálása után kialakult ödéma a CD44 deficiens ill. dupla knockout állatokban szignifikánsan kisebb volt, illetve ugyanezen állatokban a fülek szövettani feldolgozása során kevesebb intradermális gyulladásos sejtet találtunk.

Az AIA modelljében a kialakult ízületi duzzanat L-szelektin hiányában kisebb volt a vad típushoz képest. Szövettani feldolgozással a gyulladásban domináló neutrofil granulociták

extravazációjának késésére derült fény, míg a szinoviumba történő T sejt vándorlás nem gátlódott az L-szelektin molekula expressziójának elmaradása esetén.

Intravitális mikroszkópiával allergiás dermatitiszben CD44 hiányában fokozott rolling frekvencia, valamint nagyobb rolling sebesség, emellett csökkent adherencia igazolódott.

Ezzel szemben mBSA intraartikuláris injekciója után a CD44 deficiens állatokban csak minimálisan csökkent az effektorsejt extravazáció, mely elsősorban az ebben a géndefektusban a leukociták felszínén létrejövő csökkent L-szelektin kifejeződésnek, semmint a CD44 hiányának tudható be. Ugyanakkor L-szelektin deficienciában fokozott rolling frekvenciát, ill. sebességet és késleltetett adherenciát detektáltunk.

Az egyes adhéziós molekulák különböző gyulladásos folyamatokban betöltött eltérő szerepe megerősíti azt a tényt, mely szerint az inflammatioban részt vevő effektor sejtek és az aktivált endotél interakcióinak hátterében bonyolult, máig nem teljesen tisztázott mechanizmusok és tényezők állnak.

## KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Mikecz Katalin professzornőnek és Dr. Hunyadi János professzor úrnak, akik témavezetőként kutatómunkámat irányították, a témaválasztásban és annak gyakorlati megvalósításában elengedhetetlenül fontos segítséget nyújtottak.

Köszönet illeti Dr. Szegedi Gyula professzor urat, aki programvezetőként segítette munkámat.

Köszönet illeti mindazon kollégáimat és munkatársaimat, akik munkájukkal, tanácsaikkal hozzájárultak munkámhoz. Külön köszönettel tartozom Dr. Glant Tibor professzor úrnak, Dr Bárdos Tamásnak, Dr Gál Istvánnak, Dr Bara Sarrajnak, Dr Szántó Sándornak, Sonja Velinsnek és Wendy Konak, akik a kollaborációban nyújtottak jelentős elméleti és gyakorlati segítséget munkámhoz (Rush University Medical Center, Chicago, USA).

Köszönöm férjemnek, gyermekeimnek, szüleimnek és testvéremnek támogatásukat és azt a lehetőséget, hogy a családi háttér biztosításával nyugodt körülmények között végezhettem munkámat.

# RÖVIDÍTÉSEK

AIA	antigén-indukált artritisz
EAE	experimentális allergiás enkefalomileitisz
ICAM-1	intercelluláris adhéziós molekula-1
IL-1	interleukin-1
IL-4	interleukin-4
IL-5	interleukin-5
IVM	intravitális mikroszkópia
IFNγ	interferon-gamma
IPR	"immediate-phase response" (azonnali válaszreakció)
LPR	"late-phase response" (késői válaszreakció)
LFA-1	leukocita-funkciós-antigén
TNF-α	tumor-nekrózis-faktor-alfa
VLA-4	"very late activation antigen" (késői aktivációs antigén)
VCAM-1	vaszkuláris sejt adhéziós molekula

## HIVATKOZÁSOK

- (1) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. [Review]. Cell 1994; 76:301-314.
- (2) Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. Cell 1991; 65:859-873.
- (3) Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. FASEB J 1995; 9:866-873.
- (4) Arbonés ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G et al. Lymphocyte Homing and Leukocyte Rolling and Migration Are Impaired in L-Selectin-Deficient Mice. Immunity 1994; 1:247-260.
- (5) von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. Cell 1995; 82:989-999.
- (6) Abitorabi MA, Pachynski RK, Ferrando RE, Tidswell M, Erle DJ. Presentation of integrins on leukocyte microvilli: a role for the extracellular domain in determining membrane localization. J Cell Biol 1997; 139:563-571.
- (7) Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. J Exp Med 2003; 197:1355-1363.
- (8) Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-11. J Immunol 1989; 143(10):3318-3324.
- (9) Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. J Immunol 1995; 155:525-528.
- (10) Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84(24):9238-9242.
- (11) Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. Cell 1989; 59(2):305-312.
- (12) von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88:7538-7542.
- (13) Weber C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. J Mol Med 2003; 81:4-19.

- (14) Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. J Clin Invest 1989; 83:2008-2017.
- (15) von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Torres F, I, Butcher EC et al. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. Am J Physiol 1992; 263:H1034-H1044.
- (16) Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, van Andrian UH, Czabo MC, Hasslen SR et al.  $\alpha$ 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. Cell 1995; 80:413-422.
- (17) Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H, Estess P, Siegelman M. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. J Clin Invest 1998; 101:97-108.
- (18) DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: A novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. J Exp Med 1996; 183:1119-1130.
- (19) DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. Science 1997; 278:672-675.
- (20) Stoop R, Gál I, Glant TT, McNeish JD, Mikecz K. Trafficking of CD44-deficient lymphocytes in normal and inflammatory conditions in arthritis-susceptible DBA/1 mice. Arthritis Rheum 2001; 44:S297.
- (21) Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovic I. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. J Cell Biol 1992; 118:971-977.
- (22) Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. Adv Cancer Res 1997; 71:241-319.
- (23) Kogerman P, Sy M-S, Culp LA. Overexpressed human CD44s promotes lung colonization during micrometastasis of murine fibrosarcoma cells: facilitated retention in the lung vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94:13233-13238.
- (24) Drillenburg P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. Blood 2000; 95:1900-1910.
- (25) Haynes BF, Hale LP, Patton KL, Martin ME, McCallum RM. Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1991; 34:1434-1443.
- (26) Budd RC, Cerottini J-C, Horvath C, Bron C, Pedrazzini T, Howe RC et al. Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. J Immunol 1987; 138:3120-3129.

- (27) Foster LC, Arkonac BM, Sibinga NES, Shi CW, Perrella MA, Haber E. Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1998; 273(32):20341-20346.
- (28) Nandi A, Estess P, Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. J Biol Chem 2000; 275:14939-14948.
- (29) Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. J Cell Biol 1998; 140:885-895.
- (30) Legg JW, Isacke CM. Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. Curr Biol 1998; 8:705-708.
- (31) Lokeshwar VB, Fregien N, Bourguignon LY. Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. J Cell Biol 1994; 126:1099-1109.
- (32) Legg JW, Lewis CA, Parsons M, Ng T, Isacke CM. A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. Nat Cell Biol 2002; 4:399-407.
- (33) Peck D, Isacke CM. Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325. J Cell Sci 1998; 111:1595-1601.
- (34) Li X, Steeber DA, Tang ML, Farrar MA, Perlmutter RM, Tedder TF. Regulation of L-selectin-mediated rolling through receptor dimerization. J Exp Med 1998; 188:1385-1390.
- (35) Yang X-D, Karin N, Tisch R, Steinman L, McDevitt H. Inhibition of insulitis and prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by blocking L-selectin and very late antigen 4 adhesion receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:10494-10498.
- (36) Verdrengh M, Erlandsson-Harris H, Tarkowski A. Role of selectins in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. Eur J Immunol 2000; 30:1606-1613.
- (37) Brocke S, Piercy C, Steinman L, Weissman IL, Veromaa T. Antibodies to CD44 and integrin  $\alpha_4$ , but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:6896-6901.
- (38) Mikecz K, Brennan FR, Kim JH, Glant TT. Anti-CD44 treatment abrogates tissue edema and leukocyte infiltration in murine arthritis. Nat Med 1995; 1:558-563.
- (39) Verdrengh M, Holmdahl R, Tarkowski A. Administration of antibodies to hyaluronanreceptor (CD44) delays the start and ameliorates the severity of collagen II arthritis. Scand J Immunol 1995; 42:353-358.

- (40) Nedvetzki S, Walmsley M, Alpert E, Williams RO, Feldmann M, Naor D. CD44 involvement in experimental collagen-induced arthritis (CIA). J Autoimmun 1999; 13:39-47.
- (41) Katoh S, Matsumoto N, Kawakita K, Tominaga A, Kincade PW, Matsukura S. A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. J Clin Invest 2003; 111:1563-1570.
- (42) Rothenberg ME. CD44--a sticky target for asthma. J Clin Invest 2003; 111:1460-1462.
- (43) Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. J Exp Med 1995; 181:2259-2264.
- (44) Hickey MJ, Forster M, Mitchell D, Kaur J, De Caigny C, Kubes P. L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. J Immunol 2000; 165:7164-7170.
- (45) Catalina MD, Carroll MC, Arizpe H, Takashima A, Estess P, Siegelman MH. The route of antigen entry determines the requirement for L-selectin during immune responses. J Exp Med 1996; 184:2341-2351.
- (46) Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, Wang H, Lee WP, Tumas D et al. CD62L is required on effector cells for local interactions in the CNS to cause myelin damage in experimental allergic encephalomyelitis. Immunity 2001; 14:291-302.
- (47) Xu J, Grewal IS, Geba GP, Flavell RA. Impaired primary T cell responses in L-selectin-deficient mice. J Exp Med 1996; 183:589-598.
- (48) Stoop R, Kotani H, McNeish JD, Otterness IG, Mikecz K. Increased resistance to collagen-induced arthritis in CD44-deficient DBA/1 mice. Arthritis Rheum 2001; 44:2922-2931.
- (49) Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E et al. Resolution of lung inflammation by CD44. Science 2002; 296:155-158.
- (50) Wang Q, Teder P, Judd NP, Noble PW, Doerschuk CM. CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in *Escherichia coli* pneumonia in mice. Am J Pathol 2002; 161:2219-2228.
- (51) Holden CA, Parish WE. Atopic Dermatitis. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, editors. Textbook of Dermatology. Blackwell Science Ltd., 1998: 681-708.
- (52) Kang K, Stevens SR. Pathophysiology of atopic dermatitis. Clin Dermatol 2003; 21:116-121.
- (53) Wuthrich B. Serum IgE in atopic dermatitis: relationship to severity of cutaneous involvement and course of disease as well as coexistence of atopic respiratory diseases. Clin Allergy 1978; 8:241-248.

- (54) Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. J Clin Invest 2004; 113(5):651-657.
- (55) Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, van Wichen DF, van Reijsen FC, Mudde GC et al. Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study. J Allergy Clin Immunol 1996; 97(3):828-837.
- (56) Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, Bhan AK, Geha RS. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. J Clin Invest 1999; 103:1103-1111.
- (57) Togawa M, Kiniwa M, Nagai H. The roles of IL-4, IL-5 and mast cells in the accumulation of eosinophils during allergic cutaneous late phase reaction in mice. Life Sci 2001; 69(6):699-705.
- (58) Sjogren F, Anderson C, Groth O. The cellular dermal infiltrate in experimental immediate type cutaneous hypersensitivity. Acta Derm Venereol 1995; 75:417-421.
- (59) Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK, Geha RS. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. J Clin Invest 1998; 101:1614-1622.
- (60) Shimada Y, Hasegawa M, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Komura K, Saito E et al. Lselectin or icam-1 deficiency reduces an immediate-type hypersensitivity response by preventing mast cell recruitment in repeated elicitation of contact hypersensitivity. J Immunol 2003; 170:4325-4334.
- (61) Ott NL, Gleich GJ, Peterson EA, Fujisawa T, Sur S, Leiferman KM. Assessment of eosinophil and neutrophil participation in atopic dermatitis: comparison with the IgE-mediated late-phase reaction. J Allergy Clin Immunol 1994; 94:120-128.
- (62) Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. Arthritis Rheum 1977; 20:841-850.
- (63) van den Berg WB, van Beusekom HJ, van de Putte LB, Zwarts WA, van der SM. Antigen handling in antigen-induced arthritis in mice: an autoradiographic and immunofluorescence study using whole joint sections. Am J Pathol 1982; 108:9-16.
- (64) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Mort J, Sandy J, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 in murine models of experimental arthritis. Trans ORS 2002; 27:231.
- (65) Glant TT, Kamath RV, Bárdos T, Gál I, Szanto S, Murad YM et al. Cartilagespecific constitutive expression of TSG-6 protein (product of tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated gene 6) provides a chondroprotective, but not anti-inflammatory, effect in antigen-induced arthritis. Arthritis Rheum 2002; 46:2207-2218.
- (66) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor-α-stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. Am J Pathol 2001; 159:1711-1721.

- (67) Veihelmann A, Szczesny G, Nolte D, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. Res Exp Med (Berl) 1998; 198:43-54.
- (68) Otto JM, Chandrasekaran R, Vermes C, Mikecz K, Finnegan A, Rickert SE et al. A genome scan using a novel genetic cross identifies new susceptibility loci and traits in a mouse model of rheumatoid arthritis. J Immunol 2000; 165:5278-5286.
- (69) Adarichev VA, Valdez JC, Bárdos T, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci. J Immunol 2003; 170:2283-2292.
- (70) Robinson ST, Frenette PS, Rayburn H, Cummiskey M, Ullman-Culleré M, Wagner DD et al. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:11452-11457.
- (71) Wada Y, Kuzuhara A, Hanamura M, Kida R, Yoshinaka T, Saito T. Role of selectins on IgE-mediated skin reaction. Br J Pharmacol 2000; 131:1531-1536.
- (72) Kanwar S, Steeber DA, Tedder TF, Hickey MJ, Kubes P. Overlapping roles for Lselectin and P-selectin in antigen-induced immune responses in the microvasculature. J Immunol 1999; 162:2709-2716.
- (73) Adarichev VA, Bárdos T, Christodoulou S, Phillips MT, Mikecz K, Glant TT. Major histocompatibility complex controls susceptibility and dominant inheritance, but not the severity of the disease in mouse models of rheumatoid arthritis. Immunogenetics 2002; 54:184-192.
- (74) Stoop R, Gal I, Glant TT, McNeish JD, Mikecz K. Trafficking of CD44-deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions. Eur J Immunol 2002; 32:2532-2542.
- (75) Glant TT, Cs-Szabó G, Nagase H, Jacobs JJ, Mikecz K. Progressive polyarthritis induced in BALB/c mice by aggrecan from human osteoarthritic cartilage. Arthritis Rheum 1998; 41:1007-1018.
- (76) Lesley J, He Q, Miyake K, Hamann A, Hyman R, Kincade PW. Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. J Exp Med 1992; 175:257-266.
- (77) Mikecz K, Dennis K, Shi M, Kim JH. Modulation of hyaluronan receptor (CD44) function *in vivo* in a murine model of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1999; 42:659-668.
- (78) von Andrian UH, M'Rini C. In situ analysis of lymphocyte migration to lymph nodes. Cell Adhes Commun 1998; 6:85-96.
- (79) Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB et al. Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT- VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. Immunity 2000; 12:665-676.

- (80) Haywood L, Walsh DA. Vasculature of the normal and arthritic synovial joint. Histol Histopathol 2001; 16:277-284.
- (81) Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. J Immunol 1999; 162:6755-6762.
- (82) Forlow SB, Ley K. Selectin-independent leukocyte rolling and adhesion in mice deficient in E-, P-, and L-selectin and ICAM-1. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280:H634-H641.
- (83) Hanyecz A, Berlo SE, Szanto S, Broeren CPM, Mikecz K, Glant TT. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype. Arthritis Rheum 2004; 50:1665-1676.
- (84) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TNFα-stimulated gene-6 (TSG-6) in murine models of experimental arthritis. Arthritis Rheum 2001; 44:S114.
- (85) van Meurs JBJ, van Lent PLEM, Holthuysen AEM, Singer II, Bayne EK, van den Berg WB. Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neoepitopes in various stages of cartilage destruction in murine arthritis. Arthritis Rheum 1999; 42:1128-1139.
- (86) Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. Immunology 2002; 106:299-307.
- (87) Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. Stem Cells 1994; 12:456-465.
- (88) Petrow PK, Thoss K, Katenkamp D, Brauer R. Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. Immunol Invest 1996; 25:341-353.
- (89) Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. Arthritis Rheum 1987; 30:201-212.
- (90) Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. J Immunol 2001; 167:1601-1608.
- (91) Pillinger MH, Abramson SB. The neutrophil in rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am 1995; 21:691-713.
- (92) Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002; 283:R7-28.
- (93) Kaburagi Y, Hasegawa M, Nagaoka T, Shimada Y, Hamaguchi Y, Komura K et al. The cutaneous reverse Arthus reaction requires intercellular adhesion molecule 1 and L-selectin expression. J Immunol 2002; 168:2970-2978.

- (94) Chao C-C, Jensen R, Dailey MO. Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. J Immunol 1997; 159:1686-1694.
- (95) Khan AI, Kerfoot SM, Heit B, Liu L, Andonegui G, Ruffell B et al. Role of CD44 and hyaluronan in neutrophil recruitment. J Immunol 2004; 173(12):7594-7601.
- (96) Schon MP, Zollner TM, Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. J Invest Dermatol 2003; 121(5):951-962.
- (97) Nandi A, Estess P, Siegelman M. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. Immunity 2004; 20(4):455-465.
- (98) Doerschuk CM, Quinlan WM, Doyle NA, Bullard DC, Vestweber D, Jones ML et al. The role of P-selectin and ICAM-1 in acute lung injury as determined using blocking antibodies and mutant mice. J Immunol 1996; 157:4609-4614.
- (99) Gironella M, Molla M, Salas A, Soriano A, Sans M, Closa D et al. The role of Pselectin in experimental colitis as determined by antibody immunoblockade and genetically deficient mice. J Leukoc Biol 2002; 72:56-64.
- (100) Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E et al. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E- selectin-mediated neutrophil rolling and migration. J Exp Med 1999; 190:1769-1782.
- (101) von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, Michie SA, Brown DA, Karolak D et al. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisXdependent and -independent recognition pathways. Blood 1993; 82:182-191.
- (102) Kanwar S, Bullard DC, Hickey MJ, Smith CW, Beaudet AL, Wolitzky BA et al. The association between alpha4-integrin, P-selectin, and E-selectin in an allergic model of inflammation. J Exp Med 1997; 185:1077-1087.
- (103) Stewart M, Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. J Cell Biochem 1996; 61:554-561.
- (104) von Andrian UH, Hasslen SR, Erlandsen SL, Butcher EC. Leukocyte surface receptor topography - a determinant of microvascular leukocyte adhesion. Biorheology 1995; 32:198.
- (105) Jung U, Ramos CL, Bullard DC, Ley K. Gene-targeted mice reveal importance of Lselectin-dependent rolling for neutrophil adhesion. Am J Physiol 1998; 274:H1785-H1791.
- (106) Jung U, Bullard DC, Tedder TF, Ley K. Velocity differences between L- and Pselectin-dependent neutrophil rolling in venules of mouse cremaster muscle in vivo. Am J Physiol 1996; 271:H2740-H2747.

# 11. A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS BESZÁMOLÓK JEGYZÉKE

### Írásos közlemények

**Gonda A,** Gal I, Szanto S, Sarraj B, Glant T.T, Hunyadi J, Mikecz K. CD44, but not L-selectin, is critically involved in leukocyte migration into the skin in a murine model of allergic dermatitis. Exp Dermatol. 2005; 14:700-708.

Szanto S, Gal I, **Gonda A**, Glant TT, Mikecz K. Expression of L-selectin, but not CD44, is required for early neutrophil extravasation in antigen-induced arthritis. J Immunol. 2004; 172:6723-34.

Gal I, Lesley J, Ko W, **Gonda A**, Stoop R, Hyman R, Mikecz K. Role of the extracellular and cytoplasmic domains of CD44 in the rolling interaction of lymphoid cells with hyaluronan under physiologic flow. J Biol Chem. 2003; 278:11150-8.

### Publikált absztraktok:

**Gonda A**, Szanto S, Gal I, Mikecz K. Real-Time Analysis of Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in Vivo during Inflammation in Mice Lacking CD44 or L-Selectin or Both. Arthritis Rheum. 2002; 46:S78

Gal I, Lesley J, Ko W, **Gonda A**, Glant TT, Hyman R, Mikecz K. Mutations in CD44 Differentially Influence the Rolling Interactions of Lymphoid Cells with Hyaluronan. Arthritis Rheum. 2002; 46:S602

Gal I, Szanto S, **Gonda A**, Mikecz K. Intravital Microscopy on the Synovial Microcirculation Demonstrates a Role for CD44 in Inflammatory Cell Extravasation in a Murine Model of RA. Arthritis Rheum. 2003; 48:S677

**Gonda A**, Szanto S, Gal I, Glant TT, Mikecz K. CD44 is Critically Involved in Leukocyte Extravasation During a Th2 Type Inflammatory Response. Arthritis Rheum. 2003; 48:S271

Szanto S, Gal I, **Gonda A**, Mikecz K. L-selectin and CD44 Regulate Leukocyte Rolling in Synovial Microvessels in Mice with Antigen-induced Arthritis. Arthritis Rheum. 2003; 48:S272

Szanto S, Gal I, **Gonda A**, Mikecz K. A Greater Requirement for L-Selectin than CD44 for Early Neutrophil Accumulation in the Synovial Microvasculature in Antigen-induced Arthritis (AIA). Ann Rheum Dis. 2004;