

IL-2 ETKİSİ İLE AKTİF HALE GETİRİLEN MODİFİYE MLC TESTİNDE İMMUNOSUPRESAN İLAÇLARIN ETKİSİ

Tülay KILIÇASLAN AYNA*, Filiz AYDIN*, Sevgi BEŞİŞİK**, Mahmut ÇARIN*

ÖZET

Standart mixed lymphocyte culture (Standart karışık lenfosit kültürü-sMLC) allogeneik kemik iliği transplantasyonu (KİT) yapılacak hastalara uygun vericinin seçilmesinde, özellikle human leukocyte antigen (HLA)-D grubu antijenlerini saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Bununla birlikte sMLC ile HLA-DP ve minör histokompatibilite antijenlerinin uyumsuzluğu ve bunun sonucunda oluşan graft versus host hastalığı (GVHH) belirlenemeyebilir. Alıcı ve donör arasında, eğer varsa saptanamayan proliferatif cevapları saptamak ve KİT'da başarıyı artırmak amacıyla sMLC modifiye edilebilir.

Bu nedenle KİT'na hazırlanan ve sMLC sonucu negatif olan, 25 bireyin farklı yönlerdeki 26 alıcı-verici hücre kombinasyonuna aynı zamanda interlökin-2 (IL-2) ilave ederek modifiye ettiğimiz MLC (mMLC) ile de bu antijenlere bağlı farklılığı saptamayı amaçladık. 19 mMLC testinde SI değerlerindeki artışında bu farklılıktan kaynaklanabileceğini düşündük.

İmmünesupresiflere karşı oluşan duyarlılık ve direnç bireyden bireye değişiklik göstermektedir. Bu da graftın kabul veya reddedilmesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle mMLC testine, nakil sonrası kullanılan ajanlardan cyclosporine-A (Cyc-A) ve methylprednisolone (MeP) ekleyerek, bu ajanların antiproliferatif etkilerini karşılaştırdık. Sonuçta 26 testten 12'sinin MeP'e, 13'ünün Cyc-A'ya daha duyarlı olduğunu gördük. Bir testte ise MeP ve Cyc-A'ya karşı olan duyarlılığın eşit olduğunu saptadık.

Anahtar kelimeler: Kemik iliği transplantasyonu, karışık lenfosit kültürü, interlökin-2, immünesupresif

SUMMARY

Effect of Immunosuppressive drugs in Modified WLC with activated IL-2. SMLC is a method which is used in choosing an adequate donor for allogeneic bone marrow transplantation (BMT) patients by detecting human leukocyte antigen (HLA)-D antigens. Besides, with this method HLA-DP and minor histocompatibility and eventually graft versus host disease (GVHD) may not be detected. Proliferative responses if exist between donor and recipient and to ameliorate BMT outcomes standart mixed lymphocyte culture (sMLC) can be modified.

IL-2 was added in 25 donor-recipient combinations undergoing BMT and sMLC and we tried to detect the difference due to antigens.

In 19 patients, modified MLC (mMLC) test results are found be increased. This increase is suggested to result from the differences mentioned above.

Susceptibility of individuals to different immunosuppressive agent varies. Susceptibility and resistance is important in the acceptance and rejection of the graft for this reason, this agent are added to mMLC and compare their antiproliferative effect are compared. 12 out of 26 tests show susceptibility to MeP where is 13 tests to Cyc-A. Only one test show equal resistance to Mep and Cyc-A.

Key words: Bone marrow transplantation, mixed lymphocyte culture, interleukin-2, immunosuppression

GİRİŞ

KİT, hematolojik habis hastalıklar başlıca olmak üzere kalıtsal ve edinilmiş hastalıkların birçoğunda kesin tedavi şeklidir⁽¹⁹⁾.

1980'li yılların başından beri KİT, özellikle malign ve malign olmayan (iyi huylu) hematolojik hastalıklarda ve immün yetmezlik hastalıklarında gün geçtikçe artan bir uygu-

Mecmuaya geldiği tarih: 25.04.2001

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul

lama alanı bulmaktadır ⁽¹³⁾. Nakledilen doku veya organın kabul yada red edilmesi ise HLA genleri tarafından kodlanan proteinlerin kontrolü altındadır. Doku tiplendirmesinde, ilk aşamada HLA-ABC antijenleri serolojik olarak belirlenmektedir ⁽¹⁹⁾.

I. Sınıf antijenleri identik olan, alıcı-verici kombinasyonlarının HLA-D antijenleri ise, sMLC ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)'na dayalı teknikler ile saptanmaktadır.

II. Sınıf antijenlerdeki uyumsuzluğun akut GVHH riskini artırdığı bilinmektedir. Bununla sMLC testi ile saptanamayan HLA-DP ve minör histokompatibilite antijenlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir ⁽¹⁶⁾.

İmmünolojik reaksiyonlarda, immun sistem hücreleri sitokin adı verilen soluble maddeler salgırlar. Bunlardan en önemlisi çoğunlukla T hücrelerinden salgılanan IL-2'dir. IL-2, graft reddi veya GVHH'da rol oynayan hücrelerin aktif hale geçmesini ve çoğalmasını sağlar.

Klinikte sitokinlerin etkilerini bloke etmek ve T hücre aktivasyonunu engellemek amacıyla çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedavilerde antijene spesifik ve antijene spesifik olmayan ajanlar kullanılmaktadır. Son yıllarda kortikosteroidler ve Cyc-A klinikte en yaygın kullanılan spesifik olmayan ajanlardır ⁽²¹⁾. Bunlardan Cyc-A stoplazmada kalmodulini inaktif hale getirir veya peptidil prolin izomeraz siklofilini aktive eder. Bu şekilde T hücrelerinin aktivasyonu süresince kalsiyuma bağlı sinyal transdüksiyonu engellenir ^(12,22). Kortikosteroidler ise özellikle

makrofajlar tarafından sentezlenen sitokinlerin sentezini inhibe ederek T hücrelerinin aktivasyonunu engeller ^(5,10).

Bu çalışmada IL-2 ilavesiyle hücreler stimüle edilerek sMLC modifiye edilmiş, ayrıca aktif hücreler üzerindeki immunsupresiflerin antiproliferatif etkileri karşılaştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çeşitli hematolojik hastalıklar sebebiyle, allogeneik KİT planlanan 25 hasta ve bu hastaların birer sağlıklı vericisi (kardeş veya ak-raba) olmak üzere toplam 50 kişi çalışmaya dahil edildi.

Hasta ve vericilerin çevre kanı mononükleer hücreleri (PBMC), Ficol hypaque gradient santrifüj yöntemi ile elde edildi. Alıcı hücre sayısı 1.106 h/ml'ye, verici hücre sayısı 2.10⁶ h/ml'ye ayarlandı.

Stimülatör (verici) hücreleri 2000 rad'da ışınıldı. sMLC için alıcı-alıcı, alıcı-verici, alıcı kontroller olmak üzere 12 kuyu açıldı. mMLC için sMLC testine benzer şekilde, toplam 8 kuyu açıldı. Eşit sayıdaki alıcı-verici hücrelerin üzerine 10 µl (1000 U/ml) IL-2 eklendi. mMLC testinde immunsupresiflerin (Cyc-A ve MeP) etkilerini görmek için hazırlanan serilere (Cyc-A için 8 kuyu, MeP için 8 kuyu) 40 µl MeP (5 µg/ml) ve 40µl Cyc-A (50µg/ml) eklendi ve hücreler Tablo 1'de görüldüğü gibi düzenlendi.

Kültür plakları 37°C, nemli, %5 CO₂ bulunan inkübatöre yerleştirildi. 96.saatte kültür ortamına her kuyuya 50 µl³H tymidin eklendi. 24 saat sonra cell harvester (hücre toplama

Tablo 1. Kültür plağında hücrelerin yerleşim düzeni

Alıcı-Alıcı (A-A)	Alıcı-Verici (AV*)	Alıcı-Kontrol (A-K*)	Alıcı-Kontrol (A-K*)
sMLC	sMLC	sMLC	sMLC
mMLC	mMLC	mMLC	mMLC
IL-2+Cyc-A	IL-2+Cyc-A	IL-2+Cyc-A	IL-2+Cyc-A
IA-2+MeP	IL-2+MeP	IL-2+MeP	IL-2+MeP

ıyıcı) ile hücreler filtre kağıdı üzerine toplanarak kurutuldu. Herbir filtre kağıdı farklı bir sayım şişesine alındı. Şişelere sintilasyon sıvısı (toluol / PPO, 2 ml/0.06mg) eklenerek β counter (β sayacı)'da sayım yapıldı.

Sonuçlar stimülasyon indeksi (SI) ve relative response indeksi (RRI) olarak hesaplandı. sMLC testinde SI değerinin <1 ve RRI sonucunun ise negatif olması KİT için uygunluğu ifade etmektedir. Bu çalışmada sonuçlarımızı SI değerlerini göz önüne alarak değerlendirdik.

BULGULAR

sMLC test sonucu negatif olan 25 bireye değişik yönlerde 26 mMLC testi uygulandı.

Bu testlerden 17'si alıcı, 9'u verici yönündeydi (I. Aşama alıcı yönü, II. Aşama verici yönüdür). mMLC testlerinden 19'unda SI değerlerinde yükselmeler görüldü. 7'sinde ise SI değerlerinde azalma olduğu saptandı.

Aynı grup içinde, IL-2 ile aktive edilmiş allogeneik hücrelere eklenen MeP'e karşı 12 bireyin (1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 20, 24 nolu testler) Cyc-A'dan daha duyarlı olduğu, 13 bireyin ise (3, 5, 9, 13, 14, 17, 18 I. aşama, 18 II. aşama, 19, 21, 22, 23, 25 nolu testler) Cyc-A'ya daha duyarlı olduğu belirlendi. Bir birey de ise (7 nolu test) MeP ve Cyc-A kullanılması sonucunda elde edilen SI değerleri eşitti. Toplam 4 bireyde (5, 7, 21, 24) her iki ajana karşı direnç olduğu saptandı (Tablo 2).

Grafik 1'de ise sMLC'ye ilaveten yapılan çalışmalarda SI'lerinin ortalama değerleri görülmektedir.

TARTIŞMA

Kemik iliği vericilerinin seçiminde HLA I. ve II. Sınıf antijenleri, serolojik ve moleküler tiplendirme yöntemleri ile belirlenmektedir.

Belirlenemeyen II.Sınıf antijenleri ise sMLC testi ile saptanmaktadır⁽⁸⁾. Bu test, alıcı verici uygunluğunun belirlenmesinde kullanılan rutin bir doku tiplendirme testi olarak uygulanmaktadır. Ancak KİT, genotipik olarak uygun bireyler arasında yapıldığında bile GVHH ve graft reddi riski hala mevcuttur^(7,24). Bu da saptanamayan HLA determinantlarının ve minör histokompatibilite antijenleri gibi henüz belirlenemeyen transplantasyon antijenlerinin varlığından kaynaklanır^(4,11). II. Sınıf antijenleri arasında en güçlü stimülasyonu, HLA-DR antijenleri meydana getirmekle birlikte HLA-DQ ve DP antijenlerinin de allogeneik T hücre stimülasyonunda rol oynadığı bildirilmektedir^(6,7). sMLC testi ise minör histokompatibilite ve HLA-DP antijenlerini saptanamadığından, bu antijenlerden kaynaklanabilecek graft reddi ve GVHH'ni belirleyemeyebilir⁽¹⁴⁾. Bu nedenle uygun verici seçimi ve tam olarak KİT'e karar vermek için sMLC testinin duyarlılığının artırılması gerektiği vurgulanmaktadır. HLA identik bireyler arasında, eğer varsa saptanamayan proliferatif cevapları araştırmak amacıyla sMLC testinin modifiye edilebileceği bildirilmektedir⁽¹⁾.

Moreau ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HLA-A, B, DR, DQ identik kardeşlerde DP uyuşmazlığının rekombinasyonlara bağlı olarak nadir de olsa görüldüğü bildirilmiştir⁽¹⁵⁾. Pawelec ve arkadaşları da HLA-DR ve DP gen bölgeleri arasında %1-3 oranında rekombinasyon olduğunu açıklamışlardır⁽¹⁸⁾. Ancak yinede HLA-DP uyumsuzluğu olduğu durumlarda bile sMLC sonucunun negatif olduğunu bildiren çalışmalar vardır⁽¹⁶⁾.

İmmun reaksiyonların oluşumunda sitokinler önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle sMLC testine sitokinlerin eklenmesi, nakil sonrasında gelişebilecek komplikasyonları önceden belirleyebilir. Özellikle IL-2'nin allogeneik stimülasyonu etkilediği bu nedenle transplantasyonda önemli olduğu bildirilmektedir⁽²⁾.

Tablo 2. sMLC (-) olan bireylerin SI değerleri ile IL-2, ve IL-2 MeP + IL-2+Cyc-A uygulanan bireylerin SI değerleri

No	SMLC		IL-2		IL-2+MeP		IL-2+Cyc-A	
	I. AŞAMA	II. AŞAMA	I. AŞAMA	II. AŞAMA	I. AŞAMA	II. AŞAMA	I. AŞAMA	II. AŞAMA
1		0.32		0.55		0.30		0.40
2		0.50		0.66		0.55		0.72
3		0.35		0.69		0.51		0.30
4		0.77		0.89		0.40		1.66
5	0.48		1.73		2.29		2.08	
6		0.61		0.62		0.33		0.53
7*		0.39		0.79		1.2		1.2
8		0.50		0.53		0.37		0.41
9	0.53		0.60		0.32		0.31	
10	0.48		0.71		0.57		0.63	
11	0.40		0.95		0.17		0.40	
12	0.29		0.69		0.24		0.30	
13	0.52		0.46		0.36		0.15	
14	0.29		0.60		0.20		0.18	
15	0.68		0.83		0.47		0.72	
16		0.26		0.60		0.23		0.34
17	0.29		0.57		0.25		0.04	
18	0.72		1.12		0.76		0.28	
18		0.33		0.47		0.34		0.17
19	0.43		0.42		0.44		0.23	
20	0.85		0.52		0.33		1.25	
21	0.86		0.95		1.09		1.00	
22	1.10		0.37		0.56		0.12	
23	1.03		0.20		0.25		0.16	
24	0.60		0.50		0.57		0.67	
25	0.18		0.17		1.40		0.08	

*: Işınlanmış

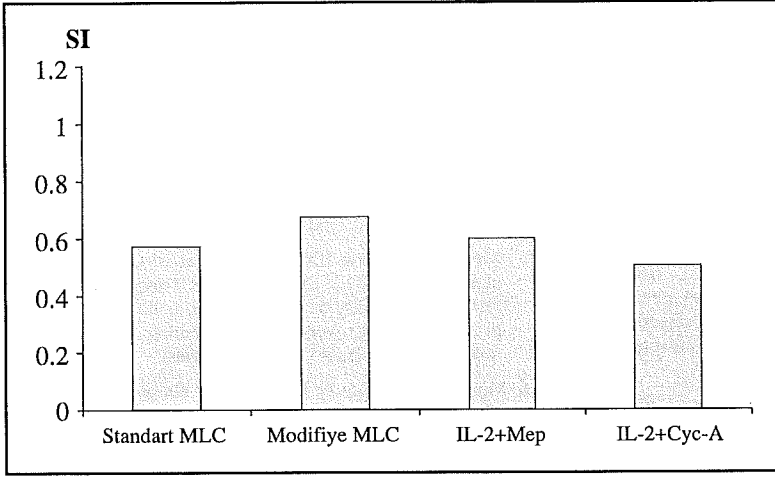
IL-2, T hücreleri, için en önemli büyüme faktörüdür. Bu sitokin salınımı, immün reaksiyonda rol oynayan diğer sitokinlerin salınımını da etkiler. Bu sitokinlerden IFN- γ HLA I. ve II. sınıf antijenlerin ekspresyonunu artırmaktadır (23). İn vitro çalışmalarda IL-2'nin küçük miktarlarının sMLC testinde maksimum IFN- γ üretimi için yeterli olduğu gösterilmiştir (25).

sMLC testine IL-2 eklenmesi ile HLA-DP antijenlerinin ve minör histokompatibilite

antijenlerinin ekspresyonunun artabileceği, böylece mMLC sonucunda bu antijenlerden kaynaklanan farklılığın saptanabileceği belirtilmektedir (1).

Bu amaçla çalışmamızda sMLC sonucu negatif olan 26 teste mMLC uyguladık. Tablo 2'de görüldüğü gibi bunlardan 19'unun (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18-I.aşama, 18-II. aşama, 21) SI değerlerinde artış, 7'sinde (13, 19, 20, 22, 23, 24, 25) ise azalmalar olduğunu belirledik.

Grafik 1. sMLC, mMLC, IL-2+MeP ve IL-2+Cyc-A'nın SI değerleri



sMLC ve mMLC istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde SI değerlerinin ortalama 0.4800 ± 0.2000 (sMLC)'den 0.6618 ± 0.323 (mMLC)'e çıktığını belirledik. Wilcoxon testine göre IL-2 eklenmesiyle SI değerlerindeki artış istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p=0.0282$).

İmmün mekanizmayı kontrol altında tutmak için çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Bu konuyla ilgili çeşitli invitro çalışmalar yapılmıştır. Zeevi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada purin ve pirimidin sentez inhibitörlerinin yanında FK506 ve Cyc-A'nın inhibitör etkilerini karşılaştırmışlardır (26).

Pollak ve arkadaşları da solid organ alıcılarının immunsupresif tedavide kullanılan Cyc-A ve MeP'e karşı lenfosit duyarlılığının invitro çalışma ile tahmin edilebileceğini göstermişlerdir. Çalışmalarında kronik böbrek yetmezliği olan hastalara invitro Cyc-A ve MeP uygulayarak, hastaların bu ilaçlara karşı olan duyarlılık ve direnç durumlarını saptamaya çalışmışlardır. Her iki ajana duyarlı olan lenfositlere sahip bireyler, SS (sensitiv-sensitiv), dirençli olan lenfositlere sahip bireyler RR (resistant-resistant) ve bunlardan birisine duyarlı olanlar SR-RS (Cyc-A/MeP-MeP/Cyc-A) olmak üzere gruplara ayrılmıştır. Transplantasyon yapılan grupta RR ve RS hastalarda, akut rejeksiyon riskinin yük-

sek olduğunu açıklamışlardır (20).

Kemik iliği nakli adayları ile yaptığımız çalışmada 25 bireye ait mMLC testinde kuyulara ilave ettiğimiz MeP ve Cyc-A'nın etkisini, mMLC ile SI değerlerini karşılaştırdığımızda 26 bireyden 12'sinin (1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 20, 24 nolu testler) MeP'a 13'ünün ise (3, 5, 9, 13, 14, 17, 18-I. aşama, 18-II. aşama, 19, 21,

22, 23, 25 nolu testler) Cyc-A'ya karşı duyarlı olduğunu saptadık. Bir bireyde ise MeP ve Cyc-A'ya karşı duyarlılık eşitti. Toplam 4 bireyin (5, 7, 21, 24) her iki ajana karşı dirençli olduğunu tesbit ettik (Tablo 2). Sonuçlarımızı istatistiksel açıdan değerlendirdiğimizde hem MeP, hem de Cyc-A'nın inhibitör etkisi (Mep için ortalama 0.6560 ± 0.315 'den -0.5320 ± 0.461 'e düşmüş ve $p=0.016$, Cyc-A, için ortalama, 0.6560 ± 0.315 'den -0.5320 ± 0.502 'e düşmüştür ve $p=0.024$) anlamlı idi.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastalardan 8 tanesine allogeneik KİT yapılmıştır. Bunlardan 7 numaralı birey her iki ajana, 16 ve 24 numaralı bireylerde Cyc-A'ya, 8, 19 ve 25 numaralı bireyler de ise MeP'e karşı direnç geliştiğini saptadık. 14 ve 23 numaralı bireyler her iki ajana karşı duyarlı idi. 7 (235.gün) ve 24 (55.gün) numaralı hastalar aGVHH sonrası kaybedildi. 23 numaralı hastada red görüldü. 25 numaralı hastanın halen yoğun immunsupresif tedavi aldığı bildirilmiştir.

Literatürlerde MLC'nin HLA-DP ve minör histokompatibilite antijenlerinden kaynaklanan farklılığı saptamakta yetersiz olduğu belirtilmektedir. sMLC'ye IL-2 eklenmesiyle bu antijenlerin ekspresyonlarının artabileceği, böylece mMLC sonucunda bu antijenlerden kaynaklanan farklılığın saptanabileceği

belirtilmektedir⁽²⁶⁾. Aynı zamanda mMLC'ye immunsupresif ajanların eklenmesi ile görülen direnç ve duyarlılığın KİT'u sonrasında uygulanacak tedaviye yol gösterici olabileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Amal B, Chaim B, Arnan N, Shimon S, Benny L, Izhak C, Eli K: Prediction by a modified mixed leukocyte reaction assay of graft-versus host disease and graft rejection after allogeneic bone marrow transplantation, *Transplantation* 57: 1474 (1994).
2. Degiannis D, Czannecki M, Hornung N, Raskova J, Raska K: Mixed lymphocyte reaction-induced release of soluble IL-2 receptor, *Transplantation* 51: 518 (1991).
3. Dupond B, Handzen J, Yunis ES: Human Mixed Lymphocyte culture reaction, genetics, specificity and biological implications *Adv. Immunology* 107 (1976).
4. Gale RP, Bortin MM, Van Bekkum DV: Risk factors for acute graft-versus host disease, *Br J Hematol* 67: 397 (1987).
5. Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM: Functional domains of the human glucocorticoid receptor, *Cell* 46: 645 (1986).
6. Goulmy E: Minor histocompatibility antigen in man and their role in transplantation, *Transplant Rev* 2 (1988).
7. Goulmy E, Gratame JW, Blockland E, Evans FE, von Rood JJ: A minor transplantation antigen detected by MHC restricted cytotoxic T lymphocytes during graft-versus host disease, *Nature* 302: 159 (1983).
8. Hansen JA, Mickelson E, Beaty PG, Thomas D: Clinical bone marrow transplantation, donor selection and recipient monitoring, In: NR. Rose, H. Friedman, JL. Fahey, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 892 (1986).
9. Hansen SA, Mickelson EM, Choo SY, et al: Clinical bone marrow transplantation. Donor selection and recipient monitoring In: Rose NR, De Mucario EC, Rahey SL, Friedman H, Penn GM eds.: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* American Society Microbiology, 350 (1992).
10. Hollenberg SM, Giguere V, Segui P, Evans RM: Colocalization of human glucocorticoid receptor, *Cell* 49: 39 (1987).
11. Irle C, Beaty PG, Mickelson E, Thomas D, Hansen J: Alloreactive T cell responses between HLA- identical siblings: Detection of anti-minor histocompatibility T cell clones induced in vivo, *Transplantation* 40: 329 (1985).
12. Konuk N: Akut Graft Versus Host Hastalığı, *Klinik Gelişim* 10: 57 (1997).
13. Kuby J: *Transplantation Immunology, Immunology*, Third edition, 567 (1997).
14. Lim SH, Patton WM, Jobson S, et al: Mixed lymphocyte reactions do not predict severity of graft versus host disease (GVHD) in HLA-DR compatible sibling bone marrow transplants, *J Clin Pathol* 41: 1155 (1988).
15. Moreau P, Bignon JD, Milpied N, et al: Genomic HLA-class II typing (DR, DQ, DP) MLR I and GVH disease: retrospective study of 41 allogeneic bone marrow transplantations, XVth Annual ASHI Meeting, Human Immunology (Special Issue), Toronto, (1989)
16. Moreau P, Cesborn A: HLA DP and allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant* 13: 675 (1994).
17. Odum N, Platz P, Jakobsen BK, et al: HLA-DP and bone marrow transplantation: DP incompatibility and severe acute graft-versus host disease, *Tissue Antigen* 30: 213 (1987).
18. Pawelec G, Ehninger G, Schmat H, Wernet P: HLA DP matching and graft versus host disease in allogeneic bone marrow transplantation, *Transplantation* 42: 588 (1986).
19. Peakman M, Vergani D: *Transplantation, Basic and Clinical Immunology*. 160 (1996).
20. Pollak R, Dumble LJ, Lazda VA, Maddux MS, Stormoen B, Ward M: Utility of in vitro immunoassay guide immunosuppressive therapy, *Transplant Proc* 23: 1113 (1991).
21. Roitt I, Brostoff S, Male D: *Transplantation and Rejection, Cellular and Molecular Immunology Second Cellular and Molecular Immunology*, Fourth edition, 26:8 (1996).
22. Stites DS, Terr AL, Parslow TG: *Clinical Transplantation, Basic and Clinical Immunology*, 744 (1994).
23. Stites DP, Terr AI, Parslow TG: *Cytokines, Basic and Clinical Immunology*, Eighth edition, 100 (1994).
24. Storb R, Deeg HJ, Pepe M, et al: Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft versus host disease in patients given HLA identical marrow grafts for leukemia: Long-term follow-up of a controlled trial, *Blood* 73: 1729 (1989).
25. Susanne G, Danzer H, Kirchner L, Rink: Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture, *Transplantation* 57: 1638 (1994).
26. Zeevi A, Yao G-Z, Venkataramanan R, Dujesnoy RJ, Todo S, Fung JJ, Starzl TE: Comparative in vitro studies on the immunosuppressive effects of purin and pyrimidine synthesis inhibitors, *Transplant Proc* 25: 781 (1993).