

# Fiziologija reaktivnosti mladih štakora na alogeni kalem nakon senzibilizacije majke

---

Rukavina, Daniel

Doctoral thesis / Disertacija

1972

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:865139>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



DANIEL RUKAVINA

FIZIOLOGIJA REAKTIVNOSTI MLADIH ŠTAKORA NA ALOGENI KALEM  
NAKON SENZIBILIZACIJE MAJKE

D i s e r t a c i j a

MEDICINSKI FAKULTET

RIJEKA

1971.

## I AUTOR

---

Ime i prezime	MR DANIEL RUKAVINA
Datum i mjesto rođenja	22. II 1937. Sarajevo
Ime oca i majke rođ.prezime	Mile i Magdalena r. Krešić
Naziv, mjesto i datum završene srednje škole	Državna realna gimnazija Tuzla, 1955. godine
Naziv fakulteta odnosno ustanove i datum završene nastave II stupnja	Medicinski fakultet Zagreb, 29. I 1962. godine
Sadašnje zaposlenje	Asistent na Zavodu za fiziologiju Medicinski fakultet u Rijeci

---

## II DISERTACIJA

---

N a s l o v	"Fiziologija reaktivnosti mladih štakora na alogeni kalem nakon senzibilizacije majke"
Br.strana, slika, grafikona, tablica i lit.	176 strana, 12 slika i grafikona, 10 tablica i 17 str. lit.
Ustanova ili mjesto gdje je izrađena	Zavod za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci
Naučna disciplina iz koje je postignut doktorat nauka	doktorat medicinskih nauka iz područja Fiziologija
Fakultet na kojem je obranjena	Medicinski fakultet - Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme	19. I 1970. godine
Datum predaje rada	11. XI 1971. godine
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen za disertaciju	12. I 1972. godine
Sastav Komisije koja je rad ocjenila	dr Šime Vlahović, izv.prof., dr Nikša Allegretti, red.prof. i Davor Perović, red.prof.
Datum obrane rada	24. siječnja 1972. godine
Sastav Komisije pred kojom je rad obranjen	dr Šime Vlahović, izv.prof., dr Nikša Allegretti, red.prof. i Davor Perović, red.prof.
Datum promocije	3. III 1972.

---

Ova disertacija izrađena je u cijelosti u Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Zahvaljujem Upravi fakulteta što mi je omogućila izradu disertacije i materijalno potpomogla njeno opremanje. Rad na ovoj temi je materijalno potpomognut i sredstvima Saveznog fonda za naučni rad (Ugovor br.3240/69, sklopljen sa Zavodom za fiziologiju).

Zahvaljujem se mentoru prof.dr Šimi Vlahoviću, predstojniku Zavoda za fiziologiju, na pomoći u izboru teme, te savjetima i kritičkim primjedbama u diskusiji dobivenih rezultata. Prof.dr Vlahoviću dugujem trajnu zahvalnost za nesebičnu pomoć, koju mi je pružio u dosadašnjem radu na problemima transplantacijske imunologije, jer je i dio njegovog bogatog znanstveno-istraživačkog iskustva ugrađen u postignute rezultate.

Kolegama i osoblju Zavoda za fiziologiju zahvaljujem na podršci i razumijevanju, kojim su **popratili moj dosadašnji rad**. Posebno želim izraziti zahvalnost za savjestan i predan rad: Davorki Perčinić i Nikoli Mikić, laborantima, u izvođenju pokusa; Viktoriji Petrešević, činovnici, za pisanje matrica i pomoć u opremi radnje, u čemu je sudjelovala i Jelena Šikić, laborant. Bratu Anti dugujem zahvalnost za trud, koji je uložio u crtanju slika.

Rijeka, listopada 1971.

Daniel Rukavina

S A D R Ź A J

	STRANICA
1. U V O D .....	1
2. O P Ć I   D I O .....	2
2.1. <u>REAKCIJA ORGANIZMA NA TUĐE TKIVO</u> .....	3
2.1.1. TKIVNA SRODNOST (HISTOKOMPATIBILNOST)....	3
2.1.2. PRIRODA TRANSPLANTACIJSKE REAKCIJE.....	6
2.1.2.1. <u>Uloga stanica u transplan-</u> <u>tacijskoj reakciji</u> .....	6
2.1.2.2. <u>Uloga humoralnih protuti-</u> <u>jela u transplantacijskoj</u> <u>reakciji</u> .....	12
2.1.3. IMUNOLOŠKA FACILITACIJA (ENHANCEMENT)....	19
2.2. <u>IMUNOLOŠKE KARAKTERISTIKE PERINATALNE DOBI</u> .....	25
2.2.1. FETUS KAO ALOKALEM.....	25
2.2.2. STEČENA IMUNOLOŠKA TOLERANCIJA.....	30
2.2.3. SAZRIJEVANJE IMUNOLOŠKOG ODGOVORA.....	35
2.2.4. UTJECAJ IMUNOSTI MAJKE NA IMUNO- LOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI.....	38
3. O B R A Z L O Ź E N J E   T E M E.....	46
4. M A T E R I J A L   I   M E T O D E .....	48
4.1. <u>POKUSNE ŽIVOTINJE</u> .....	48
4.2. <u>TEHNIKA KOŽNOG KALEMA</u> .....	49
4.3. <u>KATEGORIZACIJA STUPNJA TOLERANCIJE NA</u> <u>PRESAĐENE KALEME</u> .....	52

4.4. <u>PRIPREMA STANIČNIH SUSPENZIJA ZA SENZIBILIZACIJU</u> .....	52
4.5. <u>HIJALURONIDAZA</u> .....	54
4.6. <u>ODVAJANJE SERUMA</u> .....	55
4.7. <u>TEST HEMAGLUTINACIJE ( METODA SA DEKSTRANOM )</u> .....	56
4.8. <u>STATISTIČKE METODE</u> .....	58
5. R E Z U L T A T I , O P A Ž A N J A I D I S K U S I J A .....	60
5.1. <u>UTJECAJ IMUNOKOMPETENTNIH STANICA I HUMORALNIH PROTUTIJELA, PRENESENH IZ ORGANIZMA MAJKE, NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI. POKUSI NA GENETIČKI ČISTIM SOJEVIMA ŠTAKORA</u> .....	60
5.2. <u>UTJECAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA SENZIBILIZACIJE MAJKI NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI</u> .....	81
5.2.1. POKUSNE GRUPE .....	82
5.2.2. PREŽIVLJAVANJE RODITELJSKIH KALEMA .....	86
5.2.3. DISKUSIJA .....	91
5.3. <u>PRIJENOS STANICA IZ ORGANIZMA MAJKE U FETUS PREKO PROPUSNIJE PLACENTE</u> .....	99
5.3.1. PLAN POKUSA .....	100
5.3.2. ODBACIVANJE PRESAĐENIH KALEMA .....	103
5.3.3. DISKUSIJA .....	108
5.4. <u>UTJECAJ ISTOVREMENOG PRIJENOSA MAJČINIH PROTUTIJELA: HUMORALNIH I STANIČNIH, NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI</u> .....	120
5.4.1. POKUSNE GRUPE .....	122

5.4.2. ODBACIVANJE RODITELJSKIH KALEMA.....	123
5.4.3. PRODUKCIJA HEMAGLUTININA .....	128
5.4.4. DISKUSIJA .....	133
6. ZAKLJUČNI PREGLED .....	155
7. LITERATURA .....	160



1. U V O D

Mladunčad sisavaca po svojoj se reaktivnosti na mnoge podražaje znatno razlikuje od odrasle, zrele životinje. Mišljenje, da je mladi organizam funkcionalno nedostatan zbog svoje "opće nezrelosti" u novije vrijeme se sve to više napušta. Prema novijim shvaćanjima utjecaji okoline mogli bi u tom pogledu imati mnogo važniju ulogu.

Nema sumnje, da se aktom poroda uvjeti okoline mladunčeta radikalno mijenjaju. Dok su, za vrijeme embrionalnog i fetalnog razvoja svi njegovi funkcionalni sistemi najintimnije povezani sa organizmom majke, dotle su od momenta prekida te veze oni prepušteni utjecaju, ponekad čak i vrlo agresivne, okoline. Jasno je da pri tom ne možemo zanemariti utjecaj prvobitne fiziološke veze s majkom na reaktivnost bilo kojeg njegovog funkcionalnog sustava. Takvih utjecaja nije lišena ni imunološka reaktivnost mladunčeta. Štoviše, dobro je poznata zaštitna uloga pasivno prenijetih protutijela iz majke. No, ta adoptirana imunitet majke, može, čini se, znatno utjecati i na konačno uspostavljanje vlastite imunološke reaktivnosti mlade životinje. Može se stoga pretpostaviti da će i drugi oblici imunoloških reakcija mladunčeta ovisiti i o imunološkoj kompetenciji majke.

Glavni je predmet ove rasprave proučavanje reaktivnosti mladunčeta na presađena alogena tkiva. Budući da je reaktivnost na presađena tkiva u osnovi imunološka, posebnu smo pažnju posvetili proučavanju utjecaja majčine imuniteta na transplantacijsku reaktivnost mladunčadi.

Prikazi znanstveno-istraživačkih podataka koji omogućavaju pristup ovoj temi sadržan je u Općem dijelu rada. U prvom

njegovom dijelu raspravlja se o reakciji organizma na tuđe tkivo općenito. Pri tome se posebno opisuje uloga stanica i uloga humoralnih protutijela u transplantacijskoj reakciji, jer fiziološke veze između majke i fetusa, odnosno mladunčeta omogućavaju prijenos i jednih i drugih. U drugom dijelu se govori o osobitim oblicima reaktivnosti organizma sisavaca u perinatalnoj dobi. Tu se pored kratkog prikaza saznanja o sazrijevanju imunološke reaktivnosti posebno razmatra položaj fetusa kao prirodnog alogenog kalema i stečena imunološka tolerancija. Končno, navode se i oni podaci koji nam omogućavaju uvid u poznate utjecaje majčine imunosti na imunološku reaktivnost mladunčadi.

2. O P Ć I D I O

## 2.1. REAKCIJA ORGANIZMA NA TUĐE TKIVO

### 2.1.1. TKIVNA SRODNOST ( HISTOKOMPATIBILNOST )

Poznavanje genetičkih razlika između primaoca i davaoca od bitne je važnosti za povoljan ishod transplantacije stanica, tkiva ili organa. Velike genetičke razlike među pripadnicima iste vrste sisavaca uzrok su brzog odbacivanja presađenog kalemata. Genetička identičnost, u takvoj populaciji, nalazi se samo u jednojajčanih blizanaca. Međutim, slučajnim izborom partnera mogu se i u genetički nesrodnoj populaciji naći pojedinci koji su međusobno vrlo srodni ili vrlo različiti, a genetička sličnost jedan je od osnovnih uvjeta za uspjeh transplantacije.

Specifičnu građu organizma predodređuje na tisuće gena, ali su samo neki od njih odgovorni za prihvatanje ili odbacivanje tuđeg tkiva. Detaljna genetička istraživanja pokazala su da možemo razlikovati posebnu vrstu dominantnih gena, koje je Snell (1948) nazvao genima histokompatibilnosti ili tkivne srodnosti. Ovi geni predodređuju sudbinu presađenog alokalema ili tumorskog tkiva. Općenito se smatra, da su dominantni, iako ova dominantnost ne mora uvijek biti potpuna ( Celada i Welhsons 1962; Prehn i Main 1954 ). Geni tkivne srodnosti se nasljeđuju prema Mendelovim zakonima. Antigeni tkivne srodnosti specifični su i krajnji produkti gena tkivne srodnosti. Odbacivanje presađenog alokalema predstavlja imunski odgovor domaćina koji je usmjeren baš na antigene tkivne srodnosti koji su prisutni na kalemnom tkivu, a odsutni u domaćinu ( Berrian i Brent 1958;

Snell 1957; Palm 1961; Batchelor 1965; Hašek i sur. 1961; Russell i Monaco 1955.). Međutim, svi geni, odnosno antigeni jedne jedinice koji su odgovorni za tkivnu srodnost, nisu specifični samo za nju. Naime, dva slučajno odabrana partnera iz genetički nesrodne populacije mogu imati i neke zajedničke antigene tkivne srodnosti, ali se istovremeno mogu razlikovati obzirom na druge ( Vlahović i Vlahović 1969 ). Potpuno prihvaćanje presađenog kalema bez nekih posebnih mjera rezultira samo<sup>1</sup> jedino ako transplantat ne posjeduje one antigene histokompatibilnosti koji su odsutni u domaćinu ( Snell 1948 ).

Broj gena histokompatibilnosti nije isti u svih specijes. Ovi geni su smješteni na različitim kromozomskim lokusima ( Palm 1961; Billingham i Silvers 1959; Popp 1967.). Razumljivo je da su genetički čisti sojevi životinja omogućili veliki napredak u proučavanju genetičkih osnova procesa odbacivanja ili prihvaćanja presađenog tkiva ( Billingham i Silvers 1959.). Svi pripadnici jednog čistog soja imaju isti genetički sastav i tkivo bilo kojeg pripadnika soja primaju kao vlastito. Jedina razlika, unutar čistog soja, očituje se ako kalem mužjaka presadimo na ženku. U takvoj kombinaciji odbacivanje kalema može nastupiti zbog toga, što se na spolnom Y kromozomu mužjaka nalaze antigeni tkivne srodnosti koji su ženki nepoznati. Iako ovi antigeni pripadaju među tzv. slabe transplantacijske antigene, ipak uzrokuju odbacivanje kalema mužjaka. Kalem ženke presađen na mužjaka, unutar čistog soja, normalno se prihvaća, jer mužjak je genetički tolerantan na antigene determinirane spolnim X kromozomom. Ovo opažanje poznato je kao Eichwald-Silmserov fenomen ( Eichwald i Silmser 1955; Billingham i Silvers 1960; Snell 1956a.).

U zadnjih tridesetak godina, od radova Gorer-a (1937, 1938), koji je identificirao prvi antigen histokompatibilnosti, sve je više podataka koji omogućuju definiranje gena, odnosno antigena histokompatibilnosti u mnogih životinjskih vrsta. Antigeni histokompatibilnosti, kao konačni kemijski produkti gena histokompatibilnosti, međusobno se razlikuju po intenzitetu reakcije koju induciraju u organizmu domaćina. Antigene koji uzrokuju snažnu reakciju odbacivanja svrstavamo u jake, a one koji dovode do slabije reakcije nazivamo slabim antigenima tkivne srodnosti. Najbolje su istraženi i definirani geni histokompatibilnosti u miša, a posebno oni na H-2 lokusu histokompatibilnosti, koji su po svojim antigenima i naj snažniji, pa uzrokuju vrlo snažni imuni odgovor primaoca. Intenzitet imunog odgovora u miša nalazi se u korelaciji sa brzinom odbacivanja alokalema<sup>x</sup> kože i tumora, kao i sa stvaranjem humoralnih protutijela ( Snell 1948 ; Snell i sur. 1953). H-2 lokus u miša determinira ne samo najjače transplantacijske antigene kalema, već i stanične antigene na površini eritrocita i drugih stanica, pa ih nije bilo teško identificirati serološkim metodama. Pretpostavlja se da u miša ima najmanje 15 lokusa histokompatibilnosti (Barnes i Krohn 1957 ; Prehn i Maine 1958 ; Billingham i sur. 1962a), a detaljno je istraženo 13, od kojih su 2 vezana za spolne X i Y kromozome. (Batchelor 1965).

Sistemi tkivne srodnosti istražuju se sve uspješnije i u drugih specijes. Jaki antigeni tkivne srodnosti u štakora pripadaju tzv Rt H-1 sistemu, u kojem je serološkim metodama otkriveno prisustvo više različitih alela (Štark i sur. 1968). Uspješan razvoj transplantacije zahtijevao je i u kliničkoj medicini odgovarajuće metode tipizacije za izbor pogodnog davaoca. Razrađene metode istraživanja na pokusnim životinjama omogućile su napredak i u ovom

---

<sup>x</sup> Prema terminologiji predloženoj od Gorera i sur (1961) alokalemi su kalemi koji se presađuju između jedinki iste specijes.

području, pa je u ljudskoj populaciji definiran HL-A sistem kao glavni sistem tkivne srodnosti (Ceppellini 1968 ; Ivanyi i Dausset 1966 ; Terasaki i sur. 1967 ; Terasaki i Singal 1969). HL-A sistem je ekvivalentan H-2 sistemu u miša, Rt H-1 sistemu u štakora i drugim sistemima histokompatibilnosti koji su poznati u ostalih sisavaca (Dausset 1969). U ovom je sistemu identificirano 15-20 više ili manje definiranih antigena (idem). Antigeni tkivne srodnosti prisutni su na vanjskoj površini stanične membrane, no nalazimo ih i na mnogo intimnijim strukturama stanice, kao što su napr. različite stanične organele (Monaco i sur. 1964 ; Basch i Stetson 1963 ; Walach i Vlahović 1967). Pokušaji da se odredi kemijska struktura specifičnih antigenih determinanti, nisu do danas dala sigurne rezultate. U najbolje pročišćenim preparatima ovih antigena nalazi se gotovo uvijek ugljikohidrate i aminokiseline (Davies 1967). Pa ipak se misli da je zadržavanje native strukture proteina bitno za imunogenetička i serološka svojstva antigena tkivne srodnosti (Kandutsch i Stimpfling 1966).

## 2.1.2. PRIRODA TRANSPLANTACIJSKE REAKCIJE

### 2.1.2.1. Uloga stanica u transplantacijskoj reakciji

Može se općenito smatrati da je imunosni odgovor organizma uvjetovan aktivnošću limfatičkih stanica, kako onih koje slobodno cirkuliraju, tako i nakupina stanica koje čine limfatička tkiva i organe. Prema tome, limfatičke stanice i tkiva čine anatomsku podlogu imunosnih reakcija.

Transplantacijski antigeni mogu se predstaviti imunološkom aparatu domaćina bilo u obliku solidnog kalema (napr koža, organi)



ili kao suspenzija pojedinačnih stanica, o čemu ovise osobine imunološkog odgovora, pa i način odbacivanja. Ako se kožni kalemi izmjenjuju između nesrodnih jedinki iste specijes može se u pravilu očekivati njihovo odbacivanje između prvog i drugog tjedna nakon presađivanja. Makroskopske i mikroskopske promjene, koje se očituju u presađenom kalemu, detaljno su opisane u drugim dijelovima teksta ( vidi: 4.2. ). Važno je naglasiti da se ortotopno ušiven<sup>alo</sup> kalem kože nakon par dana prihvati, dobije krvnu i limfnu opskrbu, te ima izgled normalnog tkiva, a tek nakon toga počinje reakcija odbacivanja. Ovo vrijeme latencije u imunom odgovoru potrebno je zato da organizam može primiti informaciju o tuđem antigenu i nakon toga mobilizirati svoj imunološki potencijal.

Još nije konačno razjašnjeno kako i u kojem obliku dolaze antigeni iz kožnog alokalema do centara imunološkog odgovora. Ipak se pretpostavlja da je regionalni limfni čvor, u koji se dreniraju limfne žile iz ležišta kalema, glavni centar imunološkog odgovora (Billingham i sur. 1954, 1963 ; Mitchison 1954, 1955). Brojni su eksperimenti pokazali da je povezivanje kalema sa domaćinom, preko limfnih žila, neophodan preduvjet za senzibilizaciju i imunološku reakciju domaćina. Organi ili tkiva koji nemaju limfnu drenažu "dozvoljavaju" duže preživljavanje alogenog kalema, pa se nazivaju "povlaštenim mjestima" za transplantaciju (Eichwald 1963). Tako je omogućeno preživljavanje alokalema smještenih na površinu mozga, jer u centralnom živčanom sustavu nema limfne drenaže (Medawar 1948). Sličan položaj ima i tkivo presađeno u vrećice na obrazima hrčka (cheek pouch), jer alogeni kalemi presađeni u njih ne senzibiliziraju domaćina (Billingham i Silvers 1962a)

Ulazak antigena u regionalne limfatičke strukture vjerojatno nije jedini način senzibilizacije domaćina solidnim kalemom, iako se pretpostavlja da je najvažniji. Induktivna faza imunog odgovora može se odigrati i u samom kalemu u koji prodiru limfociti iz krvi. Postoji mnogo dokaza da su mali limfociti imunološki kompetentne stanice, tj stanice koje se mogu reproducirati i imunološki djelovati u skladu sa informacijom koju su primile od nepoznatog antigena (Gowans 1962 ; Gowans i sur. 1961; Hildemann i sur. 1962). Stimulirani limfociti odlaze nakon toga u regionalne limfne čvorove (Medawar 1958a). Limfociti mogu pokazivati ovakvu reaktivnost jer su sposobni direktno reagirati sa antigenima histokompatibilnosti, prisutnim na kalemljenom tkivu (GOWans 1962; Gowans i sur. 1962, 1963). U korteksu regionalnih limfnih čvorova odvija se, potom, proces proliferacije stimuliranih limfocita. Poslije 4 ili više dana potomci ovih limfocita napuštaju regionalne limfne čvorove, odlaze po cijelom organizmu i naseljavaju ostale limfne čvorove. (Turk 1967). U toku seobe limfociti mogu reagirati protiv specifičnog antigena, ako sa njim dođu u kontakt, što predstavlja stanični (celularni) tip manifestacije imunološkog odgovora. Međutim, ograničena količina periferno fiksiranih antigena, koja "otputuje" u regionalne limfne čvorove, stimulira limfocite, koji se zatim pretvaraju u prekursore plazma stanica, pa dolazi do stvaranja humoralnih protutijela (idem). Burwell (1962) smatra da su mali limfociti, koji nastaju kao krajnji produkt diobe velikih limfocita, efektorne stanice stanične imunosti (tzv "celularna" protutijela), dok su veliki limfociti vjerojatno prekursori stanica koje secerniraju protutijela (tzv "humoralna" protutijela).

Noviji radovi posebno ističu ulogu timusa i još nekih limfatičkih struktura u sazrijevanju imunokompetentnih stanica i razvoju stanične, odnosno humoralne imunosti. Zametne stanice za sve imunokompetentne stanice nalaze se u koštanoj srži. Imunološku kompetenciju ove stanice postižu tek prolazom kroz timus, ili kroz Fabricijevu burzu - u ptica, odnosno odgovarajuće limfatičke strukture u sisavaca, koje još nisu poznate (Möller 1971). Stoga se ovi limfociti zovu T limfociti (thymus dependent), odnosno B limfociti (bursa equivalent). Izgleda da T limfociti imaju dvije različite funkcije: 1) odgovorni su za dugotrajnu imunološku memoriju, i 2) odgovorni su za imunost staničnog tipa. Za produkciju humoralnih protutijela odgovorni su isključivo B limfociti. U tome im T limfociti mogu pomoći, ali njihovo prisustvo nije neophodno (idem).

Transplantacijska imunost svrstava se u grupu reakcija preosjetljivosti "odgođenog" tipa, a ona pokazuje brojne sličnosti sa preosjetljivošću tuberkulinskog tipa (Lawrence 1957 ; Boyd 1956). Preosjetljivost odgođenog tipa može se prenijeti sa senzibilizirane životinje na normalnu samo injiciranjem suspenzije stanica iz limfnih čvorova, slezene, limfe duktus toracikusa i limfatičkih stanica krvi. (Chase 1953). Ovim se stanicama može prenijeti i imunost na alokalem u drugu životinju, pa u tom slučaju govorimo o imunosti stečenoj "adopcijom" (Mitchison i Dube 1955; Billingham i Brent 1956a). Za adoptivni prijenos imunosti neophodno je da su stanice žive, ali je uspjeh prijenosa ograničen i genetičkim, odnosno antigenim razlikama između primaoca i stanica koje se injiciraju. Prijenos imunosti biti će uspješan samo ako se senzibilizirane limfatičke stanice prenose u genetički identičnog ili tolerantnog primaoca. Serumom imunizirane životinje u pravilu se ne može prenijeti ova imunost, i pored visokog titra humoralnih protutijela (Billingham i Brent (1956a).

Opisana reakcija primaoca na presađeni alokalem solidnog tkiva naziva se reakcija domaćina protiv kalema ( DpK ) ili HvG reakcija (host-versus-graft). Isti tip reakcije razvija se i onda ako se primaocu injicira suspenzija alogenih stanica, kao napr suspenzija stanica bubrega, jetre, epidermisa ili limfatičkih stanica (splenociti, limfociti, timociti, koštana srž)(Billingham 1957 ; Congdon 1962 ; Lawrence 1960). Ove se stanice zadržavaju u limfatičkom tkivu domaćina svega nekoliko dana, a potom ih fagocitiraju i razgrade makrofagi (Congdon 1962 ; Makinodan 1957; Sherkarchi i Makinodan 1958). Time je započela imunološka reakcija protiv tuđih injiciranih stanica. Da se i u ovom slučaju radi o transplantacijskoj imunosti potvrđuje nam opažanje da kalem kože, presađen sa iste životinje-davaoca stanica, doživljava ubrzano odbacivanje, tj fenomen ponovljenog kalema. Očito je da su antigeni, koji su prisutni na prethodno injiciranim stanicama, bili zastupljeni i na naknadno ušivenom kalemu (Medawar 1958b, 1959a).

Injicira li se ponovno suspenzija istovrsnih alogenih stanica, nakon izvjesnog vremena latencije, većina stanica podlegne već u krvi primaoca (Amos i Day 1957; Loutit i Micklem 1961). Interesantno je, međutim, da intravenski put injiciranja suspenzije alogenih stanica (Billingham i Sparrow 1955; Brent 1958; Steinmuller i Weiner 1963) ili staničnih ekstrakata (Brent i sur. 1962; Medawar 1963a) nije tako efikasan u izazivanju imunosti kao drugi putovi unošenja tuđih antigena (napr intrakutani, supkutani i intraperitonealni). Štaviše, prethodno i.v. injiciranje stanica može čak i produžiti preživljavanje naknadno presađenih alokalema (Eberhardt i Vlahović 1969).

Reakcija domaćina protiv kalema nije jedini oblik transplatacijske reakcije. U određenim uvjetima reakcija može imati i suprotan smjer, tj od stanica kalema protiv domaćina, što nazivamo reakcijom kalema protiv domaćina (KpD) ili GvH reakcijom (graft-versus-host). Dakako, da u tom slučaju, reakcija može teći i dvosmjerno. Za ovaj tip reakcije odlučan je sastav samog kalema. Ako je kalem građen iz imunokompetentnih stanica (Medawar 1963b), tj iz limfatičkih stanica koje se u domaćinu mogu reproducirati i protiv njega imunološki djelovati, tada je ispunjen preduvjet za KpD reakciju. U nekim slučajevima primalac nije uopće u stanju da reagira protiv unesenih stanica, pa nastaje samo KpD reakcija, koja može imati i letalan ishod. Patološke manifestacije KpD reakcije nazivamo homologna bolest, jer nastaje unošenjem alogenih (homolognih) imunokompetentnih stanica u domaćina koji imunološki nije reaktivan, ili mu je reaktivnost bitno smanjena. Homolognu bolest susrećemo u 2 oblika, kao "sekundarnu bolest" i "bolest kržljanja". Sekundarna bolest nastaje u letalno ozračenih životinja, koje su bile injicirane alogenom koštanom srži, da bi ih se zaštitilo od hematopoetske smrti (Vos i sur. 1959; VanBekkum i sur. 1959; Jutila i Weiser 1962). Nakon oporavka hematopoeze ove stanice nesmetano reagiraju protiv, za njih nepoznatih, antigena histokompatibilnosti domaćina, što može dovesti do letalnog ishoda. (Simonsen 1962; Billingham i Brent 1959).

Uvjeti za nastanak KpD reakcije postoje i prirodno, ako se alogene imunokompetentne stanice injiciraju fetusu ili novorođenoj životinji. Takav mladi organizam, imunološki nezreo, ne može reagirati na unos tuđeg tkiva, već ga prihvaća kao vlastito (Hildemann i Haas 1962; Hašek i sur. 1958). Zbog toga se pokreće

samo reakcija unesenih alogenih **imunokompetentnih** stanica protiv antigena tkivne srodnosti fetusa ili novorođenčeta, što može izazvati teška oštećenja organizma i zaostajanje u rastu. Po tome je bolest i dobila naziv bolest kržljanja (Billingham i sur. 1960; Billingham i Silvers 1962b). Ako mladi domaćin ima jake antigene histokompatibilnosti, koje injicirane stanice nemaju, onda će se razviti klasična slika bolesti, koja će u pravilu završiti letalno (Gowland 1965; Sinkovics i Howe 1964).

Iako limfociti imaju bitnu ulogu u imunom odgovoru na alogeno tkivo, što potvrđuju brojni eksperimenti, ipak se čini da nisu i jedini faktor koji je angažiran u tim procesima. Danas se sve više pažnje poklanja ulozi makrofaga, a suradnja između limfocita i makrofaga bila bi važna u induktivnoj fazi imunog odgovora (Fishman 1961; Fishman i Adler 1963; Fishman i sur. 1963).

#### 2.1.2.2. Uloga humoralnih protutijela u transplantacijskoj reakciji

Već je u prethodnom izlaganju istaknuto da su za odbacivanje presađenog alogenog tkiva odgovorne imunokompetentne stanice (stanična protutijela). Činjenica da se imunost na <sup>solidno</sup> alogeno tkivo moglo prenijeti samo imunokompetentnim stanicama iz imuniziranog davaoca u primaoca, odvukla je pažnju od proučavanja uloge humoralnih protutijela u reakciji odbacivanja alogenog tkiva. Tako se dugo vremena mislilo da ova protutijela nemaju nikakvu značajniju ulogu, ili je njihov učinak samo sporedan. Međutim, reakcija organizma na transplantirano tkivo vrlo je kompleksna, a u sklopu te reakcije u serumu primaoca javljaju se i humoralna protutijela, pa je neophodno i o njima voditi računa.

Odbacivanje alogenog tkiva uvjetovano je razlikama u tkivnoj srodnosti između primaoca i davaoca. Posebno smo naglasili utjecaj jakih antigenih razlika, napr. onih, što potječu sa H-2 lokusa u miša. U toku transplantacijske reakcije u miša nastaju različite vrste humoralnih protutijela, koja su uglavnom usmjerena na antigene tkivne srodnosti, prisutne u kalemljenom tkivu. Ta protutijela imaju svojstva hemaglutinina ( Gorer i Mikulska 1954 ), leukoaglutinina ( Amos 1953 ), hemolizina ( Gorer i O' Gorman 1956 ) ili citotoksina ( Terasaki i sur. 1961 ). Dugo vremena se mislilo da H-2 lokus u miša predodređuje dvije vrste antigena: antigene koji imaju svojstva hemaglutinina i one koji predstavljaju antigene tkivne srodnosti ( Medawar 1959b ). Međutim, prevladalo je mišljenje da isti antigeni ( posebno ako se radi o H-2 antigenima ), koji induciraju imunost na alokalem, izazivaju i stvaranje humoralnih protutijela ( Stetson 1963. ). Ti antigeni u miša nalaze se i na eritrocitima. Za razliku od ovih rezultata iz pokusa na miševima, mnogo je nejasnija situacija u drugim životinjskih vrsta. Tako se napr. u pasa ne pokazuje nikakva ovisnost između stupnja histokompatibilnosti i pojave hemaglutinina, nakon transplantacije alogenog kalema kože ( Vlahović i sur. 1965; Vlahović i Vlahović 1969 ). U pokusima na genetički čistim sojevima štakora ne može se uvijek sa sigurnošću utvrditi da postoji povezanost između intenziteta reakcije odbacivanja i razine cirkulirajućih protutijela ( Štark i Kren 1967a,b,c ). U čovjeka je situacija još mnogo složenija, jer on posjeduje prirodne hemaglutinine u sistemu krvnih grupa. Stoga je kompatibilnost davaoca i primaoca u AEO sistemu osnovni preduvjet za uspješnu funkciju presađenog alokalema ( Russell i Monaco 1965 ).

Vrlo je teško preciznije opisati ulogu humoralnih protutijela u transplantacijskoj reakciji, jer to ovisi o nizu čini-  
laca. Protutijela iz imunog seruma mogu doprinijeti skraćanju,  
ali i produženju života presađenog alokalema, što ovisi o iz-  
voru, vrsti, i količini protutijela, specijes i soju životinje,  
kao i vrsti upotrebljenog alogenog tkiva ( Winn 1970 ). Nalaz  
citotoksičkih protutijela u serumu pobudio je interes za is-  
traživanje njihove uloge u odbacivanju alokalema. Brojni su  
pokusi vršeni u tzv. "milipore" komoricama, čije su membrane  
propusne za protutijela i druge molekule, ali nepropusne za  
stanice. Pažljivo izvedeni pokusi pokazali su da citotoksička  
protutijela i komplement prodiru u komorice, iako sa poteško-  
ćama. Kada konačno protutijela i komplement, koji su prošli u  
komoricu, dostignu određeni nivo, mnoge vrste alogenih stani-  
ca bit će uništene ( Amos i Wakefield 1958, 1959; Gabourel  
1961; Gorer i Boys 1959a; Wakefield i Amos 1958.). Sva tkiva  
ne pokazuju jednaku osjetljivost na citotoksičko djelovanje,  
iako se čini da se prije može govoriti o kvantitativnim, ne-  
goli kvalitativnim razlikama ( Algire 1959; Gorer i Boys 1959a).  
Iz ovih pokusa moglo bi se zaključiti da nije neophodno da  
domaćinove stanice dođu u kontakt sa kalemom, već su često i  
humoralni faktori dovoljni za njegovu destrukciju.

Ispitivanja efikasnosti protutijela imunog seruma, obzirom  
na njegova citotoksička svojstva, izvođena su najčešće na tu-  
morskim stanicama. Na djelovanje humoralnih protutijela poseb-  
no su osjetljive stanice tumora koje potječu od limfatičkih  
tkiva ili iz koštane srži, dok tumori koji potječu od drugih



tkiva mogu biti i potpuno rezistentni ( Winn 1962; Möller 1963a ). Mišljenje da su samo pojedinačne stanice nekog tumorskog tkiva osjetljive na djelovanje protutijela, jer se citotoksi i komplement mogu u dovoljnoj količini vezati na njihovoj površini i razoriti ih, danas je uglavnom napušteno. Naime suspenzija stanica pripremljena od solidnog tumorskog tkiva, koje je rezistentno na protutijela, neosjetljiva je na njegovo djelovanje i nakon što su stanice disocirane ( Winn 1970 ). Čini se, da osjetljivost tumora na humoralna protutijela više ovisi o koncentraciji antigena na površini stanica, a mnogo manje o tkivnom porijeklu tumora ( idem ).

Pojedinačne stanice iz normalnog limfatičkog tkiva i koštane srži, različitih životinjskih vrsta pa i čovjeka, mogu se također oštetiti in vitro, humoralnim protutijelima u prisutnost komplementa. Do razaranja takvih stanica doći će i onda, kad se njihova suspenzija prenese u prethodno pasivno imuniziranog domaćina ( Winn 1962; Möller i Möller 1962; Stetson 1963. ). Sudjelovanje celularne imunosti, u nekim od ovih pokusa, isključeno je prethodnim ozračivanjem primaoca ili drugim načinima. Ako se primaoca aktivno imunizira, injiciranjem suspenzije tuđih stanica, tada se već u toku drugog tjedna nakon injiciranja u njegovoj krvi mogu dokazati različite vrste cirkulirajućih protutijela ( Gorer i O'Gorman 1956; Stetson i Demopoulos 1958. ). Injicira li se ponovno, nakon nekog vremena, suspenzija istovrsnih stanica, tada će većina njih podleći već u krvi djelovanju cirkulirajućih protutijela ( Amos i Day 1957; Loutit i Micklem 1961. ).

Kalemljenje kožnim kalemima najjednostavniji je i najčešće upotrebljavani postupak za indukciju transplantacijske imunosti. Stoga se i uloga humoralnih protutijela, u transplantacijskoj imunosti, na normalna tkiva najčešće proučavala na alokalemima kože. Iako je većina pokusa pokazala da pasivno prenesena humoralna protutijela ne mogu značajnije utjecati na odbacivanje kožnog kalema, ipak su neki autori, u posebnim eksperimentalnim uvjetima, uspjeli dokazati njihovu djelotvornost. Imuni serumi, stvoreni injiciranjem miševa i kunića splenocitima inkorporiranim u Freundov adjuvans, mogli su znatno oštetiti kožne kaleme, u pasivno imuniziranim primaocu, (Stetson i Demopoulos 1958), Chutna (1959; Chutna i Pokorna 1961.) smatra da su humoralna protutijela vjerovatno uključena u reakciji "bijelog kalema", što je jedan oblik veoma burnog odbacivanja. Kalem se u tom slučaju ne odbacuje na uobičajeni način, već je od početka edematozan i blijede boje, vjerovatno zbog odsustva vaskularizacije (Rapaport i Converse 1958.). Najuspješniji dokaz učinka pasivnog prijenosa humoralne imunosti na alokalem, dao je Steinmuller (1962). On je senzibilizirao štakore sojeva Lewis i BN, unakrsnom izmjenom kožnih kalema. Tako dobiven serum efikasno je izazivao odbacivanje kalema, ako je bio uzet od davaoca u vrijeme najvećeg intenziteta reakcije odbacivanja (6-15 dana nakon kalemljenja). Interesantno je, da nivo citotoksičnih i hemaglutinacijskih protutijela nije bilo ni u kakvoj korelaciji sa intenzitetom oštećenja kalema. Naime, serumi, koji su uzeti u kasnijem periodu nakon odbacivanja kalema imali su

viši titar hemaglutinina i citotoksina, ali nisu imali nikakvog vidljivog utjecaja na kalem ( idem ). I u ostalim manjebrojnim pokusima prijenosa humoralne imunosti, efikasnost seruma se očitovala samo onda, ako je krv davaocu uzeta u ranom periodu primarnog odgovora na alokalem ( Stetson 1963 ). Stetson i Jensen ( 1960 ) smatraju da razlog ovim vremenskim razlikama treba tražiti u vrsti produciranih protutijela što se pojavljuju u različitim fazama nakon imunizacije životinje.

U prilog mišljenju da humoralna protutijela sudjeluju u odbacivanju alokalema govore i rezultati dobiveni u ljudi koji boluju od agamaglobulinemije. Pacijenti koji boluju od nasljedne forme ove bolesti ne mogu odgovoriti produkcijam plazma stanica i specifičnih protutijela na stimulaciju antigenom. Sposobnost za većinu reakcija odgođenog tipa dođuše je sačuvana ( Good i sur.1962 ), ali im se alokalem kože dugo ne odbacuje ( Good i sur. 1957. ). **Teško** je ne dovesti u vezu ovo zatajivanje normalnog odbacivanja alogenog tkiva sa njihovom nesposobnošću da produciraju humoralna protutijela ( Stetson 1963 ).

Međutim, kao što je već istaknuto, malen je broj eksperimentalnih podataka koji ukazuju na suštinsku ulogu humoralne imunosti u odbacivanju alokalema. I prirodno opažanje u novorođenog janjeta, u tom pogledu, bitno umanjuje značaj cirkulirajućih protutijela u reakciji odbacivanja. Janje se rađa bez cirkulirajućih gama-globulina, no i pored toga odbacuje alokalem kože u normalnim vremenskim granicama ( Silverstein i sur.1963 ).

Ne treba se stoga čuditi kategoričkim tvrdnjama nekih autora ( Russell i Monaco 1965 ), da cirkulirajuća protutijela nipošto nisu osnovni preduvjet za odbacivanje alogenog tkiva.

Imunokemijska svojstva humoralnih protutijela dobro su proučena, a potrebno im je posvetiti odgovarajuću pažnju, posebno kada se istražuju transplantacijske reakcije u perinatalnoj dobi. Humoralna protutijela pripadaju u grupu gama-globulina različitih molekularnih težina. Aktivnost protutijela sadržavaju 3 osnovna tipa imunoglobulina. Najveći dio ( 85-90 % ) humoralnih protutijela pripada IgG tipu, a to su imunoglobulini malene molekularne težine. Gama globulinima velike molekularne težine pripadaju IgM i IgA imunoglobulini ( Vlahović V. 1968). Imunoglobulini G imaju molekularnu težinu oko 150.000 a konstantu sedimentacije 6-7S ( Svedbergovih jedinica ) (Marler i sur. 1964./). Molekularna težina IgM globulina je oko 900.000, a konstanta sedimentacije iznosi 18-20 S ( Lamm i Small 1966; Miller i Metzger 1965.). Protutijela tipa IgG ne gube svoju aktivnost ako se izlože djelovanju 2-merkaptoetanolu, pa ih nazivamo i merkaptoetanol rezistentnim, za razliku od IgM protutijela koja su osjetljiva na merkaptoetanol i stoga gube specifičnu aktivnost ( Fudenberg i Kunkel 1957; Chan i Deutch 1960; Pike i Schulze 1965.).

Na osnovu iznijetih podataka može se zaključiti da je uloga humoralnih protutijela u odbacivanju alokalema još uvijek nedovoljno upoznata. Neke komponente humoralne reakcije usmjerene su protiv antigena tkivne srodnosti, dok su druge usmjerene na

irelevantne antigene. Pasivno prenesena humoralna protutijela mogu senzibilizirati domaćina na kalem građen od pojedinačnih stanica, dok je situacija mnogo kompleksnija ako se radi o kalemu solidnog tkiva, gdje su neuspjesi uglavnom pravilo. Međutim, uloga humoralnih protutijela još je mnogo složenija, jer pasivno prenesena protutijela često mogu i produžiti vrijeme preživljavanja alokalema solidnog tkiva. To je jedan imunološki paradoks koji se nastoji iskoristiti u transplantaciji tkiva, da bi se unaprijedilo preživljavanje alokalema, pa je potrebno nešto reći i o ovom aspektu djelovanja protutijela.

### 2.1.3. IMUNOLOŠKA FACILITACIJA ( ENHANCEMENT )

Unapređenje života presađenog tkiva može se postići različitim postupcima, kojima je zajednički cilj supresija imunološkog odgovora domaćina prema tuđim antigenima tkivne srodnosti, koje nosi kalem. Danas raspolažemo bogatim izborom metoda imunosupresije, kao što su zračenje, ALS ( antilimfocitni serum ), kemijska imunosupresija i drugo ( Vlahović Š. 1968 ), ali je njihova primjena ograničena. Osnovna je svrha ovakve terapije slabljenje imunološke reaktivnosti primaoca, što stvara povoljnije uvjete za dulje preživljavanje alokalema. Međutim, ovakva terapija znatno slabi opće stanje organizma, što može izazvati brojne i neželjene, a često i fatalne posljedice. Stoga svaka metoda koja bi omogućila produženje života kalema, a da istovremeno nebi štetila organizmu, značajno bi doprinijela uspjehu transplantacije. U tom su pogledu mnoge nade polagane u imunološku facilitaciju ili tzv. "enhancement" ( angloameričkih autora ).

Facilitacija je u osnovi imunološki fenomen. Dokaz za njenu imunološku prirodu dali su Kaliss i sur. (Kaliss 1956<sup>i</sup>; Kaliss i sur. 1957, 1953). Oni su uspjeli produžiti život presađenog alogenog tumora nakon što su u primaoca injicirali serum životinje, koja je prethodno odbacila istu vrstu tumora. Iz tog podatka, kao i iz daljnjih pokusa, zaključili su da je za imunološku facilitaciju neophodna prisutnost specifičnih humoralnih protutijela u organizmu primaoca. Ovaj fenomen nema samo paradoksalni aspekt, već ima i nekih drugih osobina po kojima se razlikuje od poznatih imunoloških mehanizama (Kaliss 1962). Tako napr., imunološka facilitacija lakše se postiže pri jakim razlikama u tkivnoj srodnosti između davaoca i primaoca, što je gotovo obrnuto od poznatih uvjeta za indukciju stečene imunološke tolerancije. Najveći broj radova, iz ovog područja, odnosi se na tumorska tkiva. No, ovaj izbor modela nije slučajan. Poznato je, naime, da je imunološku facilitaciju najlakše inducirati prema tumorima, dok je facilitaciju normalnih tkiva, na istom principu, vrlo teško uspostaviti.

Imunološka facilitacija može se izazvati i aktivnom i pasivnom imunizacijom primaoca, iako se pasivnim putem facilitacija osigurava lakše, sigurnije i redovitije (Russell i Monaco 1965). Ta efikasnost pasivnog puta razumljiva je već iz toga što se zna da i genetički identične životinje različito reagiraju na aktivnu imunizaciju, obzirom na vrijeme manifestacije i kvalitet reakcije (Kaliss i Bruyant 1958). Ipak se uspješnost aktivne facilitacije može povećati, ako se produži vremenski interval između prve inokulacije tumora (senzibilizacija) i test kalemljenja (Kaliss 1966). Kada je jednom tumor facilitiran i počne progresivno rasti, to stanje facilitacije odnosi se samo na njega, jer

dodatno transplantirani tumor ne samo da neće biti facilitiran, već će biti ubrzano odbačen ("second set") (Kaliss 1962). Obzirom na pomenute osobitosti, u očitovanju facilitacijske reakcije, teško je točno definirati njen mehanizam. Ipak, razumljivo je da joj osnova mora ležati u općem mehanizmu reaktivnosti bilo na tumorska, bilo na normalna tkiva.

Iz tog općeg mehanizma imunološke reaktivnosti poznato nam je da će imunizacija životinje izazvati uobičajenu reakciju koja će teći u dvije faze. U prvoj fazi očituje se snažna reakcija preosjetljivosti odgođenog tipa, koja se manifestira već 3-4 dana nakon senzibilizacije, a dostiže maksimum obično tokom prve sedmice. Nakon toga intenzitet ove reakcije naglo pada. Druga faza, koju karakterizira humoralni odgovor, dostiže maksimalni intenzitet između 2-4 tjedna nakon senzibilizacije, tj. u vrijeme kada je celularna faza već znatno oslabila (Kaliss 1966; Axelrad 1968). Ako tkivo koje želimo facilitirati (napr. istovrsni tumor) transplantiramo u prvoj fazi nakon senzibilizacije, doći će do ubrzanog odbacivanja (second set). Međutim, ako ga transplantiramo nakon nekog vremena, kada je celularna faza već oslabila, a humoralna započela i ojačala, onda će se obično očitovati facilitacija (Kaliss i Bruyant 1958).

Za objašnjenje mehanizma ovog fenomena predloženo je više teorija. Ipak, nijednom od njih nije se moglo objasniti sve eksperimentalne nalaze, što je dokaz složenosti mehanizama kojima se facilitacija ostvaruje. Najčešće se spominju teorije periferne i centralne inhibicije. Periferna inhibicija može biti aferentna ili eferentna, već prema tome, dali blokira aferentni ili eferentni dio imunološkog "refleksnog" luka, a djeluje na razini kalema. (Billingham i sur. 1956; Snell 1956b). Billingham i sur.

(1956a) dali su najprihvatljivije objašnjenje i definiciju spomenutih puteva inhibicije. Pod aferentnom inhibicijom misle na direktnu inaktivaciju antigena prisutnim protutijelima ili spriječavanje antigena da dođe do centara imunog odgovora. Karakteristika centralne inhibicije je djelovanje na imunokompetentne stanice, a očituje se bilo u promjeni imunološkog aparata, ili u promjeni svojstava imunog odgovora. Ako protutijela ne mogu izvršiti svoj učinak, jer je facilitirano tkivo prekriveno ili "ozidano" (walling off, angloam. autora) protutijelima, tada govorimo o eferentnoj inhibiciji. Može se općenito reći, da postoji mnogo dokaza u prilog, kao i protiv, periferne inhibicije, što obično ovisi o specifičnosti pokusnog modela (Kaliss 1958, 1969). U prilog eferentne inhibicije, koja ima više podrške, govori nalaz Möller-a (1963b) da tumor izložen in vitro djelovanju specifičnog protuseruma, pa zatim presađen na senzibiliziranog domaćina, doživljava facilitaciju, dok istovremeno presađeni netretirani tumor podliježe normalnoj reakciji odbacivanja. Može se pretpostaviti da su specifična protutijela prekrila staničnu površinu i "ozidala" antigene, pa bi tako stanice tumora bile zaštićene od domaćinove reakcije odbacivanja, što predstavlja eferentnu inhibiciju. Nadalje, poznato je da limfociti, uzeti iz životinje koja nosi tumor, mogu inhibirati rast tumorskih stanica iste životinje, kada ih se in vitro zajednički uzgaja. (Hellström i sur. 1968; Hellström i Hellström 1969). Međutim, ovaj učinak limfocita može se blokirati, ako u medij dodamo serum životinje koja nosi tumor. Time je imuno oštećenje tumorskih stanica spriječeno ili znatno oslabljeno, što također govori u prilog eferentnoj inhibiciji (Hellström i sur. 1969a). Podršku centralnoj inhibiciji, tj. djelovanju na razini imuno-



kompetentnih stanica domaćina, posebno daju radovi Takasugi i Hildemann-a (1969 a i b). Oni su utvrdili, između ostalog, da specifični protuserum injiciran u životinje 6 dana nakon presađivanja alogenog tumora, dovodi do pada broja limfocita, ali i facilitacije tumora. Periferni limfociti uzeti iz senzibiliziranog miša inhibiraju rast tumora, ako se pomiješaju sa tumorskim stanicama prije injiciranja u primaoca. Međutim, periferni limfociti iz senzibiliziranih miševa, koji su tretirani protuserumom, ne pokazuju takav učinak. Takasugi i Hildemann (idem) su posebnu pažnju poklonili određivanju uloge pojedinih frakcija imunoglobulina u procesu facilitacije, te su utvrdili da je facilitacijska aktivnost vezana uz imunoglobuline G, tj. imunoglobuline malene molekularne težine (7S tipa).

Držeći se ovih saznanja o imunološkoj facilitaciji trebalo bi očekivati da će ona važiti i za normalna tkiva. Pa ipak, kao što je rečeno, facilitaciju normalnih tkiva je mnogo teže izazvati, negoli facilitaciju tumorskih tkiva (Brent i Medawar 1962). Za objašnjenje te razlike mogu poslužiti i opće biološke osobitosti rasta tumora u usporedbi sa osobitostima rasta normalnih tkiva. Vjerojatno je to i razlog što presađeni tumor može progresivno rasti i onda kada je pasivnim protutijelima blokiran imunološki odgovor domaćina samo prema nekim, njemu nepoznatim antigenima tumorskog tkiva. Naprotiv normalno tkivo biti će odbačeno čak i onda kada kalem ima samo jednu antigenu specifičnost, koja je domaćinu nepoznata (Winn 1970). Produženje života kožnog kalema može se postići injiciranjem primaoca serumom koji sadrži protutijela specifična za antigene kalema. Međutim, iako su razlike statistički vjerodostojne, ipak se ovim postupkom život kalema produžuje samo za nekoliko dana (Billingham

i sur. 1956b). Halasz i Orloff (1965) također su dobili slične rezultate produženja života kožnog kalema injiciranjem specifičnog protuseruma. Perfundirali su ušku kunića specifičnim antidonor-serumom i na nju su zatim presadili alokalem kože. Produženje života kalema pripisali su eferentnoj inhibiciji mehanizma imunološkog odgovora. Pasivno prenesena protutijela mogu produžiti i život bubrežnog alokalema, ne samo tako da ga direktno zaštite, već mogu i domaćinov aktivni odgovor (tzv. aktivni enhancement) usmjeriti u produkciju dodatnih količina facilitacijskih protutijela (French i Batchelor 1969).

Izneseni podaci o mogućem djelovanju humoralnih protutijela kako u procesu odbacivanja, tako i u facilitaciji presađenih tkiva, imaju posebno značenje obzirom na pokuse koji se opisuju u ovoj radnji. Naime, neke vrste humoralnih protutijela, koja cirkuliraju u organizmu majke, mogu prijeći u organizam fetusa, odnosno novorođenčeta. Ova prenesena protutijela, ne samo da osiguravaju zaštitu novorođenčeta u ranom razdoblju života, već mogu i utjecati, pa čak i preinačiti njegov aktivni odgovor na antigene stimuluse. Stoga je neophodno iznijeti neke osnovne karakteristike imunoloških odnosa u perinatalnom razdoblju sisavaca, što je tema slijedećeg dijela radnje.

## 2.2. IMUNOLOŠKE KARAKTERISTIKE PERINATALNE DOBI

### 2.2.1. FETUS KAO ALOKALEM

Fetus je s obzirom na majku djelomično građen iz genetički stranog tkiva (očeva komponenta naslijeđa). Budući da je organizam majke imunološki potpuno zreo i sposoban da odbaci genetički strano tkivo, to je logično pretpostaviti da fetus može doživjeti sudbinu alokalema. Jedno vrijeme se mislilo da bi sam akt poroda mogao biti istovjetan sa odbacivanjem alokalema, ali je ta ideja odbačena čim se uzgojilo genetički čiste sojeve, što znači da se unutar čistog soja mladunčad normalno rađa. Ipak se mnogi aspekti trudnoće i porođaja tumače s imunološkog stajališta.

Iako organizam majke može izraziti punu imunološku reaktivnost prema većini tuđih antigena, ipak je on prema vlastitom fetusu imunološki "inertan". Inercija u tom slučaju znači oslabljeno djelovanje sustava koji održava imunološku homeostazu majčinog organizma, što ukazuje da je došlo do izvjesne adaptacije ili preinake u njegovoj funkciji (Anderson 1965). Presađivanje kalema tuđeg tkiva neprirodan je događaj za organizam. Kalemljenje alogenim tkivom se prirodno događa jedino u trudnoći, jer fetus i tumore trofoblasta možemo smatrati prirodnim alokalemima, obzirom na to da oba sadrže i antigene očevog porijekla. Normalno vrijeme odbacivanja alokalema, u gotovo svih sisavaca, mnogo je kraće od vremena trudnoće, pa ako fetus i smatramo alokalemom onda je on vrlo dobro toleriran (Eichwald 1963). Mehanizam ove tolerancije nije dovoljno objašnjen. Mnoge teorije o tom mehanizmu samo ukazuju na moguće pristupe ovom problemu.

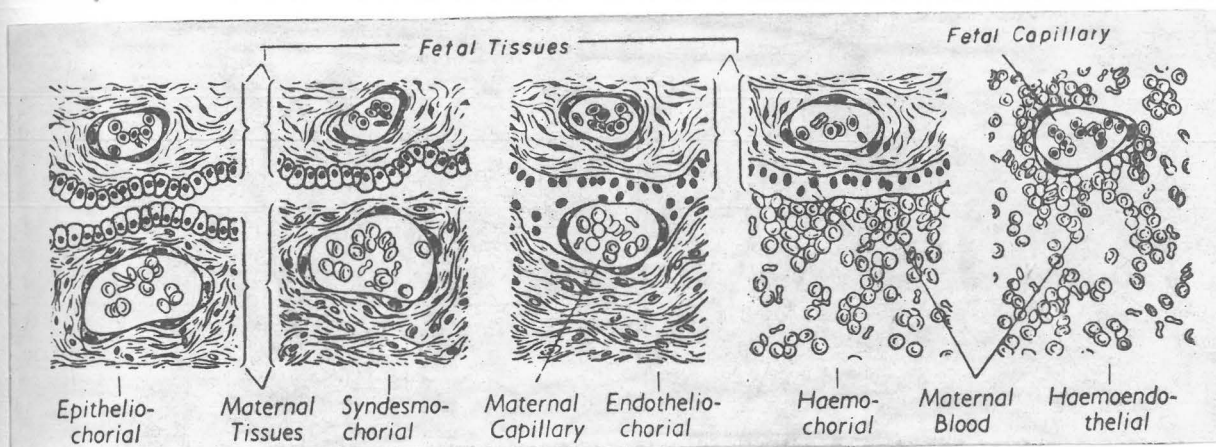
Čini se da je najprihvatljivije razmišljati o interakciji brojnih faktora koji se međusobno dopunjuju, što ćemo razmotriti u daljnjem tekstu.

Već je u Općem dijelu naglašeno (vidi 2.1.2.1.), da kalemi koji se presađuju u tzv. "povlaštena" mjesta kao napr. u vrećice na obrazima hrčka, mozak i prednju očnu komoru, imaju izgleda da duže prežive. To se objašnjava bilo specifičnom građom tih mjesta ili odsustvom limfne i krvne drenaže, pa transplantacijski antigeni ne mogu senzibilizirati domaćina (Russell i Monaco 1965). Često se naglašava da i uterus, u tom smislu, predstavlja povlašteno mjesto. No, iako uterus dopušta implantaciju oplođene blastociste i omogućuje razvoj i rast zametka, ipak on nije neophodan za normalan tok trudnoće. Dobro je poznato da uznapredovala abdominalna trudnoća može završiti rođenjem donešenog djeteta carskim rezom (Bright i Maser 1961). Ovaj podatak ipak ne isključuje zaštitnu ulogu uterusa, što proističe iz slijedećeg eksperimenta. Presadi li se alogena blastocista ekstrauterino, specifično imuniziranoj ženki, blastocista će prestati rasti, dok se blastociste presađene u uterus implantiraju i normalno dalje razvijaju (Kirby i sur. 1966). Autori objašnjavaju ove rezultate kao posljedicu okruživanja kalema decidualnim tkivom u uterusu, što ga zaštićuje od stečene imunosti, za razliku od blastociste smještene ekstrauterino.

Činjenica da se neposredni kontakt između majke i fetusa ostvaruje preko placente, podstakla je mnoge istraživače da detaljnije upoznaju građu i funkciju placente u različitim životinjskih vrsta. Utoliko je od interesa klasifikacija placenta u različitim vrsta sisavaca, na temelju tkivnih slojeva što su umetnuti (slika 1).

Slika 1.

HISTOLOŠKI TIPOVI PLACENTÂ POREDANI PREMA BROJU SLOJEVA  
ŠTO SU UMETNUTI IZMEĐU MAJČINE I FETALNE CIRKULACIJE



Prema: Amoroso (1952)

Tablica I prikazuje nešto modificiranu klasifikaciju placenta s obzirom na njihova funkcionalno imunološka svojstva (prema Šterzl-u i Silverstein-u 1967), na temelju prikazane šeme (slika 1). Vidi se da se broj slojeva tkiva, u placentama različitih sisavaca, kreće od 6 do 3. Epiteliohorijalna placenta je u tom pogledu najbogatija i sadrži sve majčine i fetalne slojeve (majčin endotel, vezivo i epitel, te fetalne slojeve: trofoblast, vezivo i endotel). Hemohorijalna placenta sadrži samo 3 fetalna sloja.

Na Tablici I. je prikazan i prijenos majčinih protutijela, o čemu će biti posebno govora u kasnijem tekstu. Za sada je dovoljno naglasiti, da se prijenos majčinih protutijela može dovesti u vezu sa građom placente. Međutim, pojedini slojevi placente vjerojatno imaju i drugačiji funkcionalno imunološki značaj. Moguće je da neki od njih mogu zaštititi fetus od majčine imunološke aktivnosti, usmjerene na očevu antigenu komponentu. U tom pogledu najveći broj podataka potječe iz pokusa na gene-

tički čistim sojevima životinja koje mahom spadaju među glodavce. Iz analize strukture njihove placente (Tablica I) vidi se da tim placentama nedostaju "majčini" slojevi, dok su 3 fetalna sloja, u svima njima, zastupljena. Rezultati pokusa u tih životinja posebno su istakli značenje stanica trofoblasta, koji je fetalnog porijekla, a dolazi u direktni kontakt sa majčinim tkivom. Kalem fetalnog tkiva  $F_1$  hibrida na životinjama majčinog soja, koje su prethodno senzibilizirane antigenima očevog soja, bivaju redovito razoreni. Isto se dešava i sa kalemima placentarnog tkiva. Važnu iznimku, u tom pogledu, čini baš tkivo trofoblasta, koje ne samo da nije razoreno, već mu je i rast unaprijeđen do te mjere da govorimo o proliferaciji. (Simmons i Russell 1962, 1963). Ti su pokusi znatno učvrstili pretpostavku da bi stanice trofoblasta mogle djelovati kao imunološki inertna barijera između tkiva majke i fetusa. Mišljenja da je sincicijski trofoblast, koji je u vezi sa majčinom krvlju samo majčinog porijekla (Gordon 1960) ili da su te stanice haploidne, tj. da sadrže kromatin samo majčinog porijekla (Galton 1960), danas su odbačena. Gotovo je sigurno, da imunološku otpornost trofoblasta treba pripisati fibrinskom sloju koji ga s površine oblaže u mnogih životinjskih vrsta (Kirby i sur. 1964). U čovjeka je taj sloj poznat kao Nitabuchov sloj (Bardawil i Toy 1959; Curzen 1970). Dosljedno takvom zaključku treba istaći da ni antigeni, prisutni na stanicama trofoblasta, ne mogu senzibilizirati majčin organizam, jer su maskirani fibrinskim slojem. Elegantnim pokusima u miša Currie (1968) je dokazao da trofoblast ipak može senzibilizirati primaoca ukoliko je prethodno bio tretiran neuraminidazom. Budući da se radi o enzimu koji specifično razara mukopolisaharide ("cementnu" masu fibrinskog

sloja ), može se zaključiti da su tim postupkom antigeni trofoblasta bili "razgolićeni" što je omogućilo senzibilizaciju domaćina. Zanimljivo je, s tim u vezi, istaći da debljina sloja stanica trofoblasta, kao i debljina fibrinoidnog materijala na njima, ovisi o antigenim razlikama između majke i fetusa, tj. slojevi su to deblji što su veće antigene razlike između trofoblasta i domaćina (Billington 1965; Kirby 1968). Ovaj fibrinoidni materijal histokemijski je vrlo sličan međustaničnom sloju koji oblaže stjenke stanica u vrećicama na obrazu hrčka, a poznato je da je to izrazito povlašteno mjesto za transplantaciju genetički stranog tkiva, jer se domaćina ne senzibilizira (Billingham i Silvers 1962a).

Vjerojatno je da i promijenjena imunološka reaktivnost majke igra važnu ulogu u zaštiti fetusa i spriječavanju reakcije njegova odbacivanja. Naime, gravidna ženka može adekvatno imunološki reagirati na većinu tuđih antigena, ali je reaktivnost na alogena tkiva nedostatna, o čemu postoje brojni podaci. Tako napr., alokalemi kože presađeni gravidnim ženama preživljavaju znatno duže od kalema na negravidnim ženama (Andresen i Monroe 1962). U pokusima na miševima Breyere i Barrett (1960 a i b) su pokazali da ponovljene heterospecifične trudnoće slabije reaktivnost majke na alokalem kože očevog soja. Štaviše, ženka može duže nositi i kalem mužjaka sa kojim je bila više puta samo parena, bez naknadne trudnoće (Hašek i sur. 1962). U štakora i pasa majka i njeni mladi pokazuju toleranciju na uzajamno izmijenjene kaleme neposredno poslije okota (Anderson 1965). Ovako oslabljena reakcija gravidne ženke, na alokaleme, vjerojatno je posljedica djelovanja glukokortikoida koji se tokom trudnoće pojačano izlučuju u većine životinjskih vrsta

i čovjeka (Medawar 1953). Glukokortikoidi imaju snažno depresivno djelovanje na limfatičko tkivo i koncentraciju cirkulirajućih limfocita u perifernoj krvi (Manick i Egdahl 1968). Sama placenta također može biti izvor mnogih imunodepresivnih hormona. U mnogih životinjskih vrsta placenta secernira i ACTH i kortikosteroide (Heslop i sur. 1954). Ti hormoni djelujući u neposrednoj blizini fizikalne barijere koja razdvaja majku i fetus imaju daleko snažniji depresivni učinak na imunost usmjerenu protiv fetusa, nego što se to može ocijeniti testirajući sposobnost odbacivanja alokalema smještenih negdje periferno na organizmu majke (Kirby 1968). Za humanu placentu ne zna se sigurno da li producira kortikosteroide. No, s obzirom na to da producira čitav niz hormona, kao što su progesteron, horionski gonadotropin, placentarni laktogen i sudjeluje u metabolizmu drugih (Grausz 1969) nije isključeno da je i ona izvor nekih hormona koji imaju imunodepresivno djelovanje. Na kraju se može zaključiti da je fetus sisavaca zaštićen na razne načine od majčine reakcije odbacivanja. Ali i fetus, obzirom na svoju opću nezrelost ima posebne imunološke osobine o kojima se raspravlja u narednom poglavlju.

### 2.2.2. STEČENA IMUNOLOŠKA TOLERANCIJA

Imunološki aparat fetusa se za vrijeme trudnoće nalazi u razvoju, pa u većine životinjskih vrsta, tek neko vrijeme nakon poroda, stječe sposobnost normalne reaktivnosti. No, u tom razvoju do normalne reaktivnosti prolazi kroz razdoblje kad na strani antigen ne može reagirati imunošću, već ga prihvaća kao vlastiti, tj. postaje na njega tolerantan. To je i smisao Me-



dawarove (1962) definicije tolerancije koja glasi ovako: "Ako se neka životinja izloži antigenu, prije nego što je razvila sposobnost da reagira protiv njega, onda je razvoj te reaktivnosti odgođen, a u stalnoj prisutnosti antigena može biti neograničeno produžen".

Uobičajeni postupak za izazivanje tolerancije u sisavaca, ptica i amfibija, sastoji se u injiciranju alogenih stanica u njihovu mladunčad u perinatalnoj dobi (Billingham 1961a; Hildemann i Haas 1962; Hašek i sur. 1958). Toleranciju je moguće izazvati u toj životnoj dobi, jer sposobnost mladog organizma da imunološki reagira još nije funkcionalno sazrela, pa se tuđe injicirane stanice prihvaćaju kao vlastite. Još i prije nego što su utvrđene bitne razlike između odrasle životinje i fetusa, odnosno novorođenčeta, u imunološkoj reaktivnosti na strane stanice, bilo je mišljenja koja su na njih ukazivala. Owen (1945) je opisao da su vaskularne anastomoze između blizanaca goveda uzrok bitnim promjenama imunološkog odnosa među njima. Te su životinje tolerantne na hematopoetsko tkivo, a mogu biti tolerantne i na svako drugo presađeno tkivo drugog blizanca (Stone i sur. 1965). Ovaj nalaz se objašnjava time što su heterozigotni blizanci goveda sinhorijski i često su eritrocitne kimere, tj. svaki od blizanaca može imati u svojoj krvi mješavinu vlastitih eritrocita i eritrocita koji pripadaju drugom blizancu. Eritrocitni kimerizam utvrđen je i u heterozigotnih blizanaca čovjeka, a Woodruff i Lennox (1959) su jednom takvom paru izmijenili kožne kaleme i dokazali uzajamnu toleranciju.

Šire značenje Owenovog otkrića shvatili su Burnett i Fenner (1949) koji su, uzevši u obzir ove rezultate, postavili opću teoriju imunološkog prepoznavanja. Oni smatraju da organizam u

embrionalno doba prepoznaje sve antigene kojima je okružen kao vlastite, pa gubi sposobnost da u kasnijem životu na njih reagira. U normalnim prilikama ti antigeni su dijelovi njegovih vlastitih tkiva. Međutim, izlaganje organizma, u tom periodu, većoj količini stranog antigena dovelo bi do tolerancije na te antigene, jer mlada životinja <sup>nije</sup> još, u toj ranoj fazi svog razvoja, sposobna da razlikuje tuđe od vlastitog. Tuđi antigeni vjerojatno uništavaju specifični klonus stanica, predodređen da u kasnijem životu na njih producira protutijela, pa životinja tuđi antigen prihvaća kao vlastiti. Kako imunokompetentne stanice postepeno sazrijevaju, tako im se razvija i sposobnost da prepoznaju tuđe antigene, tj. sve na koje za to vrijeme svoje nezrele faze nisu postale tolerantne.

Na temelju ovih spoznaja Billingham i sur. (1953) izazvali su toleranciju injiciranjem fetusa miševa jednog soja, sa stanicama slezene, bubrega i testisa miševa drugog soja. Istovremeno je i Hašek (1953) dobio slične rezultate na pilićjim embrionima, spajajući embrione parabiotskom vezom. Naknadno testiranje kožnim kalemima davalaca stanica, u odrasloj dobi, pokazalo je da se u oba slučaja doista radi o toleranciji. Fenomen tolerancije dobro je proučen, pa su danas poznate mnoge njegove osobine. Sigurno je dokazano da je tolerancija posljedica centralnog zatajivanja mehanizma imunskog odgovora, tj. zatajivanja reaktivnosti prema specifičnom antigenu na razini imunokompetentne stanice (Smith 1961; Hašek i sur. 1961). Stanje tolerancije može se i ukinuti prijenosom normalnih limfatičkih stanica iz genetički kompatibilnog davaoca (Smith 1961; Hašek i sur. 1961; Dietrich i Weigle 1964; Gowans i sur. 1962). To je ujedno i najjasniji dokaz da tolerancija predstavlja centralno zatajivanje imunološk-

kog odgovora, a da za to nije odgovorna promjena unutarnje sredine. Ta tvrdnja odnosi se na različite vrste imunoloških reakcija, uključujući tu preosjetljivost odgođenog tipa i produkciju protutijela (Gowans i sur. 1962).

Tolerancija je specifična za injicirane antigene, a tolerantni domaćin može i dalje normalno reagirati na druge antigene (Gowland 1965). Tolerancija nije fenomen "sve ili ništa", jer se može pojaviti u svim stupnjevima od vrlo slabe do potpune (Woodruff 1960). U potpuno tolerantne životinje alokalem se ponaša kao autokalem, a tako se ponašaju i svi naknadni kalemi od istog davaoca.

Najbolji izvor antigena za indukciju imunološke tolerancije su žive stanice, tj. stanice koje se mogu reproducirati. To su stanice limfnih čvorova, splenociti, mali limfociti, stanice koštane srži i donekle timociti (Billingham i Silvers 1962b; Billingham i sur. 1962b; Hašek i sur. 1958; Billingham 1961a). Toleranciju lakše izazivaju žive stanice jer su one sposobne da se reproduciraju u domaćinu, pa njihovi potomci održavaju tolerantno stanje. Budući da su među tim stanicama prisutne i imunokompetentne stanice mnoge životinje mogu uginuti od bolesti kržljanja, što ponekad znatno smanjuje postotak tolerantnih (Hildemann i Haas 1962). O mehanizmu bolesti kržljanja, što u suštini predstavlja reakciju kalema protiv domaćina (KpD) govorili smo ranije.

Tolerancija se može izazvati i davanjem pročišćenih antigena, kao i stanica koje se ne mogu reproducirati, kao što su napr. bjelančevine, bakterijski antigeni, eritrociti itd. (Smith 1961). Tolerancija na ove antigene je prolazna, ali joj se trajanje može produžiti ponovljenim davanjem antigena. Tolerantno stanje

prestaje u roku od par dana do 3 tjedna nakon iščezavanja zadnje količine antigena iz domaćina (Mitchison 1959).

Za indukciju stanja tolerancije važni su i genetički odnosi tj. razlike u antigenima tkivne srodnosti između davaoca stanica i imunološki nezrelog primaoca. Što su te razlike veće to će biti teže inducirati toleranciju, dok je u slučaju slabijih razlika u tkivnoj srodnosti (napr. H-1 i H-3 lokus u miša) toleranciju lako izazvati, čak i u odraslijoj dobi (McKhann 1964). Broj injiciranih stanica, neophodan za izazivanje tolerancije, također ovisi o genetičkim razlikama između davaoca i primaoca. Što su genetičke razlike manje to je potreban i manji broj stanica da se inducira tolerancija (Gowland 1965). U nekih životinjskih vrsta toleranciju možemo izazvati samo prenatalno, kao napr. u kunića (Porter 1960), dok se u miša i štakora može izazvati i postnatalno (Hašek i sur. 1961). Pri tome je i opet važan broj injiciranih stanica, jer nije svejedno da li se injicira određena doza stanica na cijelu životinju, ili se uzima doza prema tjelesnoj težini - tzv. WAD (weight adjusted dose). Veća je vjerojatnost da će se primjenom WAD-a izazvati tolerancija, a WAD produžava i vremenski period kroz koji inokulum može dovesti do tolerancije: u štakora i miša do šestog postnatalnog dana - ako su u pitanju jače antigene razlike (Gowland 1965; Billingham i sur. 1960, 1962b). Nakon tog vremena, a u mnogih životinjskih vrsta već i ranije, ne može se izazvati toleranciju jer uporedo sa postepenim sazrijevanjem organizma sazrijeva i njegov imunološki sustav.

### 2.2.3. SAZRIJEVANJE IMUNOLOŠKOG ODGOVORA

Imunološka reaktivnost fetusa i novorođenčeta u usporedbi sa reaktivnošću odrasle životinje, znatno je slabija. Normalna reaktivnost uspostavlja se, ovisno o specijes, tek neko vrijeme nakon rođenja. Ipak to nije opće pravilo, jer čak i fetusi mnogih životinjskih vrsta pokazuju neke oblike imunoloških reakcija. Kad se pak govori o cjelokupnoj imunološkoj reaktivnosti onda mladi organizam, u tom smislu, možemo smatrati nezrelim. Budući da je limfatički aparat podloga za očitovanje svih oblika imunološke reaktivnosti, logično je pretpostaviti da ta reaktivnost sazrijeva paralelno sa razvojem limfatičkog tkiva. Mnogi autori misle da je mladi organizam imunološki nezreo jer mu nedostaju imunokompetentne stanice (Hašek i sur. 1961; Šterzl i Silverstein 1967). I doista, sposobnost imunoloških stanica novorođenčeta da produciraju protutijela manja je za oko 100 do 600 puta od sposobnosti tih stanica<sup>u</sup> odrasle životinje (Trnka i Šterzl 1960; Makinodan i Peterson 1964).

Nedostatnost produkcije protutijela u organizmu novorođenčeta može se objasniti i općom nezrelošću organizma, a posebno tkivnog metabolizma (Dixon i Weigle 1957). U prilog ovog mišljenja navodi se da stanice limfnih čvorova odrasle životinje koje su sposobne da primarno ili sekundarno imunološki reagiraju nakon prijenosa u odraslu životinju ozračenu X-zrakama, ne odgovaraju takvom reakcijom ako se prenesu u novorođene alogene primaoce. O značenju nezrelosti organizma domaćina govori i nalaz da limfatičke stanice novorođenog kunića mogu producirati protutijela ako su in vitro bile izložene antigenu i zatim prenijete u odrasle kuniće ozračene X-zrakama (Dixon i Weigle

1959). I naši rezultati ispitivanja metaboličke reaktivnosti novorođenog na injekciju kortizola, također ukazuju na važnost zrelosti organizma, što se može smatrati općom pojavom u ovoj životnoj dobi (Rukavina i Eberhardt 1966; Avdalović i sur.1970).

Posebno treba razmotriti sazrijevanje imunološke reaktivnosti u vezi sa razvojem limfatičkog tkiva. Iako su u mnogih životinjskih vrsta neke temeljne karakteristike limfatičkog tkiva definitivno određene već prije rođenja, ipak se ne može govoriti o potpunoj funkcionalnoj zrelosti. U većine životinjskih vrsta timus je prvi organ koji sadrži limfatičko tkivo već u ranoj fazi embrionalnog razvoja. U pilićjeg embriona uporedo sa timusom sazrijeva još jedan limfatički organ i to Fabricijeva burza (Papermaster i Good 1962). Timus ima značajan utjecaj i na ostalo limfatičko tkivo, jer se timektomijom novookoćenih kunića spriječava razvoj ostalih limfatičkih struktura (Archer i sur. 1963a i b). U novookoćenih kunića, stimuliranih stranim antigenom, pojavljuju se plazma stanice tek pri koncu drugog tjedna života (Bridges i sur. 1959), a reaktivnost odrasle životinje postiže se tek sa 4 tjedna starosti. Na sličan način se razvija i limfatički, odnosno imunološki aparat u miša i štakora (Good i Papermaster 1964). Ovisnost imunološke kompetencije o timusu pokazuje se naročito u transplantacijskoj imunosti. Timektomija u fetalnom ili ranom novorođenačkom razdoblju u mnogih životinjskih vrsta (štakor, miš, hrčak), bitno slabi sposobnost organizma da u kasnijem životu odbaci alokaleme normalnom transplantacijskom reakcijom. Štaviše, takve su životinje često tolerantne i na ksenokaleme (Good 1966; Miller 1961; Janković i sur. 1962).

Imunološka reaktivnost slabo je razvijena i u ljudskog novorođenčeta. Karakteristično je, međutim, da je reaktivnost u nedonoščeta jednaka kao i u donešena djeteta, što možda ukazuje na važnost faktora "okoline" (Good i Papermaster 1964). U toku prvih nekoliko tjedana života novorođenče pomalo razvija sposobnost da reagira imunološki i tako postupno dostiže razinu imunološke reaktivnosti odrasla čovjeka (Osborn i sur. 1952 a i b). Prva protutijela stvorena u ljudske novorođenčadi su makroglobulinskog tipa (19S) (Smith 1960). I u novorođenih životinja ova protutijela prethode produkciji 7S protutijela (Stavitsky 1961; Riha 1962; Bellanti i sur. 1963).

I reakcije preosjetljivosti odgođenog tipa, u većine životinjskih vrsta, također postepeno postižu jačinu koju imaju u odrasle životinje. To se odnosi i na reakciju odbacivanja alokalema (Good i Papermaster 1964). Tako novookočeni štakori mogu alokalem čak i trajno prihvatiti (Medawar i Woodruff 1958).

Međutim, to nipošto nije opće pravilo, jer ima i suprotnih primjera, iz kojih se vidi da mladunčad nekih životinjskih vrsta može neposredno po okotu, pa čak i u fetalno doba, pokazivati normalnu reakciju odbacivanja alokalema. Fetus kunića napr. u zadnjoj fazi trudnoće već može odbaciti alokalem (Egdahl 1957). To se slaže i s tvrdnjom Porter-a (1960), da je u ovom razdoblju fetalnog života, u kunića, teško izazvati imunološku toleranciju. Ipak bilo bi pogrešno smatrati da je imunološka reaktivnost u ranoj postnatalnoj dobi kunića na razini odrasle životinje, jer je slabiji antigeni gotovo i ne mogu pobuditi (Ivanyi i Ivanyi 1961). I fetusi ovce (Silverstein i Prendergast 1964) i majmuna (Silverstein i Kraner 1965), reagiraju na alokalem već u ranijim fazama trudnoće. Fetus majmuna može čak

reagirati transplantacijskom imunošću prema antigenima majke (Šterzl i Silverstein 1967). Vjerojatno da u ljudi fetus ne odstupi bitno u reaktivnosti od pomenutih životinjskih vrsta, jer ljudsko novorođenče pa čak i nedonošće, vrlo snažno odbacuje alokalem (Fowler i sur. 1960).

Ova opažanja izgleda da se ne odnose samo na imunosnu reakciju prema alokalemu, jer uporedo sa razvojem reaktivnosti odgođenog tipa fetusa i novorođenčeta pojavljuju se i humoralna protutijela. Tako ni reaktivnost na antigene tkivne srodnosti ne zauzima nikakvo posebno mjesto u općem razvoju imunološke kompetencije u toj dobi, već je ta reaktivnost analogna reaktivnosti na različite druge antigene (Šterzl i Silverstein 1967).

#### 2.2.4. UTJECAJ IMUNOSTI MAJKE NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI

Premda se u fetalnom razvoju vrlo rano počinju sintetizirati serumski proteini, koje producira jetra (Miller i Bale 1954), ipak u ovoj životnoj dobi nema produkcije imunoglobulina, barem ne u mjerljivim količinama (Good i Papermaster 1964). Kako imunoglobulini imaju važnu ulogu u zaštiti organizma od štetnih djelovanja vanjske sredine, to bi njihova odsutnost mogla imati fatalne posljedice za organizam novorođenčeta. Novorođenče ipak nije "imunološki bogalj", jer u gotovo svih vrsta sisavaca majka osigurava mladom pasivnu zaštitu, prenoseći svoje imunoglobuline. Ovaj se prijenos odvija u fetalnoj ili u ranoj novorođenačkoj dobi, što ovisi o životinjskoj vrsti, a ponekad i kroz čitavo perinatalno razdoblje (Brambell 1966).



Za prijenos protutijela iz majke u fetus važna je građa placente, ali se prijenosu, u nekih životinjskih vrsta, može vršiti i mimo placente, kroz endoderm žumanjčane vreće, amni-  
onsku tekućinu i fetalno crijevo (Brambell 1966). Na Tablici I prikazan je prijenos protutijela u ovisnosti o broju slojeva koje posjeduje placenta. Kada su prisutna sva majčina i fetalna tkiva, onda se placenta sastoji od ukupno 6 slojeva. Neki slojevi placente mogu i nedostajati, pa se prema broju slojeva placente mogu i klasificirati. Epliteliohorijalna placenta ima sve majčine i fetalne slojeve, pa preko ove barijere ne mogu prodrijeti majčini gama globulini u fetalni krvotok. U tom slučaju ni aktivna ili pasivna imunizacija majke ne omogućuje prijenos stvorenih protutijela (Šterzl i sur. 1960b). Iako sindes-  
mohorijalna placenta ima jedan sloj manje (nedostaje majčin e-  
pita<sup>l</sup>), ipak i ona spriječava prolaz imunoglobulina. U životinja koje posjeduju ove dvije vrste placenta posebno je važan postnatalni prijenos gamaglobulina i protutijela preko kolostruma, u kojem su bogato zastupljena. Vrijeme apsorpcije imunoglobulina preko crijevne sluznice je relativno kratko (36-48 sati), a na njegovu dužinu posebno utječe vrsta hrane (Lecce i Morgan 1962; Lecce 1964). Endoteliohorijalna placenta sadrži samo majčin endotel i fetalne slojeve, što već omogućuje prenatalni prijenos imunoglobulina. U životinja s tim tipom placente prijenos se nastavlja i postnatalno, kroz desetak dana (Šterzl i Silverstein 1967). Hemohorijalna placenta je najjednostavnije građena, jer barijeru za prijenos protutijela čine samo fetalni slojevi. Stoga hemohorijalna placenta omogućuje obilan prenatalni prijenos gamaglobulina i protutijela. Međutim, postnatalni prijenos nalazimo samo u štakora i miša (idem). Brambell i sur. su razjasnili načine i mehanizam prijenosa majčinih pro-

T A B L I C A I

KLASIFIKACIJA PLACENTÂ PREMA SLOJEVIMA TKIVA I KORELACIJA SA VREMENOM PRIJENOSA  
IMUNOSTI IZ MAJKE U MLADE

VRSTE PLACENTE	ŽIVOTINJA	UTERINA TKIVA			FETALNA TKIVA			VRIJEME PRIJENOSA PROTUTIJELA	
		Endotel	Vezivo	Epitel	Trofo- blast	Vezivo	Endo- tel	Prenatalno	Postnatalno
EPITELIOHORIJAL- NA	konj, svinja	+	+	+	+	+	+	0	+++ (36 sati)
SINDESMOHORIJAL- NA	ovca, koza, krava, govedo	+	+	0	+	++	+	0	+++ (36 sati)
ENDOTELIOHORI- JALNA	mačka, pas	+	0	0	+	++	+	+	+ ( 10 dana )
HEMOHORIJALNA	štakor, miš	0	0	0	+	+	+	+	++ ( 16-20 dana)
	kunić, zamor- če	0	0	0	+	+	+	+++	0
	čovjek, maj- mun	0	0	0	+	+	+	+++	0

Simboli označavaju: 0 = odsutnost; + = prisustvo; ++ = značajan prijenos; +++ = isključivi prijenos

Modificirano prema: Šterzl i Silverstein, Adv. in Immunology, vol.6, str.348, 1967.

tutijela u mnogih životinjskih vrsta koje posjeduju ovaj tip placente. Tako se u kunića majčina protutijela prenose preko uterine šupljine i stanica endoderma žumanjčane vreće, dok se preko placente uopće ne vrši prijenos (Brambell i sur. 1949). Interesantno je da se u kunića gama-makroglobulini (19S protutijela) prenose jednako lako kao i protutijela malene molekularne težine (7S gamaglobulini). Prema tome, membrane preko kojih se vrši prijenos ne služe kao tzv. "molekularno sito" (Hemmings i Jones 1962). Prijenos preko fetalnih membrana omogućuje tzv. Fc fragment ili Porterov fragment III molekule gamaglobulina. Naime, pokusi su pokazali da se Fc fragment prenosi jednako brzom kao čitava molekula gamaglobulina, dok se ostatak molekule prenosi u vrlo malenoj količini. Stoga se misli da ovaj fragment služi kao "držač" kojim se molekula gamaglobulina prihvaća na specifične receptore (Brambell i sur. 1960).

I u štakora se prenatalni prijenos protutijela odvija na sličan način kao u kunića, ali to vjerojatno nije jedini put, jer u prijenosu možda sudjeluje i placenta (Brambell i Halliday 1956). Postnatalni prijenos protutijela najbolje je proučen u štakora i miševa. U tih životinja se majčina protutijela i gamaglobulini izlučuju u mlijeko tokom laktacije, a prenose se preko probavnog trakta gotovo kroz cijelo razdoblje dojenja. Prijenos se naglo smanjuje oko 18-og postnatalnog dana, a 21-og dana potpuno prestaje (Halliday 1955). Vrijeme prijenosa može se i znatno skratiti, ako se životinji injiciraju kortikosteroidi (Halliday 1957a, 1959). Za vrijeme prijenosa iz crijeva u cirkulaciju mladog, gamaglobulini majke mogu promijeniti svoje prvobitne karakteristike (Brambell 1966). Moriss (1965) je mlađim štakorima davao peroralno (preko sonde) imune serume

koji su sadržavali samo kompletna protutijela (aglutinine) velike i malene molekularne težine (IgM i IgG). U cirkulaciji mladih štakora nije našao protutijela velike molekularne težine, već samo protutijela malene molekularne težine, i to inkompletna. Prema tome, protutijela malene molekularne težine bila su promijenjena iz kompletnih u inkompletne aglutinine.

Placenta žene također spada u hemohorijalne placentе (sadrži samo fetalne slojeve), pa se protutijela mogu prenositi iz majčine u fetalnu cirkulaciju. U novorođenčeta protutijela ne prolaze postnatalno. Iz majčine cirkulacije prolaze uglavnom samo protutijela tipa 7S, dok se protutijela 19S tipa mogu naći samo u tragovima (Gitlin i sur. 1963). Ovo se vjerojatno može pripisati funkciji placentе kao molekularnog sita, koje propušta molekule malene molekularne težine, a veće molekule zadržava (Šterzl i Silverstein 1967). U kolostrumu i mlijeku žene uglavnom su zastupljeni imunoglobulini velike molekularne težine (IgM i IgA), iako su istovremeno u njenom serumu najobilniji imunoglobulini malene molekularne težine (IgG) (Hanson 1960; Hanson i Johanson 1962; Rejnek 1964). Razina gamaglobulina u serumu novorođenčeta ista je, ili čak i nešto viša negoli u serumu majke. U narednih nekoliko mjeseci dolazi do pada razine gamaglobulina, a zatim oni postepeno rastu prema normalnim vrijednostima (Zak i Good 1959).

Pasivno prenesena majčina protutijela važna su za neposrednu zaštitu novorođenčeta protiv patogenih antigena, ali ova protutijela mogu utjecati i na naknadno inducirani, aktivni, primarni odgovor novorođenčeta prema takvim antigenima. Više je dokaza da ova protutijela suprimiraju imuni odgovor. Prijenos difteričkih antitoksina iz cirkulacije majke znatno suprimira ak-

tivno stvaranje antitoksina u imuniziranog djeteta (Butler i sur. 1954). Do sličnih zaključaka došli su Perkins i sur. (1958 i 1959), upotrebljavajući polio vakcinu. I pokusi na životinjama daju podršku ovom stavu (Uhr i Baumann 1961a i b; Nossal 1957). Neiders i sur. (1962) su utvrdili da pasivno prenesena protutijela na antigene eritrocita, imaju depresivni učinak na naknadnu aktivnu produkciju protutijela protiv eritrocitnih antigena. Lepow i sur. (1961) smatraju da do inhibicije vlastitog imunog odgovora mladog dolazi samo onda kada je titar pasivno prenesenih majčinih protutijela visok. Mehanizam ove inhibicije nije u potpunosti razjašnjen. Uglavnom se misli da je imunizirajuća aktivnost antigena smanjena poslije apsorpcije sa prisutnim protutijelima (Möller i Wigzell 1965). Drugi istraživači misle da pasivno prenesena protutijela onemogućavaju ili otežavaju produkciju i pojavljivanje vlastitih protutijela mehanizmom povratne sprege (Uhr i Baumann 1961a; Finkelstein i Uhr 1964).

Iz prethodnog se vidi da placenta može predstavljati djelomičnu barijeru za prijelaz molekula protutijela. Na temelju toga moglo bi se pretpostaviti da će uloga placentu u filtraciji krvi biti još izrazitija u pogledu stanica. Pa ipak, poznato je da stanice iz majčine krvi mogu prijeći placentarnu barijeru i ući u fetalni krvotok. Razumljivo je da, pod tim okolnostima, i fetalne stanice se mogu naći u majčinom krvotoku. U potonjem slučaju fetalne stanice, iz majčine cirkulacije, mogu u njoj inducirati imunost. Stvore li se pri tome protutijela protiv antigena fetalnih stanica, ona bi mogla, prošavši placentu, prodrijeti u fetalni krvotok, vezati se za fetalne stanične antigene i time fetus oštetiti. Obzirom da se među fetalnim stani-

cama u majčinom krvotoku mogu naći eritrociti, leukociti, trombociti, stanice trofoblasta itd. (Billington 1965; Lanman i sur. 1962; Kirby 1968) to je razumljivo da stvorena protutijela u majci mogu imati široki spektar specifičnosti. Dobro je poznata mogućnost senzibilizacije majke na antigene Rh faktora, kao i posljedice što ih takva senzibilizacija izaziva. I ABO inkompatibilnost majke i fetusa može dovesti do hemolitičkih oštećenja fetusa i novorođenčeta (Vlahović i sur. 1968). Na sličan način i leukociti mogu izazvati protutijela sa štetnim učinkom u novorođenčeta (Lalezari i sur. 1960).

S druge pak strane, ne smije se zanemariti ni posljedice prolaza majčinih stanica u fetalni krvotok. U tom slučaju se ne može, doduše, izvući analogan zaključak da bi time možda, majčina tkiva mogla biti oštećena zbog senzibilizacije fetusa. Dovoljno je bilo govora o relativnoj imunološkoj inerciji fetusa. No, ovakav prijelaz majčinih stanica u fetus može u njemu dovesti do drugovrskih posljedica. Poznato je da se među majčinim stanicama, što prelaze placentu i ulaze u fetus, nalaze eritrociti (Lee i Vazquez 1962) i leukociti (Dessai i Creger 1963). U pokusima na novookoćenim miševima i štakorima utvrđena je i mogućnost prijelaza imunokompetentnih stanica, kroz placentarnu barijeru (Good i Papermaster 1964; Billingham i sur. 1965). Neimunizirani novookoćeni miševi i štakori posjeduju, neposredno po okotu, maleni broj stanica koje stvaraju protutijela, pa se opravdano vjeruje da su to stanice majčinog porijekla. (Šterzl i Silverstein 1967).

Prisutnost tih tuđih imunokompetentnih stanica u mladome teoretski može dovesti do KpD (GvH) reakcije, što je od posebnog značenja u humanoj medicini. Ako se, naime, u hemolitičkoj

bolesti KpD reakcija i ne događa prirodno, uvjeti za njen razvoj često postoje zbog eksangvinotransfuzije novorođenčeta krvlju odraslih davalaca (Hašek i sur. 1961). Iako se prije mislilo da je ovakva vrsta reakcije moguća samo u pokusima na laboratorijskim životinjama, novija klinička iskustva ukazuju da se tipična GvH reakcija može dogoditi i nakon takvog terapijskog pothvata, čemu se do sada nije poklanjalo dovoljno pažnje (Hathaway i sur. 1967). Pored ove mogućnosti razumljivo je da se ovim postupkom može inducirati i specifična imunološka tolerancija novorođenčeta prema antigenima što ih nose injicirane stanice (Albert i sur. 1959).

3. O B R A Z L O Ž E N J E T E M E



Transplantacija stanica, tkiva ili organa u pravilu je neprirodan događaj. Iznimku od tog pravila čini fetus sisavca. Iako se, u nesrodnoj populaciji, fetus antigenski razlikuje od majke, ipak on ne doživljava sudbinu alogenog kalema. Taj njegov povlašteni položaj nije, međutim, do kraja osiguran. Poznato je, naime, da stanice fetusa mogu senzibilizirati majku i potaknuti stvaranje protutijela, koja mogu prouzrokovati hemolitičku bolest mladunčeta. S druge, pak, strane važnost humoralne imunosti majke u zaštiti novorođenčeta od patogenih uzročnika dobro je poznata. Očito je, dakle, da između majke i fetusa-novorodenčeta postoje fiziološki putevi kojima se prenose imunogene informacije, kao i putevi koji osiguravaju očitovanje imunoloških učinaka.

Koliko god je dobro poznata zaštitna uloga humoralne imunosti majke u organizmu novorođenčeta, toliko su drugi oblici imunoloških odnosa između njih ostali u dobroj mjeri nepoznati. Tako, vrlo su oskudni podaci koji nam govore o utjecaju majčine preosjetljivosti odgođenog tipa na reakciju mladunčeta prema istom imunološkom podražaju. Tom tipu preosjetljivosti pripada i imunosna reakcija na presađeno alogeno tkivo (transplantacijska imunost). Obzirom na razlike u antigenosti između majke i fetusa, odnosno novorođenčeta, kao i na prisutnost fizioloških veza između njih, smatrali smo vrijednim razmotriti kako se ti odnosi očituju na transplantacijsku imunost mladunčadi. Predmet ove rasprave je, stoga, analiza utjecaja majčine imunosti, potaknute alogenim tkivom, na tkivnu imunost mladih štakora.

Obzirom na veze koje, u ovoj životinjskoj vrsti, postoje

između majke i fetusa, odnosno novorođenčeta, trebalo je pretpostaviti da se iz majke mogu u organizam mladunčeta prenijeti i stanice i protutijela, makar i u ograničenim količinama. U nastojanju da što iscrpnije ispitamo njihov biološki utjecaj bilo je potrebno omogućiti i njihov bogatiji prijenos. U zasebnim smo pokusima pokušali stoga povisiti propusnost placente primjenjujući hijaluronidazu. Nakon ulaska stanica u fetus moglo se očekivati da će mladunče na njih postati: a) imuno, b) tolerantno, ili c) da će ga stanice u reakciji "kalema protiv domaćina" oštetiti.

Prijenos humoralnih protutijela mogao bi u mladunčetu pro-uzrokovati oštećenja zbog citotoksičkih svojstava protutijela, ili pak facilitaciju rasta onih stanica ili tkiva prema kojima su specifično usmjerena. Budući da reaktivnost na alogeni kalem neodvojivo uključuje kako tkivnu, tako i humoralnu imunitet, to smo u mladunčadi ispitivali i jedan i drugi oblik imunološke reaktivnosti. Tkivnu imunitet mladunčeta određivali smo procjenom sudbine presađenog alogenog kalema kože, a njegovu humoralnu reaktivnost provjerili smo testiranjem hemaglutinina, usmjerenih na antigene eritrocita davaoca kalema.

#### 4. M A T E R I J A L I M E T O D E

#### 4.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

U svim pokusima upotrijebili smo štakore i to: genetički nesrodne albino štakore (Y), i genetički čiste sojeve štakora Lewis i Y-59. Životinje potječu iz rasploda vlastitog laboratorijskog uzgoja Zavoda za fiziologiju.

Genetički nesrodna (heterozigotna) kolonija naših štakora razvija se već 6 godina kao zatvorena populacija. Matično leglo je stvoreno od nekoliko pari štakora iz kolonije Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. U zadnjih 5 godina ova se kolonija razvija samostalno, bez obnavljanja sa štakorima iz drugih centara. S obzirom na zatvorenost uzgoja postoji mogućnost da je u tom razdoblju došlo do nekontroliranog djelomičnog srođivanja životinja, obzirom na gene tkivne srodnosti. Stupanj srođivanja može se ocijeniti provjerom sposobnosti odbacivanja kožnih kalema izmjenjenih među nasumce odabranim štakorima. Naša testiranja ukazuju da se u ovom vremenskom razdoblju povećala učestalost nasumce odabranih štakora, koji kožne kaleme nose duže od prvobitno utvrđenog srednjeg vremena preživljavanja, pa je tome poklonjena odgovarajuća pažnja i u ovom radu. Štakori se stavljaju na rasplod po principu slučajnog izbora, pa se mogu dobiti kombinacije životinja koje su genetički više ili manje slične. Okočena mladunčad ostaje u istom kavezu sa majkom do navršenih mjesec dana, a tada se prenosi u odvojene kaveze, u koje se smještaju štakori iz više legala.

Soj albino štakora Lewis potječe iz Instituta "Ruđer Bošković", a soj albino štakora Y-59 iz Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Čistoća

sojeva kontrolira se povremenom izmjenom kožnih kalema. Sve štakore, iz oba čista soja, koje smo upotrijebili u ovom radu, prethodno smo testirali izogenim kožnim kalemima, da bi se osigurali od eventualne pojave genske mutacije koja može promijeniti antigene tkivne srodnosti. Svi testirani štakori su trajno prihvatili presađene izogene kaleme.

Štakori su podijeljeni po spolu u odvojene kaveze, u kojim se nalazi prosječno po 6 životinja. Prehrana štakora je standardna i sastoji se od keksa (proizvod "Pliva"-Zagreb). Posebno se životinje dohranjuju jedanput sedmično zelenjem, mrkvom i kvascem. Povremeno, (dva puta mjesečno) hrane se i svježom goveđom jetrom.

#### 4.2. TEHNIKA KOŽNOG KALEMA

Presađivanje kožnog kalema je dovoljno osjetljiva i pristupačna metoda za ocjenjivanje stupnja tkivne srodnosti transplantacijskih partnera, kao i za analizu reaktivnosti primalaca izloženih specifičnim imunološkim postupcima, koji su predviđeni eksperimentalnim protokolom. Upotrebljavali smo ortotopni kalem kože, tj. kalem koji se životinji primaocu ušije na anatomski analogno mjesto. Služili smo se metodom kalema pune debljine ("full thickness graft"-angloam. autora)(Billingham 1961b).

Štakora-davaoca kalema, prethodno se narkotizira. Upotrebljavali smo kloralhidrat kao narkotik (Chlorali hydras - "Medika"). Injicira se intraperitonealno u dozi od 1 ml na 100 g tjelesne težine štakora. Ovaj narkotik je pogodan jer se dobro podnosi i obično ne izaziva toksične učinke. Kada smo kale-

mili mlade štakore (stare do mjesec dana) upotrebljavali smo etersku narkozu (Aether ad narcosin - "Lek"), jer se lakše kontrolira.

Narkotiziranom štakoru se škarama odstrani dlake sa strane grudnog koša, pa se to područje nasapuna i izbrije britvicom. Tako pripremljeno operativno polje premaže se 70% alkoholom i sterilnim skalpelom omeđi kvadrat veličine 2x2 cm u odraslih štakora, odnosno 1,5x1,5 cm u mladih životinja. Dublje se zasiječe lijevi donji rub kvadrata i prihvati malom kirurškom pincetom. Zatim se "tupo" ispreparira sloj kože koji se nalazi iznad mišićnog sloja (panniculus carnosus-a). Pritom treba paziti da se ne ozlijede krvne žile koje su smještene iznad mišićnog sloja. Kožni odsječak se odvoji od podloge i prenese u sterilnu zdjelicu sa fiziološkom rastopinom. Na isti način se pripremi i primalac, pazeći da ležište na primaocu površinom odgovara kožnom odsječku uzetom sa davaoca. Zatim se prenese kožni kalem davaoca u pripremljeno ležište na primaocu. Kalem se okrene za 180°, da bi se u slučaju duljeg preživljavanja lakše pratila sudbina presađene kože, jer dlaka na kalemu raste suprotno od smjera rasta dlake primaoca. Kalem se adaptira prema rubovima kože primaoca i pričvrsti sa 8 šavova (4 šva na uglovima, a 4 po sredini svake strane). Kalem se obično postavlja na lateralnu stjenku grudnog koša, jer rebra osiguravaju čvrstu podlogu, a omogućena je i adekvatna opskrba kalema krvlju, kao i venska i limfna drenaža. Na kalem se stavi sterilna gaza premazana sa 10% sulfatiazolskom masti, a grudni koš se uvije u leu-koplast. Time se postiže dovoljan pritisak kalema na ležište, što spriječava obilniju eksudaciju i traumatiziranje kalema.

Kada nema komplikacija (zbog loše tehnike, infekcija itd.), kalem se prihvati per primam intentionem i jedva ga možemo razlikovati od okolne kože primaoca. Krvne žile brzo uraštavaju iz ležišta u kalem, tako da je već četvrtog dana presađena koža ružičaste boje. Converse i Rapaport (1956) ističu da je 4-og dana vaskularizacija kalema skoro dovršena. Leukoplast i zavoji skidaju se 7-og dana, a stanje kalema prati se svakodnevno makroskopski. Ocjenjuje se boja, elastičnost, mekoća i eventualni rast dlake.

Odbacivanje alogenog kalema kože može biti akutno ili kronično, što ovisi od više faktora (Barnes i Krohn 1957), kao što su: genetičke razlike između davaoca i primaoca, veličina kožnog kalema, eventualna prethodna senzibilizacija primaoca sa antigenima davaoca, te dob primaoca (Anderson 1970).

Reakcija akutnog odbacivanja kalema praćena je snažnom upalnom infiltracijom (Eichwald i sur. 1966). Koža postaje edematozna, a zatim joj se promijeni boja od svjetloružičaste prema žučkastoj, smeđoj i ponekad crnoj. Kalem gubi elastičnost, a zatim mekoću, pa se na kraju može pretvoriti u tvrdu krustu. Gubitak normalnog epidermisa i stvaranje kruste, u ovakvom tipu reakcije, uzimali smo kao kriterij za odbacivanje kalema. U pokusima u kojim su primaoci prethodno senzibilizirani sa tkivima davaoca, dolazilo je često do burne reakcije sa liziranjem kalema.

Reakciju kroničnog odbacivanja kalema mnogo je teže precizno kontrolirati i odrediti točan dan konačnog odbacivanja. Kalem se postepeno smanjuje, epidermis se počne stanjivati, oslabi mu veza sa dermisom, dolazi do involucije privjesaka ko-

že (dlake ne rastu iako se kalem drži), a pri kraju pojave se brazgotine. Ovaj tip reakcije odbacivanja često smo vidjeli u mladih štakora. Značajnije smanjenje kalema i pojavu brazgotina, uzimali smo u svim reakcijama ovog tipa kao znak odbacivanja.

#### 4.3. KATEGORIZACIJA STUPNJA TOLERANCIJE NA PRESADENE KALEME

Da bi iskazali stupanj tolerancije primalaca na presađene kaleme poslužili smo se srednjim vremenom odbacivanja (SVO) kalemâ. Držeći se tog principa sve smo životinje podijelili u 3 skupine: a) netolerantne, b) tolerantne i c) visoko tolerantne.

a) Netolerantni. U ovu smo skupinu svrstali sve mlade štakore koji presađene kaleme nose kraće od vrijednosti  $SVO + 3SP$  (srednje vrijeme odbacivanja + trostruka vrijednost standardne pogreške) iz odgovarajuće kontrolne grupe normalnih štakora.

b) Tolerantni. Ovoj skupini pripadaju svi štakori koji presađeni kalem nose duže od  $SVO + 3SP$ , ali kraće od trostruke vrijednosti SVO za kaleme iz odgovarajuće kontrolne grupe.

c) Visoko tolerantni su svi štakori na kojima je presađeni alokalem preživio duže od trostruke vrijednosti SVO, za odgovarajuću kontrolnu grupu.

#### 4.4. PRIPREMA STANIČNIH SUSPENZIJA ZA SENZIBILIZACIJU

Suspenziju stanica slezene (splenocita) pripremali smo od slezene mužjaka genetički čistog soja Lewis. Štakor se anestetizira, abdomen otvori uzdužnim rezom u medijalnoj liniji i izvadi slezena. Slezena se prvo isječe škarama i zatim prenese na



metalnu mrežicu uronjenu u zdjelicu sa Ringerovom rastopinom, puferiranom fosfatnim puferom ( Billingham 1961 a ). pH rastopine iznosi 7,6. Sa porcelanskim tučkom tkivo slezene se protisne kroz mrežicu, pa u rastopinu prolaze pojedinačne stanice, kao i manje nakupine stanica. Na mrežici uglavnom ostane vezivno tkivo. Suspenzija stanica se zatim proštrcava kroz seriju injekcijskih igala od broja 1 do broja 20, pri čemu se potpuno razbiju nakupine stanica. Suspenzija se centrifugira 3 minute na 1.200 okretaja ( rashladna centrifuga "Janetzki" ), supernatant se odbaci, a sedimentu ponovno doda puferirana Ringerova rastopina. Ovaj se postupak ponovi još dva puta. Sediment se konačno razrijeđi u 1-2 ml Ringerove rastopine, dobro promiješa da se dobije jednolična suspenzija i odredi broj stanica u  $\text{mm}^3$ , Broj stanica se određuje standardnim hemocitometrijskim postupkom, tj. broje se nukleirani elementi.

Opisani postupak pripremanja splenocita dovodi do mehaničkih oštećenja, pa i ugibanja, izvjesnog broja stanica. Stoga smo uvijek određivali postotak preživjelih stanica metodom ekskluzije boje ( Schreck 1958 ). Upotrijebili smo 0,2 % eozina ( Eozinum flavum - "Kemika" ) - u fiziološkoj rastopini, kojom se razrijeđi suspenzija splenocita 1:100. Nakon miješanja od 3 minute hemocitometrijski smo odredili broj stanica koje su primile boju. Te stanice smatramo "mrtvim", a njihov broj iznosio je oko 30 % od ukupnog broja stanica.

Suspenziju splenocita injicirali smo intravenski ili supkutano. Broj splenocita za intravensko injiciranje izražavali smo na temelju nađenog broja "živih" (eozin negativnih) stanica. Za supkutano injiciranje broj stanica izražavali smo prema ukupnom bro-

ju stanica u suspenziji. U nekim pokusnim grupama splenociti su inkorporirani u Freundov adjuvans, da bi se u primaocu pojačao ionizirajući učinak ovih stanica. Na opisani način pripremljena suspenzija splenocita dodavana je polagano, uz neprestano miješanje, u jednak dio Freundove emulzije. Ta emulzija je sastavljena od 82 ml parafinskog ulja, pomiješanog sa 18 ml lanolina, u čemu je emulgirano 520 mg suhih mikobakterija tuberkuloze (bovinog tipa).

I stanice periferne krvi, u kojoj brojem dominiraju eritrociti, služile su kao materijal za senzibilizaciju. Za pripremu suspenzije uzimali smo krv iz repne vene štakora. Krv smo sakupljali u epruvete sa 1 ml 3,8 % rastopine natrijskog citrata. Zatim smo u epruvetu dodali puferiranu Ringerovu rastopinu do ukupnog volumena od 10 ml. Postupak ispiranja suspenzije centrifugiranjem, odlijevanjem supernatanta i dodavanjem Ringerove rastopine identičan je kao i za pripremu suspenzije splenocita. Konačno priređenu suspenziju krvnih stanica injicirali smo intravenski na osnovu broja eritrocita određenog hemocitometrijski.

#### 4.5. HIJALURONIDAZA

Hijaluronidaza nam je služila za povećanje propusnosti placentarne membrane, posebno za olakšavanje prijenosa stanica. Upotrebljene su dvije vrste hijaluronidaze, zbog teškoća u nabavi. No, budući da se rezultati pokusnih grupa životinja, tretiranih sa hijaluronodazom iz dva različita izvora i s različitim deklaracijama direktno ne uspoređuju, ovu okolnost ne smatramo kritičnom za konačnu interpretaciju opažanja.

1. H<sub>3</sub>gluronidase - Wydase ( ex bovine testes, lyoph. Wyeth Lab. Inc. Philadelphia ) nalazi se u bočicama koje sadržavaju 150 T.R. ( turbidity reducing ) jedinica. Sadržaj bočice se razrijedi sa 1 ml sterilne fiziološke NaCl rastopine i tako se liofilizat rastopi. Takvu rastopinu hijaluronidaze injicirali smo jednokratno intravenski gravidnim ženka u zadnjoj fazi trudnoće, u dozi od 10-15 T.R. jedinica.

2. Hyaluronidase ( ex bovine testes, salt free, lyoph., Koch-Light Lab. England ) sadržava 300 I.U. ( international units ) na mg liofilizata. Liofilizat smo rastopili u fiziološkoj NaCl rastopini kao gore, i gravidnim ženka smo ga injicirali trokratno intravenski, kroz 3 dana, u dnevnim dozama od 3.000 I.U. Četvrti dan smo ženke injicirali intraperitonealno sa 6.000 I.U. hijaluronidaze.

#### 4.6. ODVAJANJE SERUMA

Uzorak seruma za testiranje uzimali smo iz repne vene štakora. Životinja se uvede u blau etersku narkozu, vršak repa se zasiječe škarama i pusti krv da slobodno kapa u sterilnu epruvetu od 10 ml. Epruveta se ostavi 1-2 sata na sobnoj temepraturi. Koagulum se odvoji od stijenki epruvete sterilnim staklenim štapićem, a zatim se centrifugira 5 minuta na 1.200 okretaja. Tako odvojeni serum prebaci se u serološke epruvetice. Serum se do konačne upotrebe pohrani u hladnjaku, na temperaturi, nd oko -25<sup>o</sup>C. Prema našem iskustvu hemaglutinacijska aktivnost seruma ne mijenja se niti nakon stajanja 6-8 mjeseci.

#### 4.7. TEST HEMAGLUTINACIJE /METODA SA DEKSTRANOM/

Za određivanje intenziteta humoralnog odgovora upotrijebili smo test hemaglutinacije, jer se hemaglutininska protutijela u pravilu nalaze u serumu životinja senzibiliziranih bilo kožom bilo različitim suspendiranim stanicama ( Vlahović i sur. 1965; Rukavina 1968 ). Osjetljivost primjenjene metode nastojali smo povećati dodavanjem tvari koje "olakšavaju" hemaglutinaciju. Među te tvari spada i dekstran ("Intradex" 6 %, sa 5 % glukoze, Glaxo, Allenburry, Ltd.London ), kojeg smo i mi upotrijebili. Služili smo se serološkom mikrometodom ( Rubinstein i sur.1964) sa 2 % dekstrana u fiziološkoj rastopini i 6 % bovinog serum albumina ( BSA, Fatty acid poor, B grade, Fraction V, "Calbi: chem", USA ) u fiziološkoj rastopini. U kontrolnom pokusu aglutinacije eritrocita štakora, bez imunog seruma, 2 % dekstrana i 6 % BSA, maksimalne su koncentracije ovih tvari koje još ne daju "lažne" pozitivne rezultate ( sljepljivanje eritrocita i stvaranje rulo formacija ).

Bitna slabost hemaglutinacijske metode u fiziološkoj rastopini NaCl sastoji se u tome što se progresivnim razrijeđivanjem ispitivanog seruma progresivno smanjuje i koncentracija bjelančevina u međiju. Stoga se pored "olakšavajuće" uloge dekstrana ova metoda može još unaprijediti održavanjem konstantne koncentracije bjelančevina u serijskim razrijeđenjima seruma ( Vlahović i sur. 1965 ). Korekciju koncentracije bjelančevina u našim pokusima izvršili smo dodavanjem 6 % BSA u medij u kojem se razrjeđuje ispitivani serum. Tako je ukupna koncentracija bjelanče-

vina u našim dvostrukim serijskim razrjeđenjima bila u prvoj epruveti 1,15 g %, a u trećoj već 1,4 g %, te se asimptotski, u daljnjim epruvetama, približuje koncentraciji od 1,5 g %.

U tako priređena razrijeđenja seruma<sup>u</sup> BSA dodaje se na svaki volumen razrijeđenja po jedan volumen 2 % dekstrana, fiziološka NaCl rastopina i 2 % suspenzije ispranih test eritrocita u fiziološkoj NaCl rastopini. Na taj način prvo finalno razrijeđenje test seruma je 1:4. Epruvete se inkubiraju u termostatu na 37°C kroz 30 minuta. Nakon isteka inkubacijskog vremena sadržaj epruveta se prenese na predmetno stakalce i stupanj aglutinacije očita pod mikroskopskim povećanjem od 50 x. Titar hemaglutinina je recipročna vrijednost zadnjeg razrijeđenja koje još daje pozitivnu reakciju aglutinacije. Obično smo titar prikazivali kao logaritamsku vrijednost sa bazom 2. Intenzitet aglutinacije, u pojedinoj epruveti, ocjenjivali smo prema kriteriju koji su opisali Rubinstein i sur. ( 1964 ):

- P = potpuna ( aglutinat bez slobodnih eritrocita )
- SP = skoro potpuna ( aglutinat s nešto slobodnih eritrocita )
- +++ = jaka aglutinacija
- ++ = makroskopski još vidljiva aglutinacija
- + = mikroskopski vidljiva aglutinacija

U našim pokusima od posebnog je značaja bilo određivanje ne samo ukupnih hemaglutinina, već i onih malene molekularne težine ( 7S protutijela ). Tretiranjem seruma s 2-Merkaptoetanolom može se ova frakcija protutijela izdvojiti ( Chan i Deutsch 1960; Sahiar i Schwartz 1965 ). Serum obrađen merkaptoetanolom sadrži

samo aktivnost protutijela tipa 7S, dok protutijela tipa 19S gube specifičnu aktivnost ( Pike i Schulze 1965 ). Stoga se protutijela tipa 7S često nazivaju i merkaptoetanol rezistentna.

Obrada seruma s merkaptoetanolom izvodi se na slijedeći način:

1. Pripremi se 0,05 M rastopina fosfatnog pufera u fiziološkoj NaCl rastopini. Pufer ima pH 7,0. Zatim se priredi 0,2 M rastopina 2-merkaptoetanela u tako priređenom fosfatnom puferu.
2. Ispitivani serum se pomiješa sa jednakim volumenom merkaptoetanela u fosfatnom puferu i inkubira u termostatu ( 37°C kroz 30 minuta ). I serum bez merkaptoetanela, pomiješan samo sa fosfatnim puferom, podliježe analognoj proceduri.
3. Serijska razrijeđenja seruma u BSA, uz dodatak dekstrana, priredi se na analogan način kao što je opisano za native serume. Razlika prema dekstranskoj metodi očituje se u finalnom razrijeđenju seruma, koje u prvoj epruveti iznosi 1:8. Do ovog povećanog razrijeđenja seruma, obzirom na prije opisano, dolazi zbog prethodnog miješanja seruma s 2-merkaptoetanolom, odnosno sa fosfatnim puferom, u omjeru 1:2.

#### 4.8. STATISTIČKE METODE

Obradu rezultata unutar pokusnih grupa, kao i usporedbe među grupama, vršili smo "Student-ovim" t-testom ( Fisher 1958 ).

Služili smo se i metodom izračunavanja koeficijenta korelacije iz negrupiranih rezultata ( Petz 1964 ), pri čemu je koeficijent korelacije (  $r$  );

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{\sqrt{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{N \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

a linearni pravac korelacije izračuna se prema jednadžbi ( Vranić-Serdar 1960 )

$$y' = ax + b$$

pri čemu je:

$$a = \frac{\sum xy - \bar{x} \sum y}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x} .$$

5. R E Z U L T A T I , O P A Ź A N J A I D I S K U S I J A



5.1. UTJECAJ IMUNOKOMPETENTNIH STANICA I HUMORALNIH PROTUTIJELA PRENESENIH IZ ORGANIZMA MAJKE, NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI. POKUSI NA GENETIČKI ČISTIM SOJEVIMA ŠTAKORA.

Kako je već istaknuto u Općem dijelu, imunološki odgovor primaoca nakon senzibilizacije alogenim tkivom očituje se dvostrukom reakcijom: stvaranjem stanične i humoralne imunosti. Nadalje, opisano je kako imunološki sistem majke može utjecati na imunološku reaktivnost mladih. Može se, dakle, pretpostaviti da bi obje vrste imunosti pod određenim uvjetima, mogle preinačiti imunološku reaktivnost mladih.

U nekim od prijašnjih pokusa ispitivali smo utjecaj senzibilizacije ženki-budućih majki, tkivom oca mladih, na preživljavanje roditeljskih kalema u mladunčadi ( Rukavina 1968; Vlahović i Rukavina 1970 ). Opazili smo da mladunčad znatno duže nosi očev kožni kalem, ukoliko je majka prije trudnoće bila trokratno senzibilizirana očevim kalemima kože. Ovaj način senzibilizacije nije imao utjecaja na preživljavanje istovremeno presađenih majčinih kalema na mladunčad: intenzitet odbacivanja za majčine kaleme bio je isti kao i u kontrolnih životinja. Ove rezultate smo pripisali facilitacijskom djelovanju humoralnih protutijela prenesenih iz organizma majke u mladunčad. Daljnju podršku ovom mišljenju pružili su i drugi pokusi. Naime, ušivanje trećeg, senzibilizirajućeg, očevog kalema na majku, par dana prije okota mladih, nije dovelo do opisanog produženja nošenja očevog kalem / idem /. Pretpostavili smo stoga da je treći kalem primijenjen u razdoblju koje je kritično za prijenos humoralnih protutijela, pa je mogao " pokupiti " nešto od specifične

facilitacijske aktivnosti protutijela. Fetus-mladunče je u tom pogledu ostao prikraćen, pa je to moglo presudno utjecati na kasniju reaktivnost mladog prema očevom kalemu. Podaci u literaturi u ovom smislu, vrlo su oskudni. Preliminarni rezultati Gorera, izneseni u obliku usmenog saopćenja, ipak su ukazivali na mogućnost ovakvog mehanizma ( Voisin 1962 ). Za konačnu potvrdu facilitacijske uloge humoralnih protutijela neophodno bi bilo pratiti dinamiku i intenzitet produkcije tih protutijela u organizmu senzibilizirane majke, kao i obim njihova prijenosa u cirkulacijski sistem mladih. Tek takva analiza može dati više dokaza o stvarnom utjecaju prenesenih humoralnih protutijela na preinaku imunološke reaktivnosti mladih. Osim toga, spomenute pokuse smo vršili na genetički nesrodnoj populaciji štakora, pa je bilo od interesa za razjašnjenje mehanizma ovih učinaka i njihova provjera na genetički čistim sojevima štakora. Naše naredne pokuse smo proširili još i utoliko, što nismo samo analizirali utjecaj majčine humoralne imunosti na mlade, već smo pokušali provjeriti i mogući utjecaj imunokompetentnih stanica, koje i normalno, a pogotovo su u našim eksperimentalnim uvjetima, mogle proći barijeru placente.

Genetički čisti sojevi štakora, što smo ih upotrebili u ovim pokusima, bili su Lewis i Y-59. Mužjaci soja Lewis poslužili su kao davaoci, a štakori soja Y-59 kao primaoci kožnih kalema. Poznato je da se ovi sojevi štakora razlikuju obzirom na Rt H-1 lokus, koji je glavni sistem tkivne srodnosti u štakora ( Štark i Hauptfeld 1969 ). U ovom sistemu do sada je utvrđeno 9 serološki različitih alela, koji su otkriveni serološkim metodama, uglavnom hemaglutinacijom u dekstranu, citotoksičkim testovima i

apsorpcijom aloimunih seruma ( idem, Štark i Kren 1967; Štark i sur. 1968 ). Tablica II prikazuje antigene specifičnosti karakteristične za ova dva soja.

TABLICA II

Rt H-1 ANTIGENI KARAKTERISTIČNI ZA ŠTAKORE  
LEWIS I Y-59<sup>x</sup>

Alel	Individualni antigeni na eritrocitima						Soj	
H-1 <sup>l</sup>	5	7	8		16	17	Lewis	
H-1 <sup>c</sup>			9	10	13	15	17	Y - 59

x - Prema: Štark i Hauptfeld, Fol.Biol., 15:35, 1969.

Izgleda da je od posebne važnosti obratiti pažnju na antigene specifičnosti 5, 7, i 8, koje se vjerojatno nasljeđuju zajedno kao kompleksni antigen. Ovaj kompleks specifičnosti, karakterističan za štakore soja Lewis, ima snažnu transplantacijsku antigenost ( Štark i Kren 1967c ).

Da bi odredili prosječno vrijeme preživljavanja Lewisovih kožnih kalema na štakorima Y-59, kalemili smo 8 ženki soja Y-59 starih oko 3 mjeseca, kožom mužjaka Lewis. Svi presađeni kalemi bili su odbačeni osmog dana. Nadalje, trebalo je utvrditi kako mladi štakori oba spola, soja Y-59, odbacuju Lewisove kaleme. Stoga smo grupi od 30 mladih štakora soja Y-59, starih 25-30 dana, presađili kožne kaleme mužjaka Lewis. Većina mladih (80 %) odbacila je presađene kaleme osmog dana, a preostali su odbacili devetog dana. Ovi štakori čine kontrolnu grupu K.

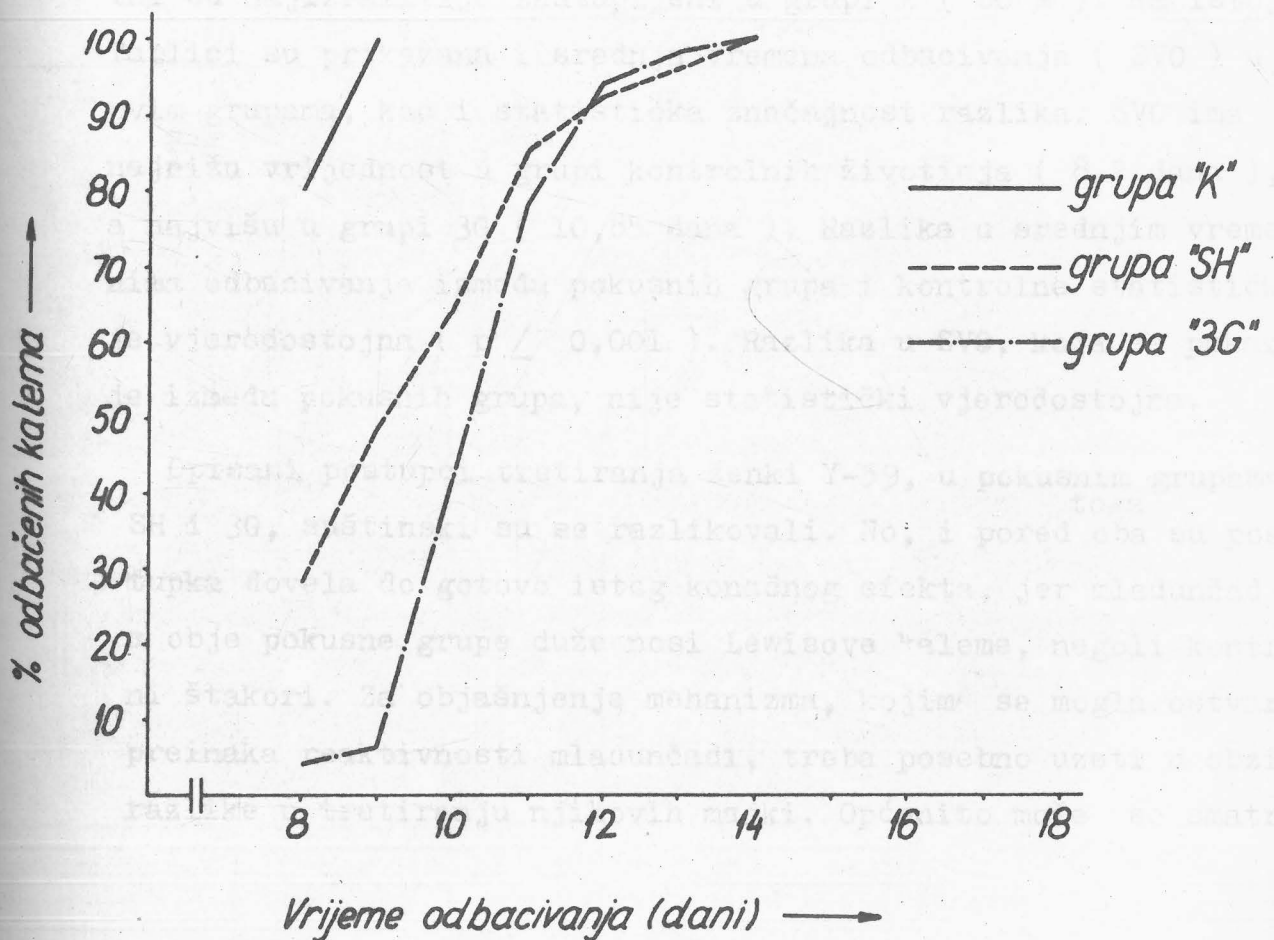
Vrijeme odbacivanja Lewisovih kalema presađenih na mlade Y-59 u kontrolnoj grupi, praktički se ne razlikuje od vremena odbacivanja istih kalema presađenih na odrasle ženke Y-59, što ukazuje da su mlade štakori u ovoj životnoj dobi ( stari 25-30 dana ) dosegli punu sposobnost imunološke reaktivnosti na alogena tkiva. Osim toga, analiza pojedinačnih rezultata pokazala je da ne postoje razlike u vremenima odbacivanja kožnih kalema mužjaka Lewis presađenih na mlade različitog spola. To je i razumljivo, jer manje razlike u tkivnoj srodnosti ( razlike na spolnom kromozomu ) slabo utječu na preživljavanje presađenih alogenih tkiva, ako se transplantacijski partneri međusobno razlikuju u jakim antigenima tkivne srodnosti ( Rt H-1 lokus ), kao što je u našem primjeru.

Eksperimentalne štakore podijelili smo u dvije grupe. U grupi SH smo injicirali Lewisove splenocite u ženke Y-59, stare oko 3 mjeseca. Splenocite smo injicirali u zadnjoj trećini graviditeta, i.v. kroz 3 dana uzastopno, u ukupnoj dozi od 134 milijuna živih stanica. Prvu dozu splenocita injicirali smo, ovisno o leglu, između sedmog i desetog dana prije okota mladih. Svaki inokulum suspendiran je u 0,7 ml puferirane Ringerove rastopine. Istovremeno sa injekcijom splenocita ženke smo i.v. injicirali i hijaluronidazom ( Hyaluronidase, Koch-Light Lab. ) u dozi od 3.000 I.U., koju smo rastopili u 0,5 ml fiziološke NaCl rastopine. Četvrti dan su sve gravidne ženke još i dodatno, intraperitonealno, injicirane sa 6.000 I.U. hijaluronidaze. Mlade svih ženki, kada su bili stari 25-30 dana, kalemili smo kožom mužjaka Lewis i pratili sudbinu presađenih kalema. Nakon kalem-ljenja smo uzimali iz vrpne vene mladih, uzorak krvi za određivanje titra hemaglutinina na eritrocite mužjaka Lewis (7,11 i 21-i dan ).

U drugoj pokusnoj grupi ( grupa 3G ), također su upotrebijene ženke Y-59, stare oko 3 mjeseca. Ženke su trokratno kalemljene kožom mužjaka Lewis, a nakon odbacivanja trećeg kalema stavljane su na rasplod sa mužjacima Y-59. Pri kraju graviditeta, kao i par dana nakon okota, uzimali smo im uzorak krvi za serološke pretrage. Prilikom vađenja uzoraka krvi jedna je ženka uginula, pa smo njene mlade, stare 2 dana prebacili nesenzibiliziranoj ženki Y-59, koja je imala mlade približno iste starosti. Mladi su "usvojeni", a rezultati kalemljenja ove mladunčadi posebno su prikazani u diskusiji rezultata. Sve mlade iz grupe 3G kalemili smo kožom mužjaka Lewis, a 7, 11 i 21-og dana nakon kalemljenja sakupljali smo krv iz repne vene. Nekima od mladih, kao i njihovim majkama, uzimali smo uzorak krvi na sam dan kalemljenja.

Na slici 2. prikazana je dinamika odbacivanja kožnih kalema mužjaka Lewis, presađenih na mlade kontrolne grupe ( K ) i pokusnih grupa SH i 3G. Vidi se da u mladunčadi normalnih, netretiranih, ženki soja Y-59 ( K grupa ) proces odbacivanja traje samo 2 dana. Osmog dana odbačeno je 80 %, a preostalih 20 % kalema odbačeno je devetog dana. Krivulje odbacivanja u grupama SH i 3G pomaknute su u desno i znanto se razlikuju od pravca odbacivanja u kontrolnoj grupi. Naime, proces odbacivanja mnogo duže traje, jer samo malen broj životinja odbacuje kaleme osmog dana, a odbacivanje kalema završava četrnaestog dana. U grupi SH je osmog dana odbačeno 18 %, a u grupi 3G svega 3 % ( 1 životinja ) presađenih kalema. Devetog dana, kada su odbačeni svi kalemi u kontrolnoj grupi, još uvijek je prihvaćeno

## Dinamika odbacivanja Lewisovih kožnih kalema presadenih na mlade štakore soja Y-59



52 % kalema u grupi SH, a čak 94 % u grupi 3G.

Srednje vrijeme odbacivanja ( SVO ) Lewisovih kožnih kalema presađenih na mlade Y-59 u kontrolnoj grupi iznosi  $8,2 \pm 0,1$  dana, a prema prethodno iznesenim kriterijima tolerancije svi mladi koji odbacuju Lewisov kalem do osmog dana spadaju u skupinu netolerantnih; oni, koji nose kalem od devet do 25 dana su tolerantni, a preko dvadesetpet dana su visoko tolerantni. Na Tablici III prikazana je učestalost tolerancije prema iznesenim kriterijima. Ni u jednoj grupi ne susrećemo visoko tolerantne životinje, dok je učestalost tolerantnih nešto veća u grupi 3G, negoli u grupi SH ( 97 %, odnosno 82 % ). Netolerantni su najizrazitije zastupljeni u grupi K ( 80 % ). Na istoj Tablici su prikazana i srednja vremena odbacivanja ( SVO ) u ovim grupama, kao i statistička značajnost razlika. SVO ima najnižu vrijednost u grupi kontrolnih životinja ( 8,2 dana ), a najvišu u grupi 3G ( 10,85 dana ). Razlika u srednjim vremenima odbacivanja između pokusnih grupa i kontrolne statistički je vjerodostojna (  $p < 0,001$  ). Razlika u SVO, koja se pokazuje između pokusnih grupa, nije statistički vjerodostojna.

Opisani postupci tretiranja ženki Y-59, u pokusnim grupama SH i 3G, suštinski su se razlikovali. No, i pored oba su postupka dovela do gotovo istog konačnog efekta, jer mladunčad u obje pokusne grupe duže nosi Lewisove kaleme, negoli kontrolni štakori. Za objašnjenje mehanizma, kojim se mogla ostvariti preinaka reaktivnosti mladunčadi, treba posebno uzeti u obzir razlike u tretiranju njihovih majki. Općenito može se smatrati

T A B L I C A III

UČESTALOST TOLERANCIJE I SVO KOŽNIH KALEMA ŠTAKORA LEWIS NA MLADIMA SOJA Y-59

GRUPA	TRETMAN MAJKE	BROJ MLADIH	NETOLERANTNI	TOLERANTNI	VISOKO TOLERANTNI	X	SVO $\pm$ SP <sup>x</sup>	P
K	0	30	24 (80%)	6 (20%)	0	8,2	$\pm$ 0,1	SH : K $\angle$ 0,001
SH	Lewis.splen. + hijaluronid.	27	5 (18%)	22 (82%)	0	10,0	$\pm$ 0,3	3G : K $\angle$ 0,001
3G	3 x Lewisov kalem	34	1 (3%)	33 (97%)	0	10,8	$\pm$ 0,2	

x = standardna pogreška aritmetičke sredine



da je prijenos injiciranih stanica mogao dovesti do opažene tolerancije mladunčadi Y-59 na Lewisove kaleme. Produženje života Lewisovih kalema u grupi 3G, mogli bismo pripisati utjecaju prokrijetih humoralnih protutijela iz majke. U narednoj raspravi objašnjavaju se načini kojima bi se ovi učinci mogli ostvariti.

Već smo u Općem dijelu naglasili da placenta predstavlja barijeru koja otežava prijenos majčinih stanica u fetus, iako ga ne može u potpunosti spriječiti. Prema tome, i u normalnim uvjetima neki mali broj stanica može proći kroz placentarnu barijeru. Prijelaz stanica je dakako dvosmjernan, tj. fetalne stanice prelaze u majčinu cirkulaciju, ali i majčine stanice mogu prijeći u fetus ( Kirby 1968 ). Među majčanim stanicama mogu se naći i imunokompetentne stanice. I one, iz istih razloga, mogu prijeći u fetalnu cirkulaciju. Ako placenta ne predstavlja neprolaznu barijeru za majčine imunokompetentne stanice, onda se može pretpostaviti da će i strane imunokompetentne stanice, koje se nađu u cirkulaciji majke, moći koristiti isti put. Upravo smo takve uvjete imali u našoj grupi SH, jer smo gravidne ženke Y-59 injicirali Lewisovim splenocitima. Ipak, nismo mogli očekivati da će samo prisustvo tih stanica u cirkulaciji majke biti dovoljno za očitovanje njihovog djelovanja na fetus, odnosno novorođenče, ako je već prolaz stanica u normalnoj trudnoći ograničen. O tome postoje i brojni dokazi iz pokusa u kojima se proučavalo utjecaj prirodno prenesenih majčinih stanica. Billingham i sur. ( 1965 ) smatraju da je broj prenesenih imunokompetentnih

stanica majke u fetus isuviše mali, da bi mogao izazvati mjerljive i trajnije učinke u kasnijem životu. Kad bi se broj prenesenih stanica u fetus, na neki način povećao, mogle bi se očekivati **specifične** preinake imunološkog statusa mlade životinje u kasnijem životu. Takva preinaka imunološke reaktivnosti mladunčeta trebala bi, osim o broju prenijetih stanica, zavisiti i o genetičkim odnosima između njih i novog, mladog domaćina. Uz mali broj prenesenih stanica, ali i jake razlike u antigenima tkivne srodnosti, između stanica i mladunčeta, ne samo da **rebi** trebali očekivati nastanak tolerancije prema antigenima što ih stanice nose, već se može uspostaviti i slabija imunost prema tim antigenima ( Billingham i sur. 1965 ). Međutim, isto tako mali broj prenesenih stanica, ali uz slabe razlike u antigenima tkivne srodnosti, mogao bi izazvati specifičnu toleranciju mladih prema antigenima tih stanica ( Ivanyi i Demant 1965 )

Kada su odnosi u tkivnoj srodnosti, između stanica i domaćina, točno definirani, kao što je u našoj grupi SH, tada je broj prenesenih stanica odlučujući činilac, o kome ovisi tip i stupanj reakcije mladih. Povećanje broja prenesenih stanica može se postići upotrebom različitih sredstava koja povećavaju permeabilnost placente za stanice. Takav učinak ima i hijaluronidaza, koju smo injicirali gravidnim ženkama Y-59 u isto vrijeme kada i Lewisove splenocite. Nathan i sur. ( 1960 ) su pretpostavili da hijaluronidaza omogućuje povećani prijenos majčinih stanica u fetuse kunića, što se mjesec dana nakon okota očituje u toleranciji mladih prema kožnom kalemu majke. Direktni dokaz o povećanju prijenosa majčinih stanica dali su Najarian i

Dixon ( 1963 ). Oni su hijaluronidazom injicirali gravidne ženke kunića i pratili obim prijenosa radioaktivno obilježenih majčinih eritrocita u fetus. Broj prenesenih majčinih eritrocita u cirkulaciju fetusa, u posljednjih 10-14 dana trudnoće, bio je dvostruko veći od broja prenesenih eritrocita u netretiranih gravidnih majki, Tai i Halasz ( 1967 ) uspjeli su inducirati toleranciju u mladunčadi kunića, višekratnim injiciranjem gravidnih ženki hijaluronidazom i subcelularnim antigenima slezene i bubrega nesrodnog davaoca. Stupanj tolerancije na kožni kalem davaoca antigena, ovisio je o injiciranoj dozi.

Broj splenocita koje smo injicirali u gravidne ženke Y-59 (  $134 \times 10^6$  ) uglavnom odgovara broju limfocita koji cirkuliraju u njenoj krvi. Injiciranjem hijaluronidaze omogućili smo da obje vrste stanica iz majčine cirkulacije (Lewisovi splenociti i majčini imunociti) prelaze u većem broju u cirkulacijski sustav fetusa. Odnosi u tkivnoj srodnosti između injiciranih Lewisovih splenocita i primalaca (majke, odnosno fetusa) pokazuju da su razlike u jakim antigenima tkivne srodnosti, tj. na R<sub>H</sub>-1 lokusu vrlo izražene (Štark i Hauptfeld 1969). Obzirom da su majčine stanice genetički identične sa fetalnim (osim razlike na spolnom kromozomu sa stanicama potomaka-mužjaka), može se očekivati mjerljivi učinak samo prenesenih Lewisovih splenocita. Da su Lewisovi splenociti, injicirani u majku, stvarno prešli u organizam mladog i naselili njegov retikuloendotelni sustav, potvrđuju rezultati produženog nošenja Lewisovih kalema presađenih na mlade. Iako je srednje vrijeme odbacivanja (SVO) u ovoj grupi produženo samo za 1,8 dana, ipak je razlika statistički visoko značajna (  $p \leq 0,001$  ). Prema tome, vjerojatno je da je hijaluronidaza omogućila prijenos određenog broja Lewi-

sovih splenocita, koji su se naselili u mladunčadi i doveli do izvjesnog stupnja tolerancije prema presađenim Lewisovim kalemima. Međutim, nijedno mladunče, od <sup>ukupno</sup> 34 kalemljena, nije visoko tolerantno na Lewisov kožni kalem. Broj imunokompetentnih stanica koji je potreban za indukciju tolerancije, funkcija je razlika u tkivnoj srodnosti između davaoca injiciranih stanica i domaćina (McKhann 1964). Stoga bi odsustvo visoko tolerantnih štakora u našoj pokusnoj grupi SH moglo značiti da je broj prenesenih splenocita, unatoč injiciranoj hijaluronidazi, bio ipak nedovoljan za uspostavljanje trajne tolerancije, jer su razlike u antigenima tkivne srodnosti između injiciranih splenocita i domaćina velike (Rt H-1 lokus).

Već smo pretpostavili da se u mladunčad vjerojatno istovremeno prenose i majčine stanice, a među njima mogu biti i imunokompetentne. Kožnim kalemljenjem mladih nismo mogli utvrditi njihovu prisutnost, jer su se našle u genetički identičnoj sredini. No, kako su to zrele stanice, mogle su utjecati na očitovanje učinaka Lewisovih splenocita. Mogle su ojačati "front" imunološki nezrelog fetusa, pa tako umanjiti efikasnost Lewisovih splenocita u indukciji tolerancije. Možda bi Lewisovi splenociti mogli inducirati i bolest kržljanja u ove mladunčadi, da nije bilo i majčinih stanica. Lewisovi splenociti su prethodno neko vrijeme proboravili u cirkulaciji majke, pa su se mogli imunizirati na nje antigene. Kada tako imunizirani splenociti pređu u fetus može se očekivati njihova snažnija reaktivnost, te oštećenje fetusa sa znacima bolesti kržljanja. Možda su baš prenesene majčine stanice stupile u borbu sa Lewisovim splenocitima i pridonijele tome da fetusi nisu pretrpjeli fatalna oštećenja. Ipak, da bi se o svemu tome moglo raspravljati, potrebno je u pokusima na nes-

rodnim štakorima ispitati da li majčine stanice stvarno prelaze u fetus, te da li dolazi do kompeticije između dviju vrsta imunokompetentnih stanica, koje se istovremeno nađu u fetusu.

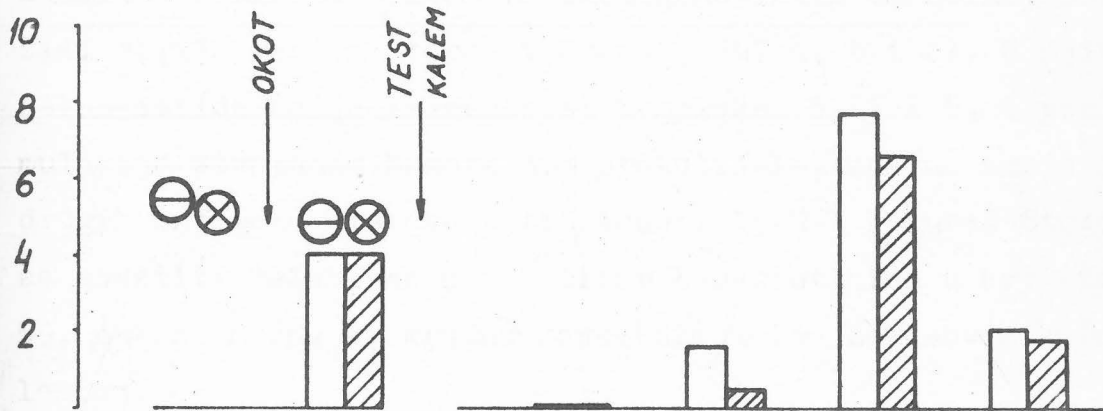
I u drugoj grupi (grupa 3G) mladi štakori Y-59 znatno duže nose Lewisove kaleme, kada se usporede sa štakorima kontrolne grupe K (  $p < 0,001$  ). Razlika u SVO još je izrazitija negoli između grupa K i SH (2,65:1,8 dana). No, i pored toga ne postoji statistički vjerodostojna razlika između pokusnih grupa 3G i SH (  $0,05 < p < 0,1$  ). Ni u ovoj grupi (3G) nema mladih štakora koji su visoko tolerantni na Lewisove kaleme, iako je postotak tolerantnih najviši i iznosi čak 97% kalemljenih. Ovu toleranciju prema Lewisovim kalemima teško je objasniti mehanizmom stečene imunološke tolerancije, jer majke nisu injicirane Lewisovim stanicama, a trokratno kalemljenje je obavljeno prije stavljanja ženki na rasplod. Sličan pokusni model imali smo i u nekim od ranijih radova (Rukavina 1968; Vlahović i Rukavina 1970) na genetički nesrodnim štakorima. Rezultate tih istraživanja diskutirali smo u svjetlu facilitacijske uloge humoralnih protutijela stvorenih u organizmu majke, a prenesenih u fetus, odnosno u novorođenče. Međutim, u tim pokusima nismo određivali intenzitet humoralnog odgovora u organizmu majke, niti smo pratili prijenos humoralnih protutijela u cirkulaciju fetusa, odnosno novorođenčeta, što je od bitne važnosti u objašnjenju facilitacijskog učinka. Stoga smo, u ovim pokusima, dvokratno određivali titar hemaglutinina u serumu senzibiliziranih majki (pri kraju graviditeta i 4-10 dana nakon okota mladih) prema eritrocitima mužjaka Lewis, čijim su kožnim kalemima majke bile senzibilizirane. Ujedno smo određivali i titar hemaglutinina u serumu mladih iz 4 od ukupno 6 legala, žrtvovanjem 2-3 mlada i sakupljanjem njihove krvi. Uzorak seruma mladih uzet

je 4-10 dana nakon okota, tj. u isto vrijeme kada je uzet i drugi uzorak majčine krvi. U serumu smo određivali titar ukupnih hemaglutinina, kao i titar hemaglutinina rezistentnih na merkaptotanol. Ovi potonji su protutijela malene molekularne težine (7S tipa). Prosječan titar ukupnih hemaglutinina u serumu majki pri kraju graviditeta, izražen kao  $\log_2^{-1}$ , iznosi 5,5 (kreće se u rasponu od 3 do 8). Prosječan titar hemaglutinina 7S tipa je 5,3, a raspon mu je također od 3 do 8 (slika 3). Prosječan titar se nije znatnije promijenio ni nakon okota (osim manjih individualnih promjena), jer razina bilo ukupnih, bilo 7S hemaglutinina, iznosi oko 5. U jednom leglu, od 4 ispitana, nismo mogli utvrditi hemaglutinine u serumu. Titar hemaglutinina u serumu njihove majke bio je doduše nešto niži (titar: 4), ali to ne može objasniti odsutnost hemaglutinina u serumu njihove mladunčadi. Serum mladih iz preostala 3 legla pokazivao je hemaglutinacijsku aktivnost, ali je titar hemaglutinina bio nešto niži (prosječno za 1 razrijeđenje), od vrijednosti titra u serumu majki, kojima je istovremeno uzet uzorak krvi. Obradivanje seruma mladih sa merkaptotanolom nije smanjilo titar hemaglutinina, što ukazuje da prenesena protutijela pripadaju isključivo grupi hemaglutinina malene molekularne težine (7S tipa).

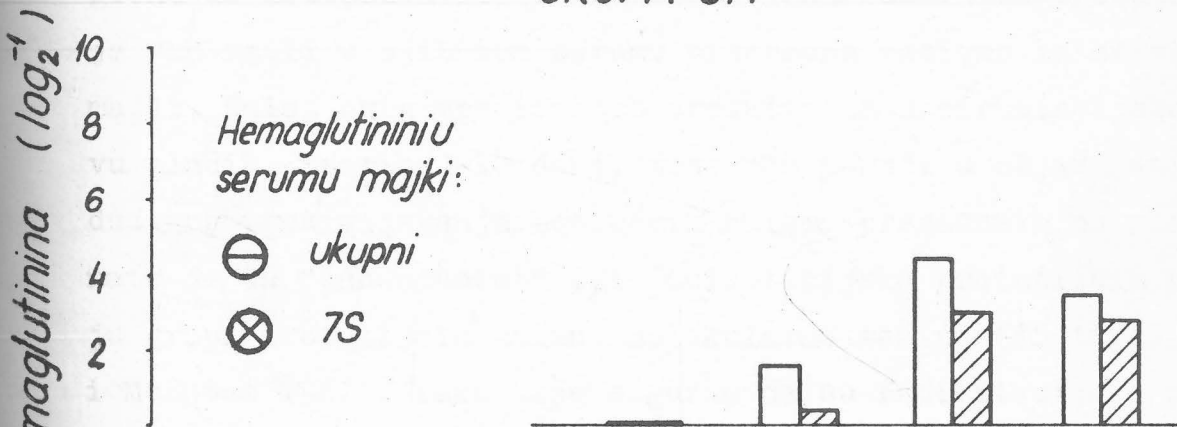
Normalne ženke Y-59 pokazuju snažnu reakciju odbacivanja prema Lewisovim kožnim kalemima (svi presađeni kalemi odbačeni su 8-og dana). To potvrđuje da su razlike u histokompatibilnosti između ova 2 soja (razlike na Rt H-1 lokusu) vrlo jake. Glavne razlike odnose se na Lewisove antigene specifičnosti 5, 7 i 8, koje induciraju snažnu reakciju odbacivanja (Štark i Kren 1967c). Međutim, humoralni odgovor ne ide paralelno sa intenzitetom stanične imunosti, jer je titar hemaglutinina trokratno kalemljenih gra-

# Hemaglutinini u serumu štakora Y-59 na eritrocite štakora soja Lewis

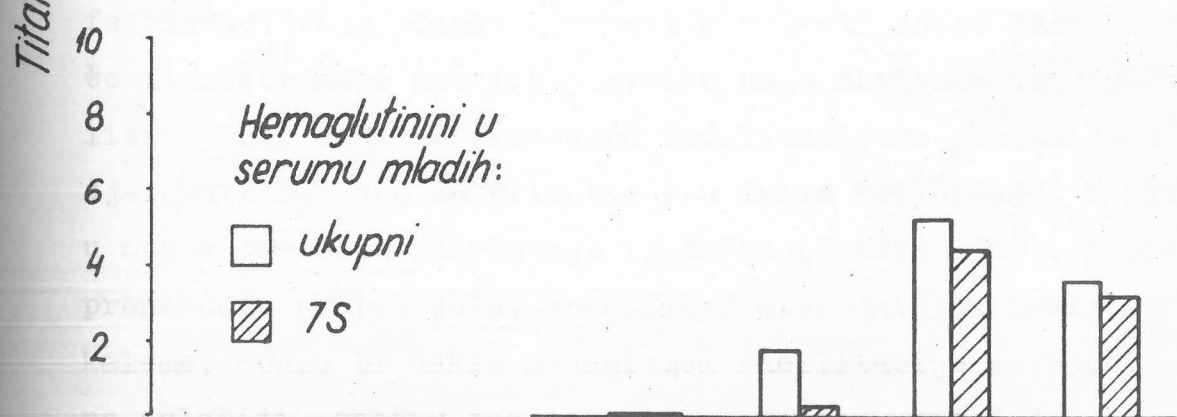
GRUPA "3G"



GRUPA "SH"



GRUPA "K"



S<sub>0</sub> (0)    S<sub>1</sub> (7)    S<sub>2</sub> (11)    S<sub>3</sub> (21)

Dani nakon test - kalema

vidnih ženki, kožom mužjaka Lewis, relativno nizak (prosječan titar je 5,5). Za objašnjenje ove neskladnosti između humoralne i stanične imunosti u ovakvim imunogenetičkim odnosima, može poslužiti serija radova Štarka i Krena (1967 a, b i c). U njima se posebno ističe da je imunogenost kompleksa 5, 7 i 8, u pogledu stimulacije stvaranja humoralnih protutijela, znatno manja negoli u drugih antigena histokompatibilnosti Rt H-1 lokusa. Stoga se može shvatiti relativno nizak titar hemaglutinina u krvi ženki Y-59, nakon snažne trokratne senzibilizacije Lewisovim kožnim kalemima.

Kako mladunčad ovih majki nije bila aktivno imunizirana, logično je pretpostaviti da su specifična humoralna protutijela koja smo našli u njihovom serumu prenesena pasivno iz organizma majki. Nalaz ovih specifičnih protutijela u cirkulacijskom sustavu mladih, starih 4-10 dana, može nam pomoći u objašnjenju produženog preživljavanja Lewisovih kalema presađenih na mlade. Poznato je da "enhancement" ili facilitacijska protutijela pripadaju grupi protutijela malene molekularne težine (7S tipa) (Tokuda i McEntee 1967). Iako nije sigurno da su facilitacijska protutijela vezana za hemaglutinacijsku aktivnost seruma, ipak ima radova koji ukazuju i na tu mogućnost (Kaliss 1958). Nadalje, u prilog facilitacijskog učinka govore i rezultati da se facilitacija lakše i uniformnije postiže pasivnom nego aktivnom imunizacijom (Kaliss 1962). Pasivno prenesena facilitacijska protutijela mogu djelovati čak ako su prisutna i u malim količinama, a aktivnost u novom domaćinu zadržavaju tjednima (Voisin 1962). Djelovanje prenesenih protutijela, specifično stvorenih na Lewisove kožne kaleme, moglo bi dakle mehanizmom facilitacije spriječiti, odnosno oslabiti, snažnu reakciju odbacivanja, unatoč jakih razlika u



histokompatibilnosti između primaoca i davaoca. Relativno uniformno produženje preživljavanja Lewisovih kalema presađenih na mlade Y-59, u pokusnoj grupi 3G, podržava ovu našu pretpostavku. Vjerojatno je da se ova protutijela stalno "dodaju" u cirkulacijski sustav mladunčeta i nakon poroda, jer je sluznica probavnog trakta mladog štakora propusna za protutijela koja dolaze majčinim mlijekom, sve do otprilike 21-og dana života (Halliday 1955a). Upravo ova okolnost omogućuje u nekih životinjskih vrsta, koje imaju hemohorijalnu placentu, efikasniju zaštitu novorođenčeta protiv invazivnih agensa. U njima je postnatalni prijenos majčinih protutijela čak i obimniji od prenatalnog (Šterzl i Silverstein 1967). Može se pretpostaviti da bi postnatalni prijenos bio od posebne važnosti i onda kada je razina majčinih humoralnih protutijela, u serumu, niska. Testiranje mladih Lewisovim kalemima vršili smo 25-30 dana nakon okota, što je relativno kratko vremensko razdoblje (prosječno oko 1 tjedan) od prestanka prijenosa protutijela, pa to vjerojatno osigurava povoljnu razinu facilitacijskih protutijela i očitovanje njihovog učinka. Serum uzet od nekoliko mladih na dan ušivanja Lewisovog kalema kože, nije sadržavao hemaglutinine. No i pored toga, kalemi presađeni na mladunčad ove grupe bili su facilitirani. To se slaže sa opažanjem Kaliss-a i sur. (1963) da i tumori koji se presađuju na mladunčad senzibiliziranih majki, u ovoj životnoj dobi, mogu biti facilitirani bez obzira da li su u serumu mladih hemaglutinini prisutni ili odsutni.

Od posebnog je interesa opisati nalaz u mladunčadi iz jednog legla, čija je majka uginula prilikom vađenja uzorka krvi, kada su mladi bili stari 2 dana. Mladi su prebačeni drugoj netretiranoj ženki Y-59, koja je također bila u ranom postpartalnom raz-

doblju, te je ovu mladunčad "prihvatila". Kada su mladi bili stari 10-12 dana, nismo mogli u njihovom serumu utvrditi prisutnost hemaglutinina. Treba istaći da je titar hemaglutinina u serumu njihove majke, drugi dan nakon okota mladih, bio vrlo nizak (titar 3). Kada smo 8 mladih iz ovog legla kalemili kožom mužjaka Lewis, utvrdili smo snažnu reakciju odbacivanja, jer su svi kalemi odbačeni 8-og dana. Intenzitet ove reakcije otprilike je na razini odbacivanja Lewisovog kalema presađenog na mlade štakore Y-59 u kontrolnoj grupi. Obzirom na malen broj opažanja, teško je isključivo tvrditi da je spriječeni postnatalni prijenos protutijela (mladi "usvojeni" od druge majke) uzrok izostanku facilitacije, iako se i na to može misliti. Treba pri tome uzeti u obzir i vrlo nizak titar specifičnih hemaglutinina u serumu njihove majke, prije nego je uginula, što je također moglo dodatno utjecati na brzo "iščezavanje" hemaglutinina iz cirkulacije mladih i na "normaliziranje" njihove reaktivnosti prema presađenim Lewisovim kalemima.

Pratili smo i dinamiku aktivne produkcije hemaglutinina u krvi mladih štakora Y-59 iz grupa K, SH i 3G, koji su kalemljeni kožnim kalemima štakora Lewis. Određivali smo razinu ukupnih i merkaptotanol rezistentnih hemaglutinina 7-og, 11-og i 21-og dana nakon kalemljenja (slika 3). Hemaglutinine možemo utvrditi već 7-og dana nakon kalemljenja, iako je njihov titar u svim grupama vrlo nizak (prosječan titar oko 2). Mnogi od mladih, u to vrijeme, još uvijek nemaju hemaglutinine u serumu, a maksimalni pojedinačni odgovor ne prelazi vrijednost titra 4. Interesantno je istaknuti da se gotovo isključivo radi o hemaglutininima velike molekularne težine (19S tipa), jer obrada seruma sa merkaptotanolom gotovo je potpuno eliminirala svaku hemaglutinacijsku aktivnost.

Prema tome, u prvoj fazi humoralnog odgovora ne postoje uočljivi-je razlike između grupa. Međutim, razlike u jačini hemaglutinacijskog odgovora očituju se već u serumu uzetom 11-og dana nakon kalemljenja mladih. Razina hemaglutinina u krvi viša je u svim grupama, ako je uporedimo sa serumima 7-og dana, pri čemu se posebno ističe nagli porast 7S hemaglutinina. Najviši titar ukupnih i 7S hemaglutinina nalazimo u grupi 3G, a najniži u grupi SH. Dvadesetprvog dananakon kalemljenja dolazi do izrazitog pada razine hemaglutinina u grupi 3G, dok je pad hemaglutinina u grupama K i SH neznatan, a titar ima otprilike jednake vrijednosti u ovim grupama. (oko 4). I 21-og dana u serumu životinja iz svih grupa dominiraju merkaptoetanol rezistentni hemaglutinini, na koje otpada gotovo sva hemaglutinacijska aktivnost.

U diskusiji ovih rezultata treba se, između ostalog, osvrnuti na nalaz da protutijela 19S tipa prethode produkciji 7S protutijela. Slične rezultate dobili su i Anderson i sur. (1967) u pokusima na genetički čistim sojevima miševa. Kren i sur. (1968) su također potvrdili, na genetički čistim sojevima štakora, postepenu produkciju hemaglutinina, za koju je karakteristično rano pojavljivanje 19S protutijela i kasnija izrazita dominacija 7S protutijela. Pokuse su izvodili na štakorima soja Lewis, koje su imunizirali sa kožnim kalemom štakora 9 genetički čistih sojeva, koji su nosioci različitih alela u Rt H-1 sistemu. Hemaglutinine su mogli utvrditi između 8-og i 10-og dana, kada su uzimali prvi uzorak seruma, a maksimalni odgovor štakori dosegnu između 10 i 15 dana, a tada se gotovo sva hemaglutinacijska aktivnost nalazi u području 7S hemaglutinina. Dvadesetog dana nastupa lagani pad razine hemaglutinina. Nadalje, različite alele Rt H-1 sistema pokazuju različitu imunogenost, što se očituje na razini titra hemaglutinina i brzini nji-

hovo pojavljivanja u serumu. Možda je interesantno napomenuti da kožni kalem štakora soja CAP ( isti alel kao Y-59 ), presađen na štakore Lewisovog soja, izaziva najslabiju produkciju hemaglutinina. I dinamika produkcije hemaglutinina u našoj kontrolnoj grupi K, u skladu je sa diskutiranim radovima. Naime, u prvoj fazi humoralnog odgovora ( serum 7-og dana ), gotovo su isključivo prisutni 19S hemaglutinini, a njihov titar je nizak ( vjerovatno zato, što je rano uzet uzorak krvi ). To potvrđuje i porast titra 11-og dana, a tada, isto kao i 21-og dana, prevladavaju 7S protutijela. I u grupi SH je vrlo slična slika dinamike hemaglutinina, kao u kontrolnih životinja. Međutim, u pokusnoj grupi 3G nalazimo znatno odstupanje u produkciji hemaglutinina, jer je njihova razina 11-og dana znatno viša, a 21-og dana znatno niža, negoli u drugim grupama. U objašnjenju naglog porasta produkcije hemaglutinina u serumu 11-og dana, koja je gotovo dvostruko viša negoli u drugim grupama, može nam pomoći prethodno opisani nalaz pasivno prenesenih majčinih protutijela u mladunčadi. Ta protutijela smo našli u serumu uzetom 4-10 dana nakon koda, ali ih nismo mogli otkriti u serumima na dan kalemjenja. Činjenica da ih nismo našli u tome serumu još uvijek ne mora značiti da nisu ni zastupljena. Ta su protutijela mogla biti prisutna u malim količinama, a tada je naša metoda hemaglutinacije, vjerovatno nedovoljno osjetljiva. Kada se iz presađenog kožnog kalema "oslobode" velike količine antigena, dolazi do njihovog spajanja sa ovim protutijelima. Međutim, sve količine antigena nebi mogle biti vezane, jer je nedovoljna količina protutijela, pa bi dio antigena ostao u "suvišku". Poznato je da

injiciranje kompleksa protutijelo-antigen, sa suviškom antigena, uzrokuje pojačani i brži imuni odgovor na antigen, negoli kada se injicira antigen sam ( Terres i Wolins 1961; Stoner i Terres 1960; Terres i Stoner 1962 ). Pad hemaglutinina u serumu 21-og dana u grupi 3G mnogo je izrazitiji, negoli u preostalim grupama. Može se pretpostaviti da je tome pridonijela i nagla produkcija hemaglutinina u početnoj fazi, pa je njihova visoka razina mogla inhibicijski djelovati, mehanizmom povratne sprege, na daljnju produkciju.

## 5.2. UTJECAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA SENZIBILIZACIJE MAJKI NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI

Rezultati opisanih pokusa na visokosrodnim štakorima u grupi 3G ( vidi 5.1. ) pokazali su da se može preinačiti imunološka reaktivnost mladih, kada se majka senzibilizira alogenim tkivom. U pokusima koji se opisuju u ovom poglavlju, htjeli smo se orjentirati i o utjecaju raznovrsnih postupaka senzibilizacije majki, na reaktivnost mladih prema istoj vrsti alogenog stimulusa. Moglo se pretpostaviti da će mijenjanje postupaka, kao i jačine senzibilizacije, dovesti do drugačije reaktivnosti mladih. Osim toga, trebalo bi utvrditi dali je tkivo kojim je dosada otavljana senzibilizacija majki, tj. kožni kalem, odlučno za manifestaciju specifično promijenjene reaktivnosti mladih, ili i druga tkiva, u tom pogledu, imaju ista svojstva. Duže preživljavanje alokalema, presađenih na mlade senzibiliziranih majki, prije bi se moglo očekivati u grupama u kojima su majke višekratno imunizirane. U serumu snažno senzibiliziranih životinja obično se dobije visoka razina 7S protutijela, a među ovim protutijelima se nalaze i facilitacijska ( Walker i Siskind 1968 ). Tome u prilog govore i rezultati Cohen-a i sur. ( 1971 ) koji su štakore deset~~erokratno~~erokratno kalemili kožnim kalemima, a prijenosom njihovog ( hiperimunog ) seruma, u normalne životinje, uspjeli su znatno produžiti život specifičnog kožnog kalema. Već izneseni rezultati u grupi 3G ( vidi 5.1. ) pokazali su da je i trokratno kalemljenje, u tom smislu, vrlo efikasno u našem eksperimentalnom modelu. Stoga je i u pokusima koji se opisuju u ovom

poglavljju, trokratno kalemljenje kožom maksimalni intenzitet alogenog stimulusa, kojim smo senzibilizirali ženke.

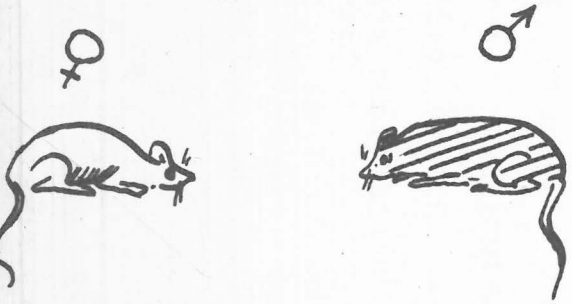
Pokuse smo izvodili na genetički nesrodnoj populaciji štakora ("Y"), da bismo izbjegli ujednačene odnose u tkivnoj srodnosti i tako omogućili senzibilizaciju ženki tkivima mužjaka, oca mladunčadi. Poznato je iz kliničke medicine, da senzibilizacija majke očevim antigenima, koje je fetus naslijedio, može dovesti do teških oštećenja mladunčeta. Iako se takva oštećenja ne mogu utvrditi u genetičkoj nesrodnoj populaciji štakora, i-pak se mogu pretpostaviti kada se ženke snažno senzibiliziraju tkivima oca mladunčadi. Stoga je u ovim pokusima trebalo voditi računa i o ovoj činjenici. U pokuse smo uzimali mužjake i ženke, stare oko 3 mjeseca, i od njih složili roditeljske parove. Radili smo sa 5 pokusnih grupa i 1 kontrolnom. Slike 4 i 5 prikazuju plan pokusa u svih 6 grupa.

#### 5.2.1. POKUSNE GRUPE

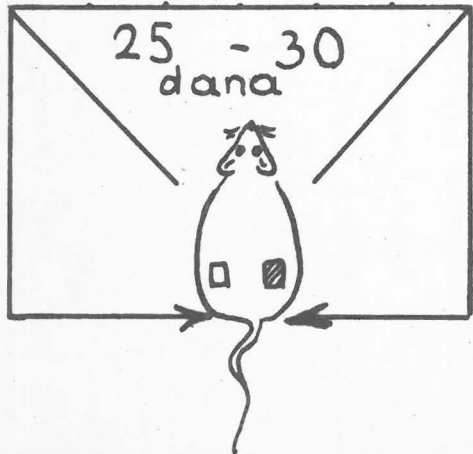
Grupa A daje nam uvid u normalno vrijeme odbacivanja roditeljskih kalema presađenih na njihove mlade. U ovoj grupi majke nisu bile prethodno senzibilizirane, pa nam služi kao opća kontrola i za ostale pokuse na genetički nesrodnim štakorima, koje ćemo opisati u drugim dijelovima disertacije. Ženke i mužjake, buduće roditeljske parove, stavljali smo na rasplod u odvojene kaveze. Njihove mlade, stare 25-30 dana, kalemili smo kožnim kalemima obaju roditelja ( slika 4 ).

Slika 4 Plan pokusa za grupe A, A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>

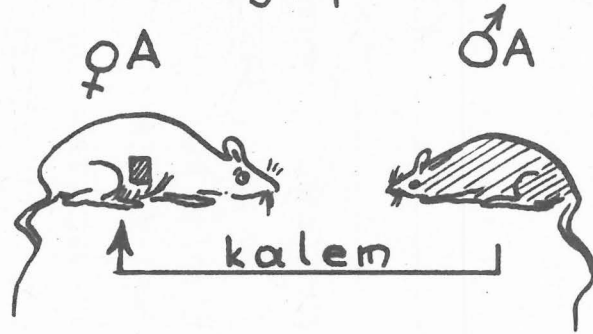
grupa A



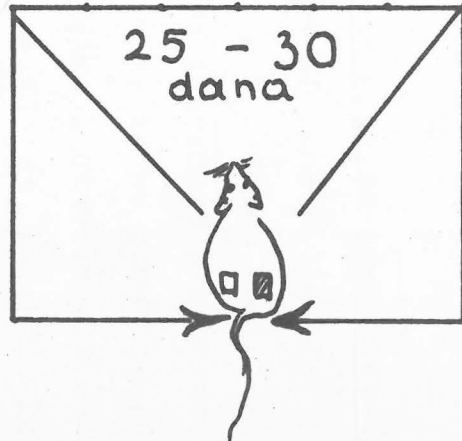
rasplod  
↓  
okot



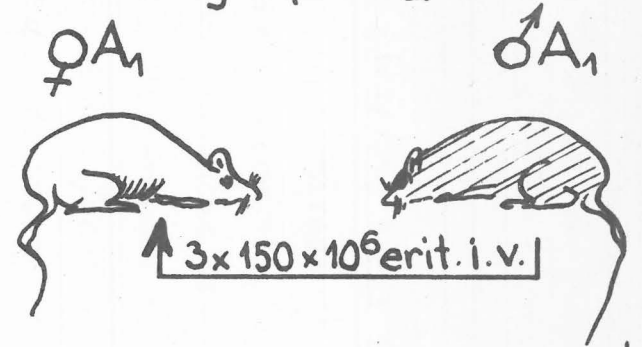
grupa A<sub>1</sub>



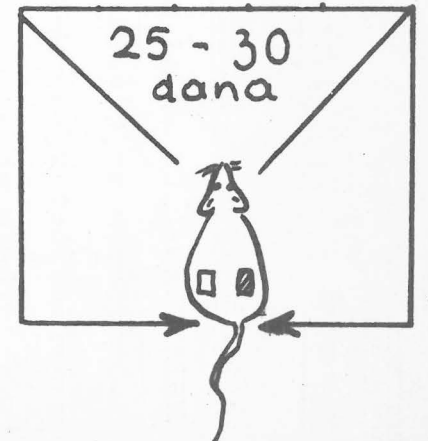
rasplod  
↓  
okot



grupa A<sub>2</sub>



rasplod  
↓  
okot



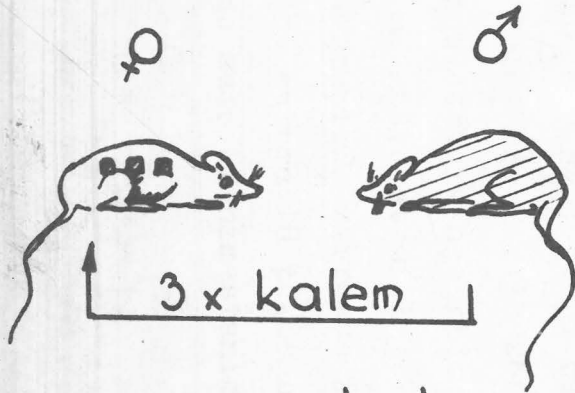


Od dijela ženki iz grupe A, nakon što su njihovi mladi kalemljeni, formirana je grupa  $A_1$  ( Slika 4 ). Te su ženke kalemljene kožom oca mladih i ponovno sa njim stavljene u rasplod. Njihovu mladunčad testirali smo zatim kožom obaju roditelja. Roditeljski partneri iz grupe  $A_1$ , nakon kalemljenja mladih, uzeti su dalje u pokus i čine grupu  $A_2$  ( slika 4 ). Ženke su u toj grupi još trokratno intravenski injicirane suspenzijom krvnih stanica mužjaka. Suspenzija je sadržavala 150 milijuna eritrocita i uz njih pripadajući broj ostalih krvnih stanica. Zatim smo roditeljske parove stavljali u rasplod, a njihove mlade testirali kožnim kalemima.

Na Slici 5 prikazali smo plan pokusa koji se odnosi na grupe B,  $B_1$  i E. U grupi B ženke su trokratno senzibilizirane kožom mužjaka, a potom su s njim stavljane u rasplod. Senzibilizacija je obavljena u razdoblju od 3 do 4 tjedna. Mladunčad je kalemljena kožom obaju roditelja. Zatim su ženke ponovno, po četvrti put kalemljene kožom istog mužjaka i stavljane s njim u rasplod. Tako je načinjena grupa  $B_1$ . Mlade smo kalemili kožom obaju roditelja. Plan senzibilizacije ženki u grupi E utoliko se razlikuje od postupka primjenjenog u grupama B i  $B_1$ , što <sup>kao</sup> materijal za senzibilizaciju nije služio kožni kalem, već suspenzija krvnih stanica mužjaka. Suspenzija je sadržavala 150 milijuna eritrocita i uz <sup>njega</sup> pripadajući broj ostalih krvnih stanica, a ženkama je injicirana trokratno intravenski. Nakon toga su roditeljski parovi stavljani u rasplod, a mladi kalemljeni samo kožom oca, davaoca stanica za senzibilizaciju majki.

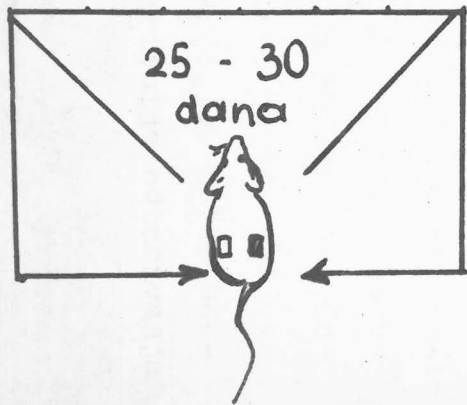
# Slika 5 Plan senzibilizacije ženki u grupama B, B<sub>1</sub> i E

grupa B

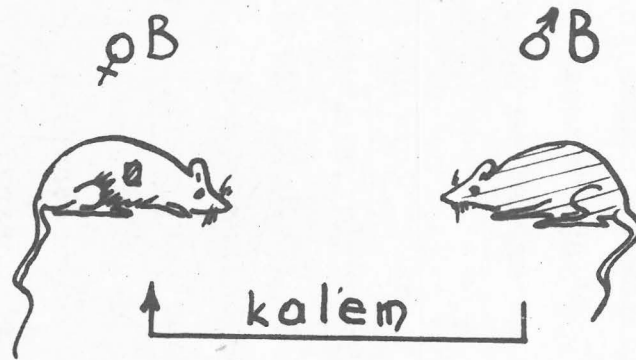


rasplod

okot

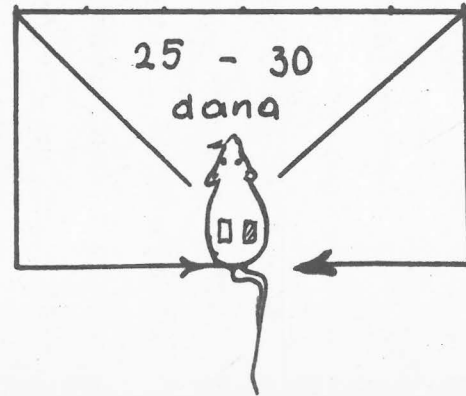


grupa B<sub>1</sub>

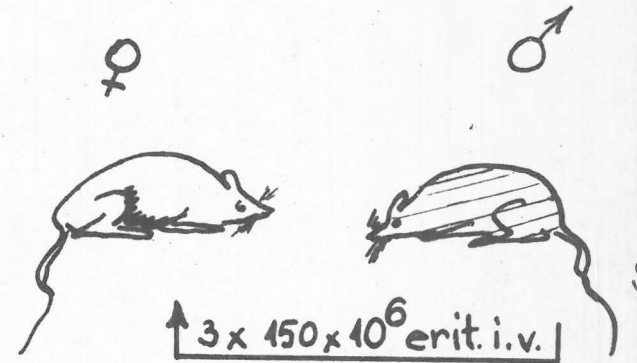


rasplod

okot

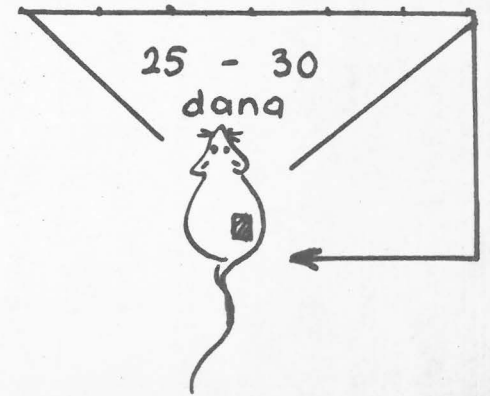


grupa E



rasplod

okot



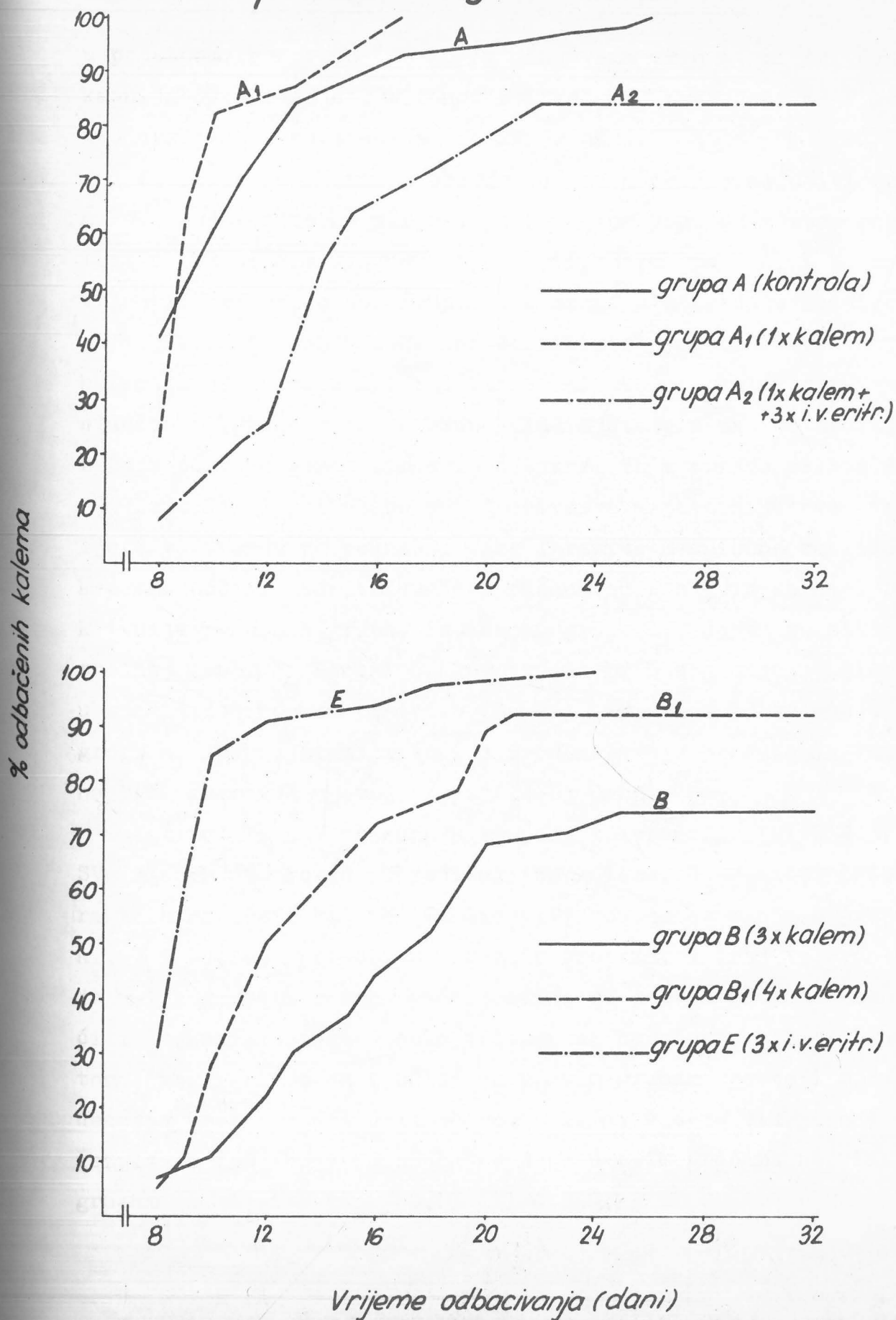
### 5.2.2. PREŽIVLJAVANJE RODITELJSKIH KALEMA

Na slikama 6 i 7 prikazana je dinamika odbacivanja roditeljskih kalema presađenih na mladunčad iz ovih grupa. Na apscisi su naneseni dani odbacivanja, a na ordinati akumulirani postoci. Akumulirani postoci označavaju postotak štakora koji su do nekog dana odbacili kalem, u odnosu na ukupan broj kalemljenih. Prikazano je vrijeme odbacivanja samo u prvih 30 dana, a kalemi koji su preživjeli duže od ovog vremena praćeni su 60 dana nakon presađivanja. Svi kalemi su bili prihvaćeni i kroz to duže razdoblje promatranja.

Na slici 6a prikazane su krivulje odbacivanja očevih kalema u kontrolnoj grupi A i pokusnim grupama  $A_1$  i  $A_2$ . Krivulja koja prikazuje odbacivanje u grupi  $A_1$  smještena je, u većem dijelu vremena odbacivanja, blizu krivulje za grupu A. Krivulja odbacivanja za grupu  $A_2$  dosta se razlikuje od opisanih krivulja za grupe A i  $A_1$ , jer je znatno usporen proces odbacivanja u ovoj grupi. Tako je osmog dana odbaćeno najmanje očevih kalema (8%), a odbacivanje završava 22-og dana. Toga dana je 16% kalema još uvijek trajno prihvaćeno.

Na slici 6b prikazano je odbacivanje očevih kalema u grupama B,  $B_1$  i E. Odbacivanje u grupi B je izrazito usporeno i to ne samo prema kontrolnoj grupi, već i prema ostalim pokusnim grupama. Odbacivanje u ovoj grupi završava 25-og dana, a tada je odbaćeno 74% kalema. Preostalih 26% kalema trajno je prihvaćeno. Slično, usporeno odbacivanje vidimo i u grupi  $B_1$ , iako krivulja odbacivanja ima nešto strmiji tok negoli krivulja za grupu B. Odbacivanje u grupi  $B_1$  završava 21-og dana, a tada je još uvijek prihvaćeno 8% kalema. U pokusnoj grupi E, u kojoj su majke senzibilizirane samo krvnim stanicama mužjaka, krivulja odbacivanja

# Dinamika odbacivanja očevog kožnog kalema presadenog na mlade "Y"



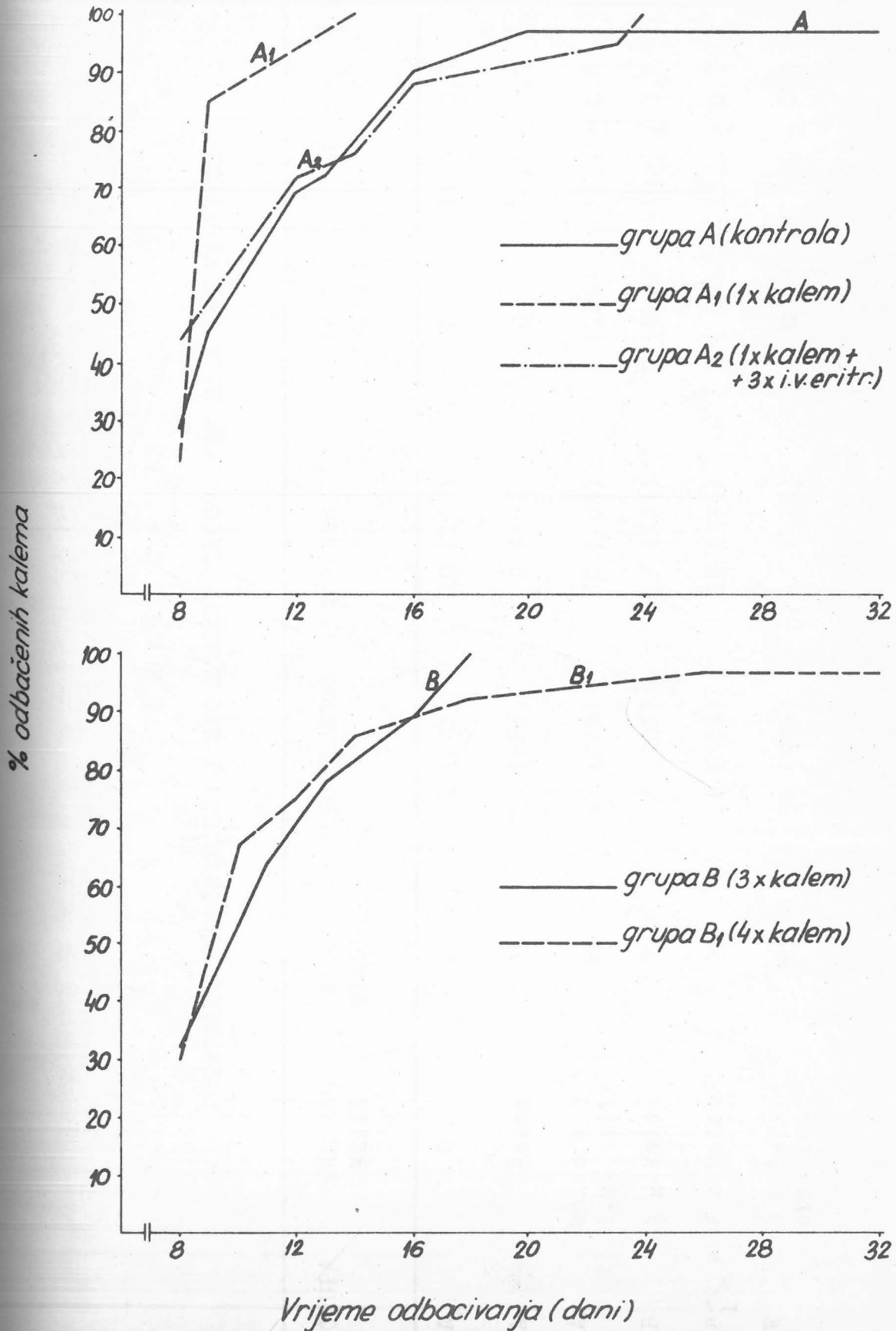
u početnom razdoblju (do 10-og dana) ima vrlo strmi tok, ali je kasnije odbacivanje usporeno. Svi kalemi, presađeni na mladunčad ove grupe, odbačeni su do 24-og dana.

Iz opisa odbacivanja očevog kalema možemo zaključiti da su neke grupe međusobno slične, pa ih u tom pogledu možemo podijeliti u dva dijela. Jednom dijelu pripadaju grupe  $A_1$  i E, koje su vrlo slične kontrolnoj grupi A. U drugi dio spadaju mladi čije su majke prethodno višekratno senzibilizirane bilo višekratnim kalemljenjem (grupe B i  $B_1$ ) ili jednim kožnim kalemom i krvnim stanicama (grupa  $A_2$ ). Te grupe mladih štakora znatno sporije odbacuju očeve kaleme, a mnogi pojedinci ih i trajno prihvaćaju.

Na slici 7 prikazano je odbacivanje majčinih kalema. Krivulje odbacivanja ne pokazuju tako izrazite međusobne razlike, kakve smo uočili među krivuljama odbacivanja očevih kalema. Sve krivulje pokusnih grupa, izuzev za grupu  $A_1$ , dosta su slične kontrolnoj grupi A. Poneki štakor trajno prihvaća majčin kalem, ali u zanemarivo niskom postotku (do 3%). Krivulja odbacivanja u grupi  $A_1$  ima najstrmiji tok, a i odbacivanje presađenih kalema najbrže završava u ovoj grupi (14-og dana).

Tablice IV i V prikazuju stupanj tolerancije (vidi 4.3.) i SVO mladih na presađene roditeljske kaleme. Učestalost netolerantnih na očeve kaleme (Tablica IV) znatno je manja u grupama  $A_2$ , B i  $B_1$ , u usporedbi sa ostalim grupama, a broj tolerantnih je u tim grupama znatno veći. Jedino se u ovim grupama mogu naći i štakori koji su visoko tolerantni na očeve kaleme. Prema tome, mogli bismo zaključiti da u ovim grupama postoji opća tendencija produženja života očevog kalema, što je vidljivo i iz rezultata SVO, koje je značajno duže u ovim grupama negoli u grupama A,  $A_1$  i E ( $p < 0,01$  ili  $0,02$ ).

# Dinamika odbacivanja majčinog kožnog kalema presadenog na mladunčad "Y"



T A B L I C A IV

UČESTALOST TOLERANCIJE I SVO MLADIH ŠTAKORA "Y" NA KOŽNI KALEM OCA

GRUPA	TRETMAN MAJKI	BROJ MLADIH	NETOLERANTNI	TOLERANTNI	VISOKO TOLERANTNI	SVO X ± SP <sup>x</sup>	p
A	0	61	51 (84%)	10 (16%)	0	11,0 ± 0,5	A <sub>2</sub> : A < 0,02
A <sub>1</sub>	kalem	17	15 (88%)	2 (12%)	0	10,1 ± 0,7	A <sub>2</sub> : A <sub>1</sub> < 0,01 A <sub>2</sub> : E < 0,01
A <sub>2</sub>	kalem + 3 x i.v. eritr.	25	11 (44%)	10 (40%)	4 (16%)	13,3 ± 0,8	B: A < 0,01 B: A <sub>1</sub> < 0,01
B	3 x kalem	27	8 (30%)	12 (44%)	7 (26%)	15,5 ± 0,9	B: E < 0,01
B <sub>1</sub>	4 x kalem	36	20 (55%)	13 (37%)	3 (8%)	13,3 ± 0,7	B <sub>1</sub> : A < 0,01
E	3 x i.v. eritroc.	55	51 (93%)	4 (7%)	0	9,8 ± 0,3	B <sub>1</sub> : A <sub>1</sub> < 0,01 B <sub>1</sub> : E < 0,01

x = standardna pogreška aritmetičke sredine

Na Tablici V prikazan je stupanj tolerancije i SVO mladih na majčine kaleme. Već smo u opisu krivulja odbacivanja (slika 7) naglasili da nema većih razlika u odbacivanju majčinih kalema. To potvrđuju i rezultati tolerancije i SVO koji su prikazani na Tablici V. Razlike, dakako, proizlaze samo iz usporedbe preživljavanja očevih i majčinih kalema u grupama  $A_2$ , B i  $B_1$ . SVO očevih kalema značajno je duže u ovim grupama, što je na Tablici V i prikazano.

### 5.2.3. DISKUSIJA

U objašnjenju ovih rezultata treba posebno voditi računa o mogućem djelovanju slijedećih činilaca: a) tkivu kojim je vršena senzibilizacija, b) jačini senzibilizacije i c) specifičnim odnosima između majke i djeteta u perinatalnom razdoblju, što također može imati odraza na preživljavanje roditeljskih kalema presađenih na mladunčad. U opisanim pokusima primijetili smo produženje života samo za očeve kaleme, dok su navedeni postupci senzibilizacije uglavnom bili bez učinka na preživljavanje majčinih kalema. Očevi kalemi preživljavaju duže na mladunčadi grupa  $A_2$ , B i  $B_1$ . Zajednička karakteristika ovih grupa je višekratna senzibilizacija majki: višekratno kalemljenje kožom mužjaka (grupe B i  $B_1$ ) ili jednokratno kalemljenje uz dodatno trokratno injiciranje krvnih stanica mužjaka (grupa  $A_2$ ). Ove pokusne grupe, po načinu senzibilizacije, podsjećaju na grupu 3G iz pokusa na visokosrodnim štakorima (vidi 5.1.). Prema tome, rezultati ovih pokusa, kao i pokusa na visokosrodnim štakorima, ukazuju da je moguće ponovljenom senzibilizacijom majke produžiti život istovrsnih kalema presađenih na mlade.



T A B L I C A V

UČESTALOST TOLERANCIJE I SVO MLADIH ŠTAKORA "Y" NA KOŽNI KALEM MAJKE

GRUPA	TRETMAN MAJKI	BROJ MLADIH	NETOLERANTNI	TOLERANTNI	VISOKO TOLERANTNI	SVO $X \pm SP^x$	p
A	<u>e</u>	62	45 (72%)	16 (26%)	1 ( 2%)	11,3±0,5	$A_2(\text{otac}) : A_2(\text{majka})$ / 0,05
A <sub>1</sub>	kalem	17	15 (88%)	2 (12%)	0	9,7±0,4	B (otac) : B(majka) / 0,01
A <sub>2</sub>	kalem + 3x i.v. eritr.	25	18 (72%)	7 (28%)	0	11,4±1,0	B <sub>1</sub> (otac):B <sub>1</sub> (majka) / 0,01
B	3 x kalem	28	22 (78%)	6 (22%)	0	11,2±0,6	
B <sub>1</sub>	4 x kalem	36	30 (83%)	5 (14%)	1 ( 3%)	10,7±0,7	

x = standardna pogreška aritmetičke sredine

Sličan eksperimentalni model, kao što je naš u pokusnoj grupi B, imao je i Stastny (1963, 1965), ali je on treći senzibilizirajući kalem ušivao na gravidnu majku 4-10 dana prije okota mladih. Mladunčad ovih majki ubrzano je odbacivala isti kalem, što Stastny smatra aktivnom reakcijom mladunčeta, a ne prijenosom imunosti iz majke. Naime, i mladunčad majki, koje su tolerantne na senzibilizirajuće kaleme, također pokazuje reakciju ubrzanog odbacivanja. Stastny (1965) pretpostavlja da transplantacijski antigeni, koji se oslobode iz kalema presađenog na majku, mogu proći placentarnu barijeru i ući u cirkulaciju mladih, te ih imunizirati. Da mladunče može biti aktivno imunizirano potvrđuju i rezultati drugih istraživača (Howard i Michie 1962; Billingham i sur. 1965).

Ubrzano odbacivanje alokalemâ, presađenih na mladunčad senzibiliziranih majki, primijetili su i Halasz i Orloff (1963), u pokusima na kunićima. Interesantno je da dvokratno kalemljenje gravidnih ženki, u poređenju sa jednokratnim, izaziva snažniju reakciju odbacivanja alokalema od istog davaoca, presađenog na mlade. Halasz i Orloff (idem) tumače ove rezultate prijenosom sesilnih protutijela iz cirkulacije majke u fetus. Za njih placentarna barijera nebi pretstavljala takvu barijeru, kao za limfocite. Učinak prenesenih protutijela je specifičan, jer se ubrzano odbacuju samo kalemi od davaoca kojim je i majka senzibilizirana.

Na mogućnost prijenosa imunosti odgođenog tipa, iz majke u mladunče, bez stvarnog prijenosa imunskih stanica, ukazuju i neki rezultati pokusa u "milipore" komoricama. Tako životinja može odbaciti alokalem prema kojem je tolerantna, ako joj se implantira "milipore" komorica u kojoj se nalaze specifično senzibilizirana.

rani limfociti (Najarian i Feldman 1962; Kretschmer i Perez-Tamayo 1961 i 1962). Kako stanice ne mogu proći kroz stjenke komorice, to ovaj učinak treba pripisati humoralnim faktorima. Od interesa je istaći da i sama placentarna membrana hemohorijalnog tipa podsjeća u određenom smislu na "milipore" komoricu, jer je prelaz staničnih protutijela znatno otežan.

Rezultati navedenih pokusa su samo na prvi pogled u suprotnosti sa našim rezultatima. Naime, plan pokusa se u oba slučaja možda i bitno razlikuje u odnosu na naše pokusne grupe, posebno grupu B. Stastny (1965) je dodatno kalemio ženke tokom trudnoće, a Halasz i Orloff (1963) su isključivo kalemili gravidne ženke. U prilog naših rezultata govori nalaz Gorer-a (citiran prema Voisin-u, 1962). Gorer je također primjetio da se prethodnim kalemljenjem ženki miša, alogenim kalemom kože, osigurava dulje preživljavanje istog kalema presađenog na njenu mladunčad. Voisin (1962) smatra da se ovaj nalaz Gorera može objasniti jedino prijenosom facilitacijskih protutijela iz majke, koja "kondicioniraju" mladunče za duže nošenje specifičnog kožnog kalema. Ovakovo mišljenje podupiru i rezultati naših pokusa na genetički čistim sojevima štakora (vidi 5.1.), a neki od mehanizama kojim se može ostvariti ovakav učinak, diskutirani su u tom dijelu radnje. Za daljnju potvrdu ovog mišljenja mogu poslužiti i rezultati produženog preživljavanja očevih kalema, dobiveni u našoj grupi B<sub>1</sub>, u kojoj su ženke iz grupe B dodatno (po četvrti put) kalemljene kožom mužjaka. Slične rezultate imamo i u pokusnoj grupi A<sub>2</sub>. Od interesa je još jednom istaknuti cijeli eksperimentalni postupak sa ovim ženkama (slika 4). Iz slike se vidi da je to ženkama iz grupe A<sub>2</sub> treći okot, a senzibilizacija ženki je bila kombinirana, tj. kožom i krvnim stanicama mužjaka. Njihova

mladunčad znatno duže nosi očeve kaleme, a četiri kalema su i trajno prihvaćena (Tablica IV). Rezultati u ovoj grupi na razini su opažanja u grupama B i B<sub>1</sub>. Da bismo utvrdili da li se ovo produženje nošenja očevog kalema može pripisati djelovanju: a) kožnog kalema, b) trokrotnog injiciranja suspenzije krvnih stanica, ili c) zajedničkom učinku obaju postupaka senzibilizacije, injicirali smo trokrotno intravenski krvne stanice mužjaka u normalne ženke (grupa E). Ima podataka da prethodno tretiranje primarca s punom krvlju davaoca, može dovesti do facilitacije naknadno ušivenog kalema davaoca (Eberhardt i Vlahović 1969). Za ovaj učinak vjerojatno su odgovorni eritrociti, jer injiciranje suspenzije u kojoj su gotovo isključivo zastupljeni eritrociti doводи do istog učinka (idem). Međutim, trokrotno injiciranje suspenzije krvnih stanica, u našem specifičnom modelu (grupa E), nije utjecalo na preživljavanje očevog kalema presađenog na mlade. Štoviše, SVO očevih kalema ima najnižu vrijednost upravo u ovoj grupi, ali se ne razlikuje značajno u poređenju sa kontrolnom grupom. Prema tome, ni produženje života očevog kalema u grupi A<sub>2</sub> ne može se pripisati samo injiciranim krvnim stanicama. Vjerojatno niti jednokratno kalemljenje ženki kožnim kalemom nije u tom smislu odlučno, jer i samo jedan kalem koji je ušiven ženkama u grupi A<sub>1</sub>, također nije imao učinka. Na temelju ovih razmatranja može se pretpostaviti da se najvjerojatnije radi o kombiniranom učinku imunosti stvorene senzibilizacijom ženki kožnim kalemom, a zatim i snažno potaknute trokrotnim injiciranjem krvnih stanica. Ova imunost majke mogla se je očitovati u preinaci reaktivnosti mladih prema očevom kalemu. No, ne smije se potpuno isključiti ni mogući utjecaj trokrotne trudnoće ženki, iz ove grupe, sa istim mužjakom. Naime, prije-

laz fetalnih stanica u majku tokom trudnoća i porodâ može imati kumulativan učinak i dodatno stimulirati produkciju protutijela u organizmu majke, prema antigenima što ih je fetus naslijedio od oca. Važno je istaći da pri tome obično ne dolazi do izražaja pojačana stanična imunost majke na tkiva mužjaka, već štaviše, na neki je način i smanjena reaktivnost majke prema tim tkivima. Tako je poznato, iz pokusa na miševima, da višekratne trudnoće mogu izmijeniti otpornost ženki na presađene tumore, koji su identičnog genetičkog sastava kao i tkiva mužjaka sa kojim je ženka dala potomstvo (Breyere i Barrett 1960a). Štaviše, takve ženke duže nose i normalna tkiva (kožni kalem) mužjaka. (Breyere i Barrett 1960b). Interesantno je da se, u oba slučaja, preživljavanje tumora, odnosno kožnog kalema, povećava kroz 3 trudnoće, a nakon treće dostiže maksimum. Ženke sa 4 ili više trudnoća reagiraju na razini reaktivnosti ženki koje su imale 3 trudnoće. Za očitovanje ovog učinka nije čak niti potrebna trudnoća, ako se radi o slabim razlikama u antigenima tkivne srodnosti između ženke i mužjaka (napr. razlike na spolnom kromozomu). Takve ženke, ako se samo pare sa mužjakom, bez naknadne trudnoće, također pokazuju smanjenu reaktivnost prema njegovom kožnom kalemu (Hašek i sur. 1962; Prehn 1960), što se može pripisati utjecaju same inseminacije. Teško je vjerovati da su opisani primjeri imunološke inercije posljedica stanične imunosti, jer bi ona u pravilu trebala dovesti do snažnije reakcije odbacivanja. S druge strane, pak, na ovaj način bi se moglo dodatno osigurati "povoljan" sastav i odgovarajuću razinu humoralnih protutijela, što bi doprinosilo facilitacijskom učinku ne samo prema kalemu mužjaka presađenom na majku, već i na njenu mladunčad, kao što je to u našim pokusima, posebno u grupi A<sub>2</sub>. U pri-

log ovakvog mišljenja govore i rezultati Kaliss-a i Rubinstein-a (1968), koji su utvrdili, u pokusima na miševima, da se u krvi multipara stvaraju hemaglutinini na antigene mužjaka, te da se ova protutijela prenose i u cirkulaciju mladih.

Činjenica da mladunčad senzibiliziranih majki nije pokazivala promjenu reaktivnosti na istovremeno presađene majčine kaleme, nije u proturječju sa iznesenom pretpostavkom za očeve kaleme. Tolerancija prema majčinom tkivu mogla bi nastupiti samo kao posljedica prolaza odgovarajućeg broja majčinih imunokompetentnih stanica u fetus, a višekratne trudnoće vjerojatno, u tom pogledu, ne doprinose znatnije. Upoređivanje SVO majčinih kalema u grupama A, A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub> (Tablica V) pokazuje da stvarno i nema bitnijih razlika. Doduše, u grupi A<sub>1</sub> je najniže SVO, što bi prije ukazivalo na slabiju imunost.

Normalna reaktivnost mladunčadi prema majčinih kalemima, uz istovremeno produženje života očevog kalema, vrlo je važan dokaz specifičnosti ovog učinka. Naime, specifična humoralna protutijela stvorena u organizmu majke snažnom senzibilizacijom očevim tkivima i dodatno stimulirana jednokratnom ili višekratnim trudnoćama, mogla su proći u cirkulaciju fetusa i novorođenčeta, te djelovati facilitacijski na očeve kaleme presađene mladim. Da bismo to mogli i tvrditi neophodno je sustavno pratiti produkciju humoralnih protutijela i njihovu razinu u organizmu majke i njene mladunčadi, što je odvažnosti za objašnjenje facilitacijskog učinka. U pokusima na visokosrodnim štakorima (vidi 5.1.) to smo radili samo djelomično, pa će u narednim pokusima, opisanim u poglavlju 5.4. , biti posvećena posebna pažnja analizi humoralnog odgovora senzibilizirane majke i prijenosu protutijela iz njene cirkulacije u krvotok mladih.

Pretpostavili smo da u ovim pokusima može doći i do oštećenja mladunčadi senzibiliziranih majki. No, iako je senzibilizacija majki, očevim tkivima, bila vrlo snažna, ipak je učestalost takvih incidenata bila neznatna. Samo je mladunčad iz jednog legla grupe B uginula u razdoblju od 4 dana nakon poroda. Mladi su bili slabije razvijeni, a koža im je imala žućkastu boju. Kako nismo pratili razinu protutijela u njihovom serumu, kao ni u serumu majke, to je teško utvrditi mehanizam kojim se ovo oštećenje ostvarilo. Osim toga, ne može se potpuno isključiti ni moguće djelovanje eventualno prenesenih majčinih stanica. Stoga će ovo opažanje biti opširnije diskutirano uz pokuse opisane u poglavlju 5.4., u kojima smo također imali sličan nalaz.

5.3. PRIJENOS STANICA IZ ORGANIZMA MAJKE U FETUS PREKO  
PROPUSNIJE PLACENTE.

U pokusima na visokosrodnim štakorima ( vidi 5.1. ) pripisali smo produženja života Lewisovih kalema, na mladunčadi Y-59 u grupi SH, učinku Lewisovih splenocita prenesenih iz cirkulacije majke. Pretpostavili smo da su istovremeno u mladunčad prenesene i majčine stanice, ali njihov učinak nismo mogli utvrditi, jer su one genetički istorodne sa primacom. Dvije vrste imunokompetentnih stanica ( majčine stanice i Lewisovi splenociti ), koje su se našle u fetusima grupe SH, mogle su istovremeno djelovati i jedne protiv drugih, jer se međusobno razlikuju u antigenima tkivne srodnosti. Općenito se može reći da su Lewisove stanice bile u nepovoljnijem polčžaju, negoli majčine, jer se razlikuju i od fetusa. Kompeticija između zrelih prenesenih stanica, te otpor fetusa naseljavanju Lewisovih splenocita, mogli su se odraziti na specifičnu reaktivnost mladunčadi u kasnijoj životnoj dobi u različitim vidovima i to tako da reaktivnost bude preinačena ( tolerancija/bolest kržljanja ), ili da ostane nepromijenjena ( "normalna" ).

U pokusima koji se opisuju u ovom dijelu radnje htjeli smo se prvo uvjeriti dali <sup>se</sup> <sup>doista</sup> majčine stanice prelaze u fetus, kada gravidne majke injiciramo hijaluronidazom. Osim toga, trebalo se orijentirati i o tome, dali dolazi do kompeticije između dviju vrsta zrelih imunokompetentnih stanica, koje se našu u imunološki nezrelom fetusu, a međusobno se razlikuju u antigenima tkivne srodnosti. Krajnji ishod takve borbe mogli bismo i donekle pro-



cijeniti praćenjem preživljavanja kožnih kalema obaju davalaca, presađenih na mladunčad. Tako bismo lakše mogli razmatrati događaje koji su se zbili u fetusu i pratiti sudbinu pojedine vrste stanica. Konačno, moglo bi se zaključivati o tome koje su stanice povoljnije za fetus. Da bismo se o svemu navedenom mogli bolje orjentirati, bilo je neophodno raditi sa nesrodnim štakorima. Time smo osigurali razlike, makar i nedefinirane, u antigenima tkivne srodnosti, između prenesenih majčinih stanica i fetusa. Da bismo mladima ponudili i drugu vrstu tuđih stanica, injicirali smo u gravidne ženke Lewisove splenocite. Tako se obje vrste stanica koje se prenose u fetus razlikuju međusobno, ali i prema fetusu. No, ipak neki od mladih mogu biti sličniji, a neki manje slični, Lewisovim splenocitima.

### 5.3.1. PLAN POKUSA

Rezultati ovih pokusa prikazani su na 3 grupe životinja. Kontrolna grupa L daje nam podatke o vremenu odbacivanja Lewisovih kožnih kalema presađenih na mlade štakore Y, stare 25-30 dana. Ovi mladi potječu od netretiranih majki. Od mladih smo uzimali uzorke krvi 7, 11 i 21-og dana nakon kalemljenja, da bismo odredili hemaglutinine protiv Lewisovih eritrocita. Grupa H daje nam uvid u utjecaj hijaluronidaze na preživljavanje roditeljskih kalema na mladunčad. Štakori nesrodne populacije ( Y ), budući roditeljski partneri, stavljeni su u rasplod. Pri kraju graviditeta, 2-4 dana prije okota mladih, ženke su i.v. injicirane sa 10-15 T.R. jedinica hijaluronidaze ( hyaluronidase - Wydase ). Njihove mlade smo kalemili kožom roditelja, a uzimali smo i uzorke krvi za hemaglutinaciju.

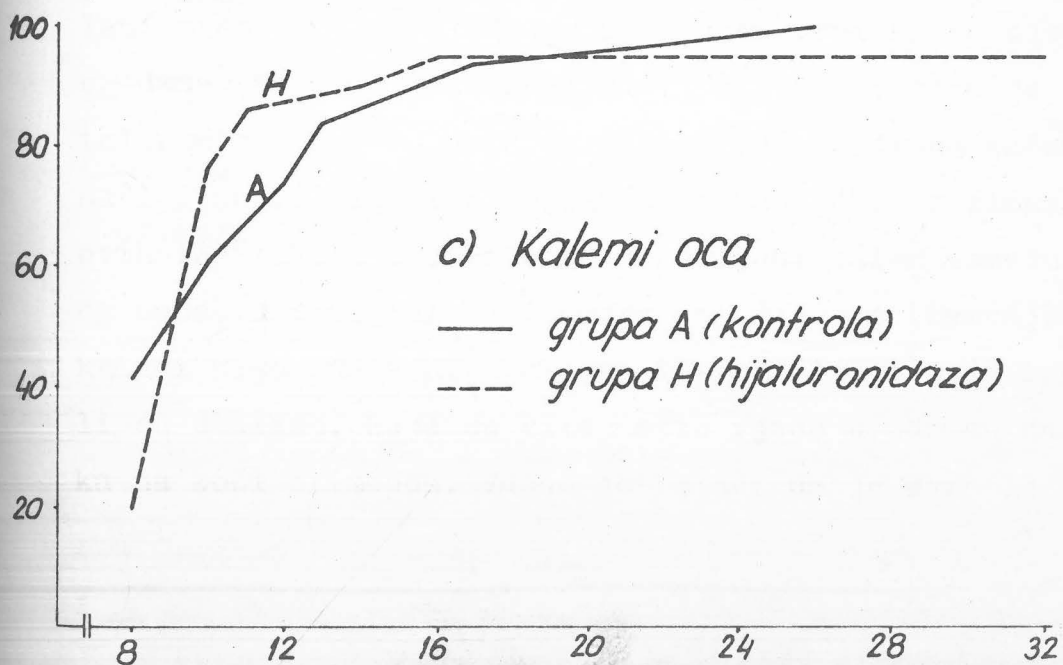
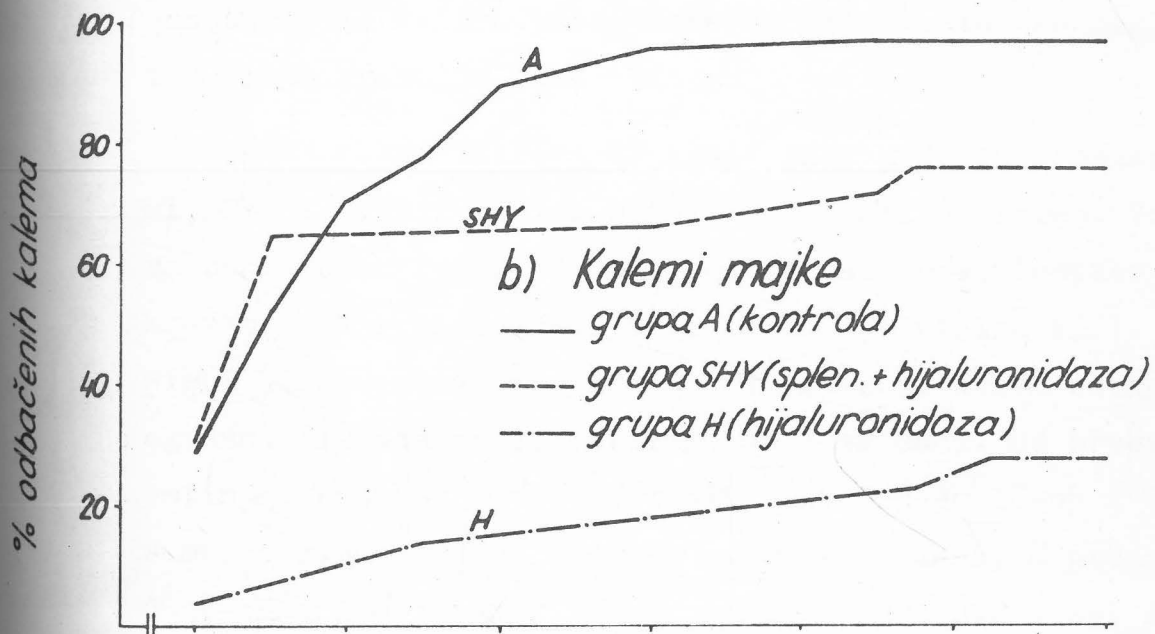
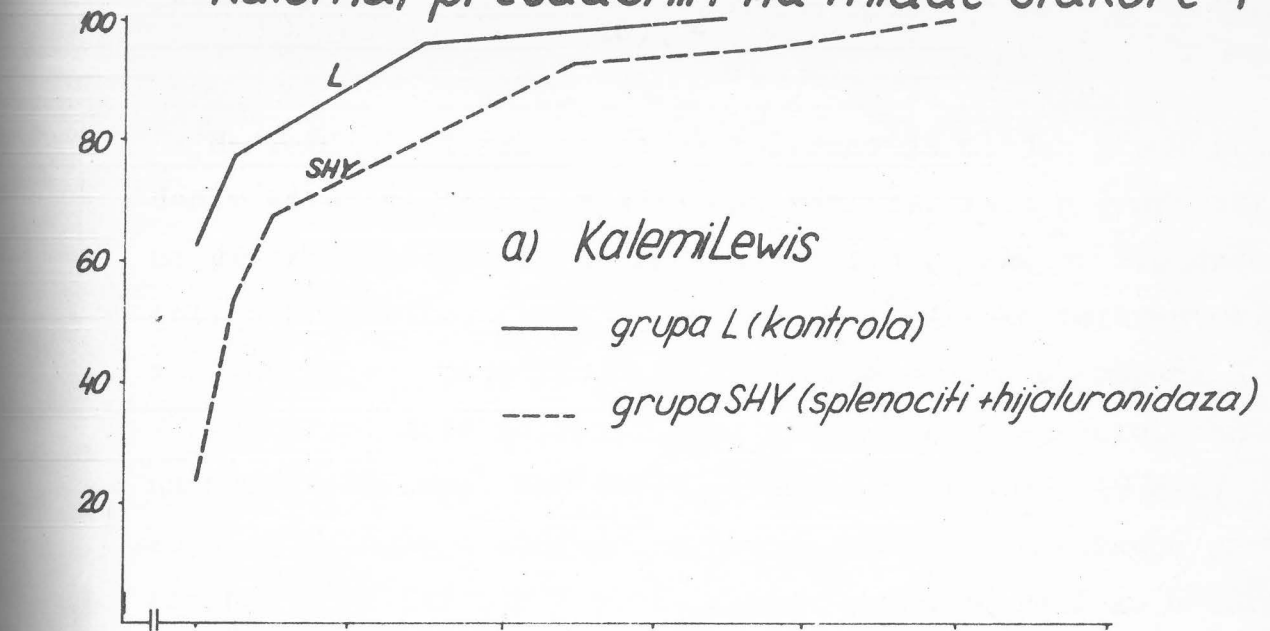
U pokusnoj grupi SHY stavljali smo u rasplod normalne ženke i mužjake populacije Y, stare oko 3 mjeseca. Kada su ženke bile gravidne injicirali smo im i.v. kroz tri dana, splenocite mužjaka Lewis. Svaka gravidna ženka dobila je 300 milijuna stanica. Zadnji inokulum stanica ( treći ) injicirali smo 1-3 dana prije okota mladih, što je ovisilo o leglu. Ukupno je bilo 9 legala. Istovremeno sa splenocitima ženke smo injicirali i hijaluronidazom ( Hyaluronidase -Koch-Light Lab.) u dozi od 3.000 I.U. Četvrtog dana su sve ženke još i dodatno, i.p., injicirane sa 6.000 I.U. hijaluronidaze. Prema tome, svaka ženka je ukupno dobila 15.000 I.U. hijaluronidaze. Kada je njihova mladunčad bila stara 25-30 dana kalemili smo ih kožom majke i mužjaka Lewis. Na dan ušivanja kalema, te 7, 11 i 21-og dana nakon kalemljenja, uzimali smo im uzorak krvi za određivanje hemaglutinina. Trideset dana nakon ušivanja ovih kalema, većinu mladih smo ponovno kalemili, bilo kožom majke ili mužjaka Lewis. Čiji će kalem mladi ponovno primiti određivali smo prema vremenu preživljavanja prvih presađenih kalema. Majčine kožne kaleme ponovno su dobili oni mladi koji su i njen prvi kalem nosili znatno duže od istovremeno presađenog Lewisovog kalema. Obrnuto, kožni kalem mužjaka Lewis ponovno su primili oni mladi, koji su prvi Lewisov kalem duže nesili negoli istovremeno presađeni majčin. Dio mladunčadi, koja je podjednako brzo odbacila oba kalema, ponovno je kalemljen ili majčinim ili Lewisovim kalemom. Tako je od 55 mladih koji su prvi puta kalemljeni sa oba kalema, 44 ponovno primilo jedan od ovih kalema. Izgled ponovno presađenih kalema pratili smo kroz 60 dana.

### 5.3.2. ODBACIVANJE PRESAĐENIH KALEMA

Na slici 8 prikazana je dinamika odbacivanja Lewisovih kalema u grupama L i SHY, majčinih kalema u grupama A, H i SHY, te očevih kalema u grupama A i H. Grupa A je već prethodno opisana ( vidi 5.2. ), a ovdje je dodatno prikazana radi usporedbe rezultata pokusnih i odgovarajućih kontrolnih grupa. Krivulja koja prikazuje odbacivanje Lewisovih kalema u grupi SHY razlikuje se od krivulje za kontrolne štakore u grupi L ( slika 8a ). Osmog dana je u grupi SHY odbačeno 14 % kalema, dok je u kontrolnoj grupi odbačeno čak 63 %. Odbacivanje Lewisovih kalema je i u kasnijem razdoblju znatno sporije, što se vidi i iz krivulje, koja je pomaknuta u desno. Još su izrazitije razlike između ~~krivulja~~ <sup>krivulja</sup> koje prikazuju odbacivanja majčinih kalema ( slika 8b ). Svi majčini kalemi presađeni na mlade u grupi A odbacuju se do 26-og dana, osim majčinog kalema na jednom mladunčetu, koji je trajno prihvaćen. U grupi SHY se majčini kalemi do 10-og dana odbacuju jedva nešto brže negoli u grupi A, ali se zato odbacivanje nakon 10-og dana <sup>naglo</sup> ~~usporava~~ ( plato krivulje ). U ovoj grupi je 24 % mladih trajno prihvatilo majčine kaleme, što je znatno više negoli u grupi A ( 2 % ). Najveći broj mladih trajno prihvaća majčine kaleme u grupi H ( 73 % ). I preostala mladunčad iz ove grupe, usporeno odbacuje majčine kaleme, znatno sporije nego mladi iz drugih grupa.

Krivulje koje prikazuju odbacivanje očevih kalema u grupama A i H ( slika 8c ), međusobno su vrlo slične. U grupi H je 8-og dana odbačeno nešto manje kalema, a jedno mladunče je očev kalem i trajno prihvatilo.

# Odbacivanje kalema štakora Lewis i roditeljskih kalema, presađenih na mlade štakore "Y"



Na Tablici VI prikazana je tolerancija mladih prema presađenim kalemima, SVO i značajnost razlika. Iako u grupi SHY nema visoko tolerantnih na Lewisove kaleme, ipak je SVO duže nego u kontrolnoj grupi L (  $p < 0,05$  ). Visoko tolerantni na majčine kaleme pojavljuju se u većem postotku u grupama H i SHY. U grupi H je najmanji broj štakora koji su netolerantni na majčine kaleme, što se je odrazilo i na SVO ( 19 dana ), koje je najduže u ovoj grupi, te se značajno razlikuje prema grupama A i SHY (  $p < 0,01$  ). Nema značajne razlike u odbacivanju očevih kalema presađenih na mlade, što smo naglasili već i u opisu krivulja odbacivanja.

Od 44 mlada štakora iz grupe SHY, koji su ponovno kalemljeni, 25 je primilo kalem majke, a 19 Lewisov kalem. Vremenski raspon unutar kojeg su mladi odbacivali prvi Lewisov kalem, kretao se u granicama od 8 do 28 dana (Tablica VII). Drugi Lewisov kalem presađen mladima koji su prvi kalem odbacili do 14-og dana (12 štakora), odbacuje se 7-og dana. Od preostalih 7 životinja, koje su prvi kalem odbacile između 18-og i 28-og dana, samo je jedna odbacila drugi kalem 7-og dana, a preostale između 8-og i 10-og dana. Sedmog dana se odbacuju i svi majčini kalemi presađeni na mlade koji su njen prvi kalem odbacili do 10-og dana. Na prvi majčin kalem 13 mladih štakora je bilo visoko tolerantno. Svi su ponovno kalemljeni majčinom kožom, no kalem na 1 štakoru nije bio uspješan iz tehničkih razloga. Osam od ovih 12 štakora odbacilo je ponovljeni kalem između 9-og i 19-og dana, a preostala 4 štakora ga trajno prihvaćaju. Prihvaćeni kalemi nisu značajnije mijenjali veličinu i opći izgled. Obrasli su dlakama, koje su bile nešto rjeđe u odnosu na gustoću dlaka na koži primaoca. Važno je istaći da je svih 13 prvih kalema

T A B L I C A VI

TOLERANCIJA I SVO KALEMA ŠTAKORA LEWIS I RODITELJSKIH KALEMA PRESADENIH NA MLADE ŠTAKORE "Y"

GRUPA	BROJ MLADIH	DAVALAC KALEMA	NETOLERANTNI	TOLERANTNI	VISOKO TOLERANTNI	SVO $\bar{X} \pm SP^x$	P
L	54	Lewis	45 (83%)	9 (17%)	0	9,4 $\pm$ 0,4	za kaleme Lewis :
SHY	55	Lewis	38 (69%)	17 (31%)	0	11,4 $\pm$ 0,6	SHY: L $\angle$ 0,05
SHY	55	Majka	36 (65%)	6 (11%)	13 (24%)	11,1 $\pm$ 0,9	za kaleme majke :
A	62	Majka	45 (72%)	16 (26%)	1 (2%)	11,3 $\pm$ 0,5	H : A $\angle$ 0,01
A	61	Otac	51 (84%)	10 (16%)	0	11,0 $\pm$ 0,5	H : SH $\angle$ 0,01
H	22	Majka	1 (4%)	5 (23%)	16 (73%)	19,0 $\pm$ 3,0	
H	21	Otac	18 (86%)	2 (9%)	1 (5%)	9,9 $\pm$ 0,4	

x = standardna pogreška aritmetičke sredine

T A B L I C A VII

DANI ODBACIVANJA PRVOG I DRUGOG KALEMA MAJKE I KALEMA ŠTAKORA LEWIS PRESADENIH MLADIM U GRUPI SHY

BROJ ŠTAKORA	K A L E M I I KALEM (dani)	M A J K E II KALEM (dani)	BROJ ŠTAKORA	K A L E M I I KALEM (dani)	L E W I S II KALEM (dani)
3	8	7	3	8	7
4	9	7	4	9	7
4	10	7	2	10	7
2	27	8,9	1	12	7
12	visoko tolerantni	3 x 9	1	13	7
		12, 14, 16,	1	14	7
		18, 19	2	16	9,10
		4 x visoko tolerantni	2	18	7,8
			1	20	8
			1	26	9
			1	28	8

na ovoj mladunčadi i dalje bilo u vrlo dobrom stanju, iako je 8 štakora odbacilo ponovljene kaleme.

### 5.3.3. DISKUSIJA

Kako smo u grupi SH, u pokusima na visokosrodnim štakorima (5.1.) utvrdili da preko placente prolaze Lewisovi splenociti, trebalo se je uvjeriti, u ovim pokusima, da li se to isto može postići i sa majčinim stanicama. Znatan broj visoko tolerantnih štakora (73%) i izrazito produženje SVO (19 dana) u grupi H, ukazuju da je hijaluronidaza isto tako efikasna i u prijenosu majčinih stanica u mlade, što smo već u prijašnjoj diskusiji i pretpostavljali. U prilog ovog rezultata govore i pokusi Nathan-a i sur. (1960). Oni su injicirali gravidne ženke kunića sa 15-45 T.R. jedinica hijaluronidaze i dobili produženje života majčinih kalema presađenih na mlade. Najarian i Dixon (1963) su također injicirali gravidne ženke kunića s hijaluronidazom i drugim enzimima, za koje se pretpostavlja da povećavaju propusnost placente za stanice. Dobili su produženje života majčinih kalema na mladim, ali i toleranciju majke prema kožnim kalemima njene mladunčadi. Ovu uzajamnu toleranciju tumače obostranom i znatnom razmjenom stanica između majke i mladih. Propusnost placente za majčine stanice i tolerancija na majčine kaleme, može se dobiti i ozračivanjem gravidnih ženki, pri kraju trudnoće, sa X-zrakama (Kečkeš i Allegretti 1963). Matošić i sur. (1967) su utvrdili da muška mladunčad, majki ozračenih za vrijeme trudnoće, posjeduje 1-2 mjeseca nakon okota i do 35% majčinih stanica u koštanoj srži. Obzirom na nalaz visoko tolerantnih štakora u našoj grupi H, vjerojatno je da su i u njihovoj koštanoj srži i limfatičkom apa-



ratu prisutne majčine stanice (kimerizam). Da je ovaj učinak prenesenih majčinih stanica strogo specifičan, u smislu tolerancije, dokazuje normalno vrijeme odbacivanja očevih kalema, koji su istovremeno presađeni na ovu mladunčad.

Hijaluronidaza je injicirana i u gravidne ženke iz grupe SHY. I u toj grupi nalazimo štakore koji su visoko tolerantni na majčin kalem, iako u skromnijem broju (24%), negoli u grupi H. Interesantno je da SVO u grupi SHY nije produženo, kada se usporedi sa SVO u kontrolnoj grupi A. Već je iz krivulje koja prikazuje odbacivanje majčinih kalema u grupi SHY (slika 8b) bilo vidljivo da mladunčad reagira na majčine kaleme po principu "sve ili ništa", tj. ili ih brzo odbacuje (65%) ili ih trajno prihvaća (24%). Prijelaz između ovih krajnosti čini svega 6 štakora (11%), ali kako i oni vrlo dugo nose majčine kaleme, bliže su visoko tolerantnim negoli netolerantnim. Teško je direktno uspoređivati preživljavanje majčinih kalema presađenih na mladunčad iz grupa H i SHY, jer među njima postoje dvije razlike: 1) injicirane su različitim vrstama i različitim dozama hijaluronidaze, i 2) gravidne ženke u grupi SHY istovremeno su injicirane i Lewisovim splenocitima. S obzirom na diskusiju rezultata u grupi SH (5.1.), mora se pretpostaviti da je interakcija dviju vrsta stanica, koje su prenesene u fetuse, mogla imati odraza i na preživljavanje majčinih kalema presađenih na mlade. Stoga se u daljnjoj diskusiji treba opširnije osvrnuti upravo na ovu mogućnost.

U grupi SHY smo omogućili da u mlade pređu dvije vrste zrelih imunokompetentnih stanica: majčine stanice i Lewisovi splenociti. Po tome ova grupa podsjeća na grupu SH iz pokusa na genetički čistim sojevima štakora (5.1.). Međutim, u grupi SHY se i

majčine stanice genetički razlikuju od fetusa, jer smo radili na heterozigotnim štakorima. Obje vrste stanica, koje su prenesene u fetuse, mogu djelovati protiv njih. Može se pretpostaviti i neka reaktivnost fetusa prema tuđim stanicama. No, ona je sigurno znatno slabija, jer je mladunčad u perinatalnom razdoblju života, u mnogih životinjskih vrsta, imunološki nezrela. I u štakora proces imunološkog dozrijevanja završava tek neko vrijeme po rođenju. Ako fetalne imunokompetentne stanice dozrijevaju u kontaktu sa tuđim-unesenim stanicama, mogu postati tolerantne na njihove antigene (Barnes i sur. 1958; Lengerova 1959), što će se u kasnijoj životnoj dobi manifestirati i tolerancijom na sva tkiva koja su genetički identična sa tim stanicama. Međutim, tokom dozrijevanja imunokompetentnih stanica mladunčeta tuđe stanice mogu biti i eliminirane, pa neće ostaviti nikakvog traga na imunološku reaktivnost mladih, u kasnijem životnom razdoblju. Ako je, međutim, došlo do prevage tuđih stanica, tada organizam mladunčeta može biti i teško oštećen, pa može i podleći (bolest kržljanja). Već smo naglasili da se i obje vrste prenesenih stanica međusobno genetički razlikuju, a to može dovesti do konkurencije i direktne borbe među njima. Na taj način bi se mogao umanjiti učinak svake od ovih stanica, u smislu iznesene diskusije.

Konačni rezultat ove borbe između fetusa i tuđih stanica, te stanica međusobno, ocjenjivali smo na temelju preživljavanja kožnih kalema presađenih na mladunčad. Iz tih rezultata vidljivo je da neka mladunčad grupe SHY trajno prihvaća kožne kaleme majke (visoko tolerantni), dok nijedno mladunče nije trajno prihvatilo Lewisov kalem. I pored toga, značajno je produženo vrijeme preživljavanja Lewisovih kalema na mladunčadi ove grupe, kada ga usporedimo sa kontrolnim štakorima iz grupe L ( $p \leq 0,05$ ). Na temelju

ovih rezultata mogli bismo zaključiti da mladunčad ove grupe duže nosi oba kalema (majčin i Lewisov). Kako se radi o učinku prenesenih stanica, to bi moglo značiti da su se u mladim uspjele održati obje vrste stanica (kimerizam), što se očituje u nekom stupnju tolerancije na kožne kaleme. Međutim, u to se može opravdano sumnjati na temelju rezultata pokusa na ozračenim životinjama. Stoga ćemo neke najvažnije ukratko i iznijeti.

Poznato je da životinja koja je izložena radioaktivnom zračenju pokazuje izrazitu atrofiju limfatičkog aparata i smanjenje imunološke reaktivnosti (Clemendson i Nelson 1960; Hašek i Lengerova 1960). U tome je bar donekle slična imunološkom statusu fetusa-novorodačeta. Životinje ozračene letalnom dozom radioaktivnih zračenja ugibaju zbog oštećenja hematopoeze, pa im se u svrhu liječenja presađivalo koštanu srž. Kako je bitno oslabljen imunološki potencijal ozračenog organizma, a među stanicama alogene koštane srži ima i imunokompetentnih, to su mnoge životinje ugibale od sekundarne bolesti (Vos i sur. 1959; VanBekkum i sur. 1959; Jutila i Weiser 1962). Sekundarna bolest se može izbjeći ako se životinji injicira autologna ili singena koštana srž, što je u genetički nesrodnoj populaciji gotovo nemoguće osigurati. Prema tome, trebalo je pronaći metodu izbora najpovoljnijeg davaoca, unutar populacije, što bi imalo veliku vrijednost i u kliničkoj medicini. Pretpostavilo se da bi, u tom smislu, bilo najefikasnije injicirati mješavinu stanica koštane srži od više davalaca heterozigotne populacije. Tako bi se možda najbolje moglo "pokriti" široki spektar antigenih razlika u tkivnoj srodnosti i omogućiti da u mješavini budu i stanice koje su vrlo slične primaocu. Lengerova (1960) je postigla najbolji rezultat kada je injicirala mješavinu stanica od 40 davalaca. Međutim, injicirala je fetalne hematopoetske stanice,

što ograničava primjenu ovog nalaza. Vlahović i sur. (1964) su pokušali zaštititi letalno ozračene miševe, genetički nesrodne populacije, mješavinom stanica koštane srži od više odraslih davalaca. Mješavina pripremljena od 30-60 davalaca imala je identičan učinak kao injiciranje autologne koštane srži. Efikasnost je bila mnogo manja ako su injicirali stanice srži samo jednog davaca ili grupe od 15 davalaca. Interesantno je da je bila manja i efikasnost mješavine uzete od 120 davalaca, bez obzira na broj injiciranih stanica. Ovaj rezultat Vlahović i sur. (idem) objašnjavaju prisustvom stanica više davalaca koji su kompatibilni s primaocima, ali ne moraju istovremeno biti kompatibilni međusobno. Prema tome, i oni sugeriraju da među stanicama davalaca može doći do direktnog obračuna, što može oslabiti efikasnost stanica koje su najpovoljnije za primaoca. Proces odabiranja stanica, koje su injicirane u ozračenu životinju, obično završava trajnim prihvatanjem samo jedne stanične populacije (Mathé i sur. 1964; 1965; Uphoff i sur. 1965). Uphoff i sur. (1965) smatraju da se proces odabiranja odvija relativno dugo, kroz 3 mjeseca. Nakić i sur. (1967) su citološkom analizom, u miševa, zaključili da se proces odabiranja završava u kraćem razdoblju, tj. obično unutar 2 tjedna nakon injiciranja, a tada je gotovo isključivo zastupljena samo jedna populacija stanica.

I za objašnjenje naših rezultata u grupi SHY važno je saznanje, iz citiranih pokusa, da samo jedna vrsta injiciranih stanica može povlašteno preživjeti u domaćinu. Možemo pretpostaviti da se na analogan način zbiva i odabiranje u našim pokusima, jer je pokusni model, s obzirom na imunološku nezrelost mladunčeta, donekle sličan ozračenoj životinji. Kako smo radili na genetički nesrodnoj populaciji štakora, neophodno je proces odabiranja

analizirati individualno, u svakoj životinji posebno, jer varijacije u broju prenesenih stanica i genetičkim odnosima, mogu biti velike. Analizom individualnih rezultata utvrdili smo da sve štakore grupe SHY možemo podijeliti u 3 podgrupe (Tablica VIII). U podgrupu 1. pripadaju štakori koji brzo odbacuju oba presađena kalema (netolerantni). Štakore koji brzo odbacuju majčin kalem (netolerantni), ali duže nose Lewisov kalem (tolerantni), svrstali smo u podgrupu 2. U podgrupi 3. nalaze se štakori koji dugo nose majčin kalem (tolerantni i visoko tolerantni), a brzo odbacuju Lewisov kalem (netolerantni). Važno je istaknuti da nema nijednog štakora koji duže nosi oba kalema, tj. nijedan ne pripada među tolerantne na oba istovremeno presađena kalema. Iz rezultata prikazanih na Tablici VIII, a uzimajući u obzir dosadašnju diskusiju, može se zaključiti da se i u mladunčadi grupe SHY vrši odabiranje između majčinih i Lewisovih stanica. Obje vrste prenesenih stanica mogu biti eliminirane i tako se može "normalizirati" reaktivnost mladunčeta na presađene kaleme (podgrupa 1.). No, može se pretpostaviti da će prevladavanje jedne vrste stanica, koje nasele limfatički aparat mladog (kimerizam), onemogućiti drugu vrstu stanica da se održi u mladom. Upravo smo to i dobili u podgrupama 2. i 3. U podgrupi 3. mladi vrlo dugo nose majčin kalem (SVO=25,5 dana), a 13 mladih ga i trajno prihvaća (visoko tolerantni). Slično je i u podgrupi 2., samo je u njoj izrazito produženo vrijeme preživljavanja Lewisovih kalema. U ovoj podgrupi nijedno mladunče nije trajno prihvatilo Lewisov kalem, što vjerojatno znači da su Lewisove stanice naknadno eliminirane.

Činjenica da je 13 mladih visoko tolerantnih na majčine kaleme, a nijedan na Lewisov kalem, može ukazivati da su majčine stanice, općenito uzevši, ipak povoljnije za mladunčad, nego Lewisove.

T A B L I C A VIII

GRUPIRANJE MLADIH IZ GRUPE SHY PREMA TOLERANCIJI NA KALEM MAJKE I LEWISOV KALEM

GRUPA	BROJ MLADIH	KALEM MAJKE	LEWISOV KALEM	p
SHY	55	$11,1 \pm 0,9^{(13)x}$	$11,1 \pm 0,6$	
PODGRUPE				
1.	20	$8,7 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,2$	za kaleme Lewis: 2. : 1. $\angle 0,001$ 2. : 3. $\angle 0,001$ za kaleme majke: 3. : 1. $\angle 0,001$ 3. : 2. $\angle 0,001$
2.	16	$8,7 \pm 0,2$	$17,3 \pm 1,7$	Lewis 2. : Majka 2. $\angle 0,001$
3.	19	$25,5 \pm 1,1^{(13)}$	$9,2 \pm 0,2$	Majka 3. : Lewis 3. $\angle 0,001$

1. = netolerantni na oba kalema

2. = netolerantni na kalem majke, tolerantni na Lewisov kalem

3. = tolerantni na kalem majke, netolerantni na Lewisov kalem

x = broj visoko tolerantnih

Genetički odnosi između davalaca i primaoca vjerojatno znatno utječu na proces odabiranja i eliminaciju stanica koje su primaocu "dalje" (Mathé i sur. 1964; Uphoff i sur. 1965). I indukcija tolerancije također ovisi o genetičkim odnosima, pa će biti to uspješnija što su manje razlike u antigenima tkivne srodnosti između domaćina i stanica. Možemo pretpostaviti da su, u tom pogledu, majčine stanice sličnije mladim negoli Lewisove, jer su mladi dio antigene građe naslijedili od majke. No, u razmatranju rezultata tolerancije na presađene kaleme treba voditi računa i o kompeticiji između prenesenih stanica, što također utječe na konačan ishod (Kondić-Mitin 1970). Kompeticija među prenesenim stanicama mogla je znatnije oslabiti njihovu uspješnost u borbi protiv mladunčeta. Možda je upravo kompeticija između Lewisovih i majčinih stanica utjecala na mnogo manju učestalost visoko tolerantnih na majčine kaleme u grupi SHY (24%), kada je usporedimo sa grupom H (73%). To doduše ne možemo kategorički tvrditi, jer su gravidne ženke iz ovih grupa injicirane različitim vrstama hijaluronidaze i različitim dozama, što je već i spomenuto. Da se i u novorođenih životinja mogu odvijati ovakvi procesi, slično kao u ozračenih i injiciranih, pokazali su Billingham i Brent (1956b) u nešto drugačijem eksperimentalnom modelu. Opazili su da je bolest kržljanja vrlo učestala i snažna u miševa soja A, koje su injicirali splenocitima  $C_{57}$ . Uspjeli su smanjiti učestalost bolesti i oslabiti njen intenzitet, kada su novookočene miševe soja A injicirali mješavinom splenocita sojeva CBA i  $C_{57}$ . Pretpostavljaju da su primaocu genetički bliži splenociti CBA jače reagirali protiv stanica drugog davaoca ( $C_{57}$ ) nego protiv primaoca, te odbacili "dalje" splenocite i tako ublažili oštećenje primaoca. Može se misliti da su slično djelovale i majčine stanice u našoj podgrupi 3., a kako su djelo-

mično slične mladunčetu mogle su. se u njemu lakše održati, što se očituje trajnim prihvaćanjem majčinih kalema u neke mladunčadi. S druge strane Lewisovi splenociti su u podgrupi 2. uspjeli eliminirati majčine stanice, ali kako se znatnije razlikuju prema fetusu nisu se mogli trajno održati. Stoga u ovoj grupi nije ni bilo visoko tolerantnih na Lewisove kaleme. Možda bi Lewisovi splenociti bili i još manje uspješni da nisu neko vrijeme proboravili u cirkulaciji majke, prije nego su prešli u fetuse. Tako su se mogli imunizirati na antigene majčinih stanica, sa kojim su se susretali na svakom koraku, pa im je i reaktivnost prema majčinim stanicama, u fetusu, bila pojačana. Poznato je, iz pokusa na radijacijskim kimerama, da preimunizacija inferiornog davaoca, protiv antigena dominantnog davaoca, može utjecati na proces odabiranja, tako da u ozračenoj životinji prevladaju stanice koje su inače inferiorne (Volf 1970).

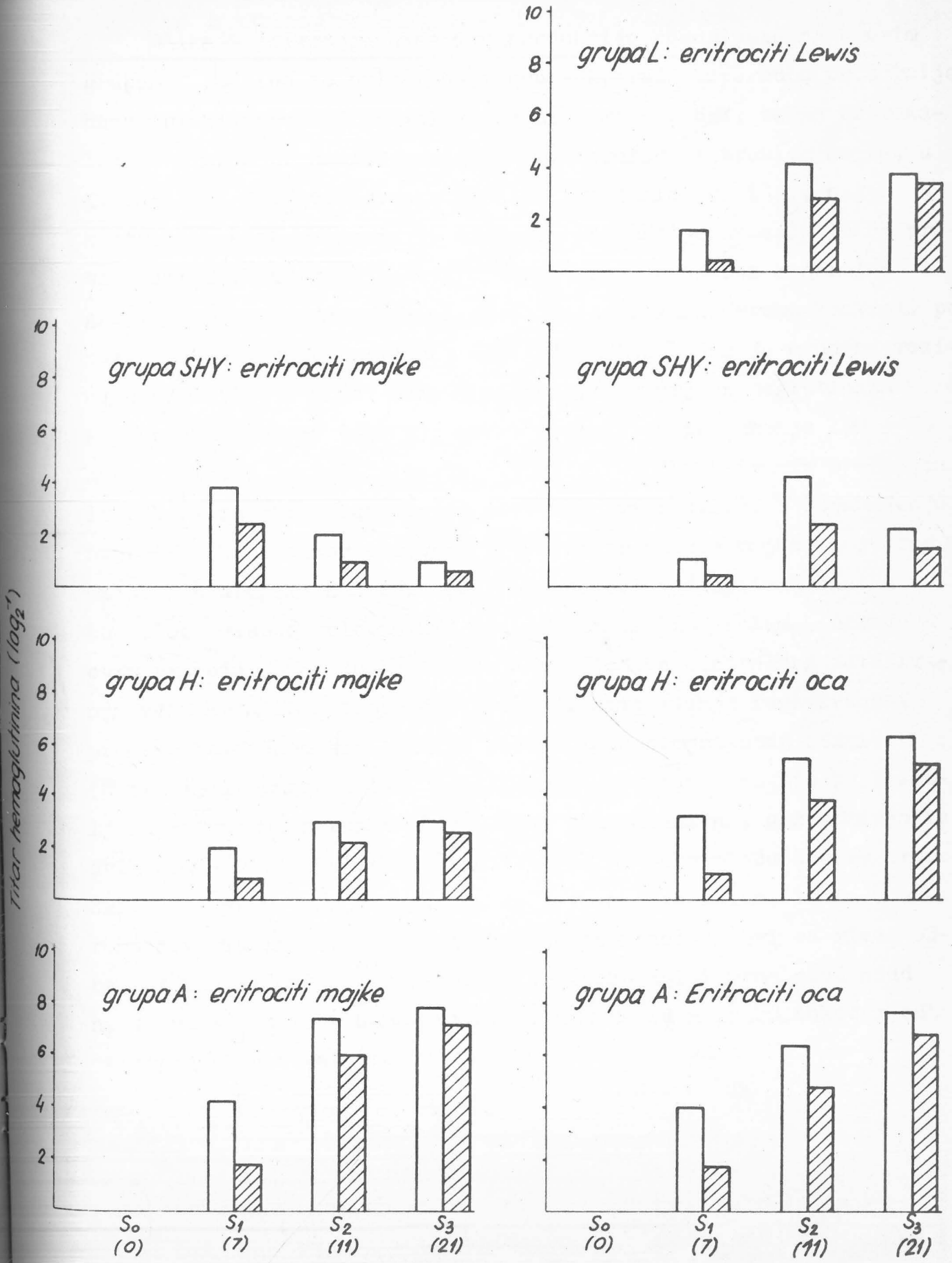
U diskusiji rezultata u grupi SHY mogu nam pomoći i rezultati preživljavanja ponovno presađenih kalema (Tablica VII). Klasičnu reakciju ponovljenog kalema (second-set) vidimo samo u one mladunčadi koja relativno brzo (unutar 14 dana) odbacuje bilo majčin ili Lewisov kalem. Ta je mladunčad odbacila ponovljeni kalem 7-og dana. U pokusima sa odraslim štakorima, iz naše genetički nesrodne populacije, utvrđeno je da se ponovljeni kalemi odbacuju 7-og dana nakon presađivanja (Vlahović i Sabol 1968). Već smo u prethodnoj diskusiji pretpostavili da je trajno prihvaćanje prvih majčinih kalema rezultat kimerizma, koji je uspostavljen u mladima. Kada je kimerizam potpun, tj. limfatički aparat mladih sastavljen od vlastitih stanica i stanica davaoca - koje su u dinamičkoj ravnoteži, tada će mladi prihvatiti ne samo prvi, već i svaki naknadni kalem od istog davaoca (Woodruff 1960). Četiri mlada su ponov-



ljeni majčin kalem prihvatila trajno, pa je to znak da je u njih kimerizam stabilan, za razliku od preostalih 8 štakora koji su ponovni kalem odbacili, iako ne reakcijom ponovljenog kalema (Tábrica VII). Četiri štakora koji su trajno prihvatili i drugi majčin kalem, ponovno smo - po treći put, kalemili njenom kožom. I treći kalem je bio normalno prihvaćen, kroz razdoblje od 40 dana, koliko smo nošenje kalema promatrali. To je dokaz da je u ove mladunčadi kimerizam doista stabilan i trajan. Može se pretpostaviti da je ponovljeni kalem u preostalih 8 štakora "pobudio" imunokompetentne stanice domaćina, koje su postale aktivnije, pa odbacile preostale majčine stanice. Time je i ukinut kimerizam, pa je ponovljeni kalem mogao biti odbačen.

Trajno prihvatanje prvog kalema u sve mladunčadi, iako je 8 od 12 ponovljenih kalema odbačeno, moglo bi se objasniti fenomenom adaptacije kalema. Ovaj fenomen su detaljnije opisali Weber i sur. (1954) u pokusima na pilićima, te Woodruff i Simpson (1955) na štakorima. Inducirali su u životinjama visoku, ali ne i potpunu, toleranciju na alogeno tkivo. Opazili su da prvi kalem na tim životinjama može biti trajno prihvaćen, iako je odbačen drugi kalem od istog davaoca. Antigenost adaptiranog kalema ostaje nepromijenjena, što se može dokazati njegovim prijenosom na normalnu životinju, koja ga odbacuje na uobičajeni način (Billingham i sur. 1956a). Pas u kojem alogeni bubreg normalno funkcionira može odbaciti, na uobičajeni način, kožni kalem od istog davaoca (Murray i sur. 1962). Drugi bubreg, od istog davaoca, ovakve životinje odbacuju već nakon 48 sati (Murray i sur. 1964), što je dokaz da je domaćin specifično senzibiliziran. Općenito se može iznijeti slijedeća tvrdnja: što se kalem duže nosi, to mu je veća šansa da bude trajno prihvaćen.

Produkcija hemaglutinina u mladih štakora "Y" nakon presađivanja roditeljskih kalema i kalema štakora Lewis



Dani nakon kalemljenja

Slika 9 prikazuje dinamiku produkcije hemaglutinina u ovim grupama. Dodatno je prikazana i grupa A, radi usporedbe produkcije hemaglutinina na majčin kalem, sa grupama H i SHY, te na očev kalem sa grupom H. Razina hemaglutinina protiv eritrocita majke, u grupama H i SHY, višestruko je niža u serumima  $s_2$  i  $s_3$ , negoli u kontrolnih štakora grupe A. Dinamika produkcije hemaglutinina protiv Lewisovih eritrocita u grupi SHY vrlo je slična kontrolnoj grupi L, u prvoj fazi nakon kalemljenja. Razlika prema kontroli pokazuje se u serumu izvađenom 21-og dana ( $S_3$ ), jer je u njemu razina hemaglutinina niža. Sama dinamika produkcije hemaglutinina u kontrolnim grupama (A i L), kao i redoslijed produkcije 19S i 7S hemaglutinina, pokazuje dosta sličnosti sa diskutiranim opažanjima iz pokusa na genetički čistim sojevima (vidi 5.1.). U objašnjenju supresije humoralnog odgovora prema eritrocitima majke, koju smo opazili u grupama H i SHY, može nam pomoći već opisana znatna učestalost visoko tolerantnih štakora na majčine kaleme, upravo u ovim grupama. Kako je tolerancija posljedica centralnog zatajivanja mehanizma imunosnog odgovora, tj. zatajivanja reaktivnosti prema specifičnom antigenu na razini imunokompetentne stanice (Smith 1961; Hašek i sur. 1961), to je i razumljivo što je oslabljena i humoralna reaktivnost, a ne samo stanična, u životinja iz ovih grupa. Od interesa je iznijeti da su neka mladunčad iz grupe SHY, koja su visoko tolerantna na prvi majčin kalem, imala u serumu hemaglutinine, iako u niskoj koncentraciji. Ovi su mladi odbacili ponovljeni kalem. Preostala visoko tolerantna mladunčad nije imala u serumu hemaglutinina, a neka od njih su također odbacila ponovljene kaleme.

5.4. UTJECAJ ISTOVREMENOG PRIJENOSA MAJČINIH PROTUTIJELA :  
HUMORALNIH I STANIČNIH, NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST  
MLADUNČADI

U dosad opisanim eksperimentima utvrdili smo neke promjene u reaktivnosti mladunčadi senzibiliziranih majki, pa ih možemo i ovdje istaknuti, u obliku 2 zaključka: 1) Snažnom senzibilizacijom majke alogenim tkivom produžuje se život istog tkiva presađenog na njene mlade. Ovaj učinak je specifičan, a opazili smo ga u pokusima na genetički srodnim, kao i nesrodnim štakorima. 2) Hijaluronidaza, koju smo injicirali u gravidne ženke, povećava propusnost placente za stanice i tako omogućuje njihov prijenos u fetus. Prijenos stanica nije ograničen samo na majčine, već se na isti način mogu prenijeti i tuđe stanice, kada se injiciraju u gravidnu ženu.

Produženje života kalema, navedeno pod točkom 1, tumačili smo učinkom humoralnih protutijela prenesenih iz organizma majke. Za sigurnije tumačenje mehanizma kojim se ovaj učinak ostvaruje neophodno je sustavno pratiti dinamiku produkcije protutijela u organizmu senzibilizirane majke, kao i obim prijenosa majčinih protutijela u cirkulacijski sustav mladih. U pokusima na genetički nesrodnim štakorima (vidi 5.2.) nismo uopće pratili humoralnu reaktivnost, a u pokusima na genetički čistim sojevima samo djelomično (5.1.). Već smo u Općem dijelu naglasili da se nakon senzibilizacije alogenim tkivom u organizmu primaoca stvaraju različite vrste humoralnih protutijela, kao što su hemaglutinini (Gorer i Mikulska 1954), leukoaglutinini (Amos 1953), hemolizini (Gorer i O'Gorman 1956) i citotoksini (Terasaki i sur. 1961). Intenzitet humoralnog odgovora pratili smo, u ovim pokusima, određivanjem razi-

ne hemaglutinina u krvi majke i mladih. To je od posebnog značaja kada se zna, iz pokusa na tumorima, da je titar hemaglutinina protuseruma u pozitivnoj korelaciji sa facilitacijskim učinkom (Kaliss 1958). Osim toga, ima podataka koji govore da prenesena protutijela mogu utjecati i na aktivni humoralni odgovor mladunčadi (Evans i Smith 1963) pa smo, u ovim pokusima, pratili i djelovanje protutijela u tom smislu.

U dosad opisanim pokusima odvojeno smo pratili utjecaj imunokompetentnih stanica, od utjecaja humoralnih protutijela, prenesenih iz organizma majke u mladunčad. No, kada životinju senzibiliziramo alogenim tkivom, tada se u njenom organizmu razvija dvostruka reakcija, koja se očituje i staničnom i humoralnom imunošću. Još smo u Općem dijelu (vidi 2.1.2.1. i 2.1.2.2.) isticali da su to nedjeljive komponente tkivne imunosti, a rezultati pokusa na genetički čistim sojevima (5.1.) su pokazali da oba tipa ove imunosne reakcije mogu imati odraza na imunološku reaktivnost mladih. Stoga smo u pokusima, koji se dalje iznose, radili na genetički nesrodnoj populaciji štakora ("Y"), što nam je omogućilo da na svakom mladunčetu promatramo utjecaj ne samo humoralnih protutijela, prenesenih iz organizma majke, već i njenih stanica. Na temelju dosadašnjih rezultata mogli smo pretpostaviti da će se istovremeni prijenos obiju vrsta imunosti odraziti, u nekom obliku, na imunološku reaktivnost mladih. No, može se misliti i na mogućnost interakcije ovih protutijela, kada se nađu u fetusu, bilo u smislu sinergizma ili antagonizma, pa je i o tome trebalo voditi računa.

#### 5.4.1. POKUSNE GRUPE

Osnovnu pokusnu grupu čini grupa BH, koja je, po postupku, senzibilizacije, identična sa prethodno opisanom grupom B (5.2.). Normalne ženke, stare oko 3 mjeseca, trokratno su kalemljene kožom mužjaka, a zatim stavljane u rasplod. Pri kraju graviditeta, 4-5 dana prije okota mladih, ženke su intravenski injicirane sa 15 T.R. jedinica hijaluronidaze. Ženkama smo tokom graviditeta 3 puta uzimali uzorak krvi za određivanje titra hemaglutinina na eritrocite mužjaka. Uzorak krvi smo im uzimali i 2 puta nakon okota mladih. Iz ukupno 4 legla žrtvovali smo po 2-3 mlada štakora, stara 2 dana, da bismo dobili uzorke krvi za hemaglutinaciju. Pomiješali smo uzorke krvi koji su uzeti od mladih iz istog legla. Isti dan smo vadili i uzorak krvi iz repne vene njihovih majki. Kada je mladunčad dosegla dob od 25-30 dana, kalemili smo ih kožom obaju roditelja. Neposredno prije kalemljenja (0-dan), te 5, 11 i 21 dan nakon kalemljenja, mladim štakorima smo vadili uzorak krvi za aglutinacije sa eritrocitima obaju roditelja.

Osim opisane grupe BH u pokusnim rezultatima smo prikazali i mladunčad iz pokusne grupe B i dviju kontrolnih grupa, koje smo već opisali u prijašnjim pokusima (5.2. i 5.3.). Kontrolna grupa A (5.2.) daje nam podatke o odbacivanju roditeljskih kalema presađenih na mladunčad netretiranih majki. Druga je kontrolna grupa H (5.3.), a ona nam daje uvid u utjecaj hijaluronidaze na preživljavanje roditeljskih kalema. U pokusnoj grupi B (5.2.) majke su trokratno kalemljene kožom mužjaka, kao i u grupi BH, ali nisu injicirane hijaluronidazom, pa ova grupa služi za praćenje utjecaja kalemljenja samog.

#### 5.4.2. ODBACIVANJE RODITELJSKIH KALEMA

Na slici 10 prikazano je odbacivanje roditeljskih kalema, koji su presađeni na mlade. Kako su krivulje za grupe A, H i B već prethodno diskutirane, to ćemo više pažnje posvetiti grupi BH. Krivulja odbacivanja očevih kalema u grupi BH (slika 10a) znatno se razlikuje od krivulja za obje kontrolne grupe (A i H). Odbacivanje očevih kalema je sporije, a završava 21-og dana. No, tada je odbačeno samo 81% kalema, dok je preostalih 19% trajno prihvaćeno. Ova krivulja je vrlo slična krivulji za očeve kaleme u grupi B.

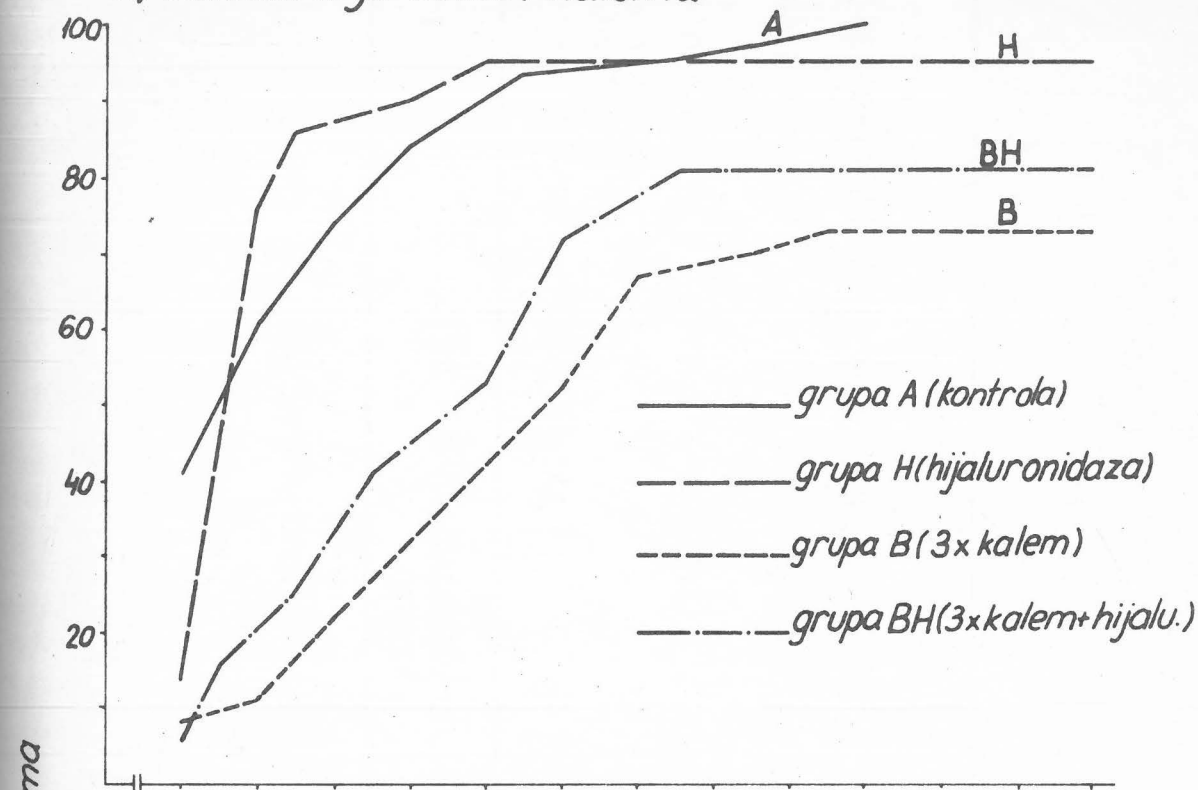
Na slici 10b prikazano je odbacivanje majčinih kalema. Ove krivulje se međusobno još više razlikuju, negoli krivulje za očeve kaleme. Krivulja odbacivanja majčinih kalema u grupi BH smještena je između krivulje za grupu H i krivuljâ za grupe A i B, koje su međusobno vrlo slične. Odbacivanje u grupi BH u početku je snažno izraženo (do 10-og dana), a zatim sporo napreduje do 17-og dana. Do tog dana je odbačeno 66% presađenih kalema, dok je preostalih 34% trajno prihvaćeno. Odbacivanje je najsporije u grupi H, a krivulja koja ga prikazuje je izrazito položena. U ovoj grupi je čak 73% kalema trajno prihvaćeno.

Obzirom na prije predložene kriterije tolerancije prema roditeljskim kalemima (4.3.) i mladunčad ovih grupa podijelili smo u 3 skupine: netolerantne, tolerantne i visoko tolerantne (Tablice IX i X). Na Tablicama su također prikazana srednja vremena odbacivanja (SVO), kao i značajnost razlika.

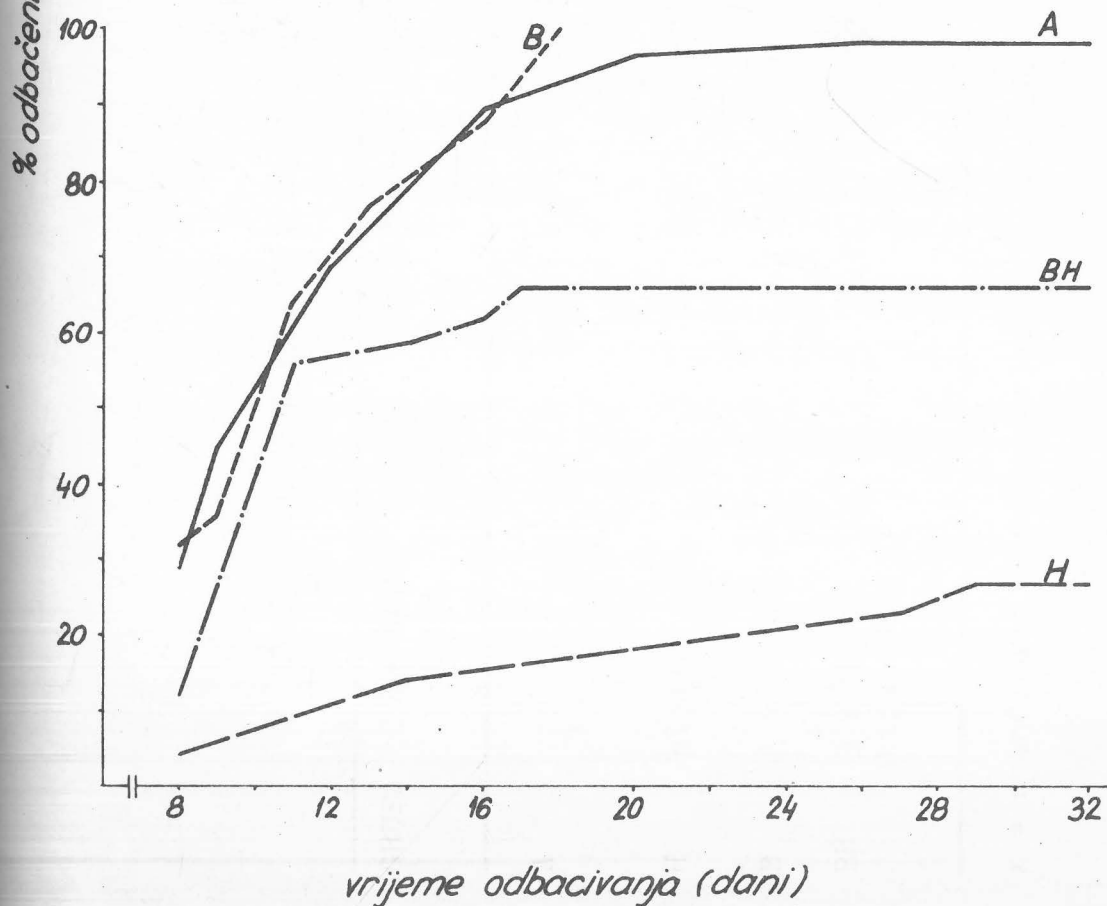
U kontrolnim grupama A i H slična je učestalost tolerancije prema očevim kalemima (Tablica IX). Grupe B i BH znatno se razlikuju od kontrolnih grupa. U ovim grupama je dvostruko niža učes-

# Dinamika odbacivanja roditeljskih kalema presadenih na mladunčad "Y"

## a) Odbacivanje očevih kalema



## b) Odbacivanje kalema majke





T A B L I C A IX

UČESTALOST TOLERANCIJE I SVO MLADIH ŠTAKORA "Y" NA KOŽNI KALEM OCA

GRUPA	TRETMAN MAJKI	BROJ MLADIH	NETOLERANTNI	TOLERANTNI	VISOKO TOLERANTNI	SVO $X \pm SP^x$	p
A	0	61	51 (81%)	10 (16%)	0	$11,0 \pm 0,5$	BH : A $\angle$ 0,01 BH : H $\angle$ 0,01 B : A $\angle$ 0,01
H	hijaluronid.	21	18 (86%)	2 (9%)	1 (5%)	$9,9 \pm 0,4$	B : H $\angle$ 0,01
B	3 x kalem	27	8 (30%)	12 (44%)	7 (26%)	$15,5 \pm 0,9$	B(otac):B(majka) $\angle$ 0,01
BH	3 x kalem + hijaluronid.	32	13 (41%)	13 (40%)	6 (19%)	$14,0 \pm 0,8$	BH(otac):BH(majka) $\angle$ 0,01

x = standardna pogreška aritmetičke sredine

talost netolerantnih, a znatno viša tolerantnih, nego u kontrolnim. Osim toga, u grupama B i BH pojavljuje se veći broj štakora koji su visoko tolerantni na očev kalem (26%, odnosno 19%). To sve govori o tendenciji k produženju života očevih kalema presađenih na mlade iz ovih grupa. To potvrđuju i rezultati SVO, koje je znatno produženo, iako za izračunavanje SVO nismo uzimali u obzir visoko tolerantne štakore, a oni se upravo u ovim grupama nalaze u većem broju. Razlike u vremenima odbacivanja između ovih grupa i obje kontrolne (A i H), statistički su vjerodostojne ( $p < 0,01$ ).

Na Tablici X izneseni su rezultati tolerancije na majčine kaleme. Zastupljenost mladih, obzirom na stupanj tolerancije prema majčinom kalem, slična je za grupe A i B. Za ove grupe je karakterističan visoki postotak netolerantnih štakora, a skoro potpuno odsustvo visoko tolerantnih. Visoko tolerantne na majčine kaleme nalazimo u grupama H i BH, u kojima su gravidne ženke injicirane hijaluronidazom. U grupi H je čak 73% štakora visoko tolerantnih na kalem majke, a svega 4% (1 štakor) pripada među netolerantne. U grupi BH je nešto drugačiji raspored štakora prema stupnju tolerancije na majčine kaleme. U ovoj grupi 56% mladih pripada među netolerantne, ali su ipak i visoko tolerantni znatno zastupljeni (34%). SVO majčinih kalema u grupi H iznosi 19 dana, što je izrazito produženje u usporedbi sa ostalim grupama ( $p < 0,01$ ). Ovaj rezultat se još jače ističe kada znamo da je u ovoj grupi čak 16 životinja, od ukupno 22, visoko tolerantnih na majčin kalem. Majčini kalemi u ovoj grupi preživljavaju značajno duže i kada se usporede sa očevim kalemima ( $p < 0,01$ ). SVO majčinih kalema u grupama A, B i BH, vrlo su slična, pa među njima nema značajnijih razlika. Interesantno je istaknuti da su ženke

T A B L I C A X  
 UČESTALOST TOLERANCIJE I SVO MLADIH ŠTAKORA "Y" NA KOŽNI KALEM MAJKE

GRUPA	TRETMAN MAJKI	BROJ MLADIH	NETOLERANTNI	TOLERANTNI	VISOKO TOLERANTNI	SVO $\bar{X} \pm SP^x$	p
A	0	62	45 (72%)	16 (26%)	1 (2%)	11,3 $\pm$ 0,5	
H	hijalorunidaza	22	1 (4%)	5 (23%)	16 (73%)	19,0 $\pm$ 3,0	H : A $\angle$ 0,01 H : B $\angle$ 0,01 H : BH $\angle$ 0,01
B	3 x kalem	28	22 (78%)	6 (22%)	0	11,2 $\pm$ 0,6	H(majka):H(otac) $\angle$ 0,01
BH	3 x kalem + hi- jalorunidaza	32	18 (56%)	3 (10%)	11 (34%)	10,3 $\pm$ 0,7	

x = standardna pogreška aritmetičke sredine

u grupi BH, isto kao i u grupi H, injicirane hijaluronidazom, pa ipak u grupi BH nije produženo SVO. Međutim, i u ovoj grupi nalazimo veliki broj štakora koji su visoko tolerantni na majčin kalem (11 od 32, odnosno 34%), a njih nismo uzeli u obzir pri izračunavanju SVO, kako je već rečeno.

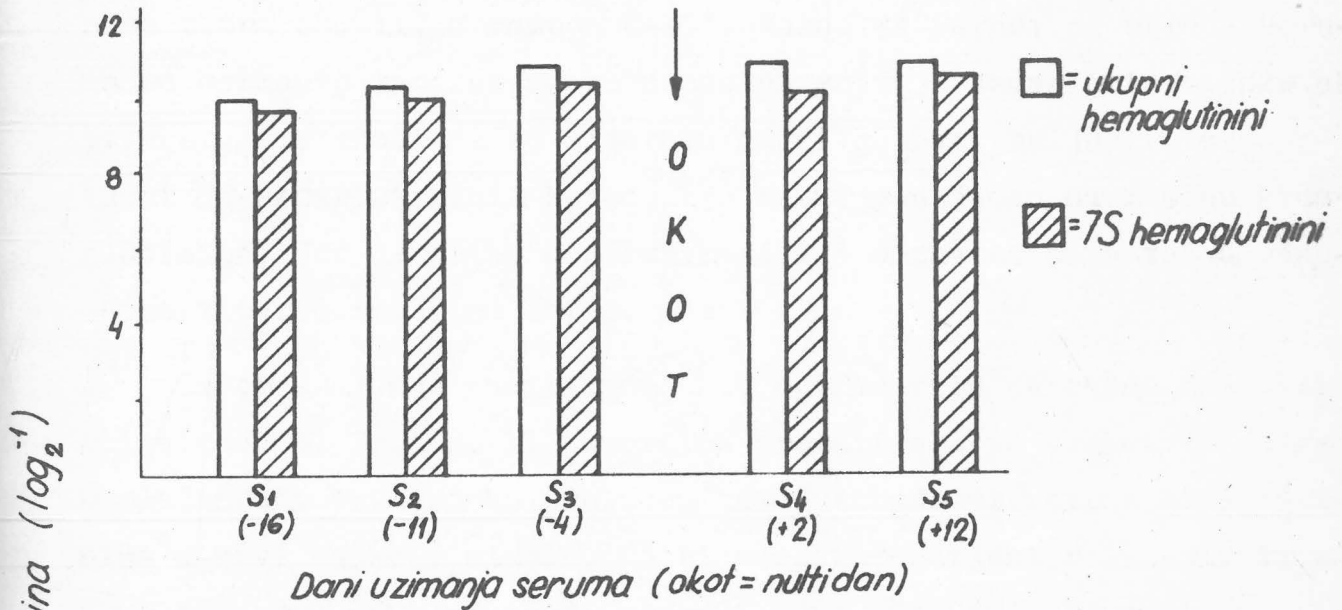
#### 5.4.3. PRODUKCIJA HEMAGLUTININA

Opisani rezultati produženja života očevog kalema, presađenog mladim u grupama B i BH, vrlo su slični već diskutiranim rezultatima za grupu 3G, iz pokusa na visokosrodnim štakorima (5.1.). Ženke su, u ovim grupama, identično senzibilizirane, trokratnim kalemljenjem kožom. Prije smo izložili pretpostavku da se ovo produženje možda može pripisati djelovanju humoralnih protutijela prenesenih iz organizma majke. Stoga u daljnjem tekstu iznosimo rezultate hemaglutinacijske aktivnosti krvnog seruma majki i njihove mladunčadi u grupi BH. U ovim pokusima odlučili smo se za hemaglutinacijsku metodu kao približno mjerilo jačine humoralnog odgovora, jer nije poznat pogodniji serološki test, koji bi dao bolji uvid u sve klase humoralnih protutijela stvorenih nakon senzibilizacije (Takasugi i Hildemann 1969a).

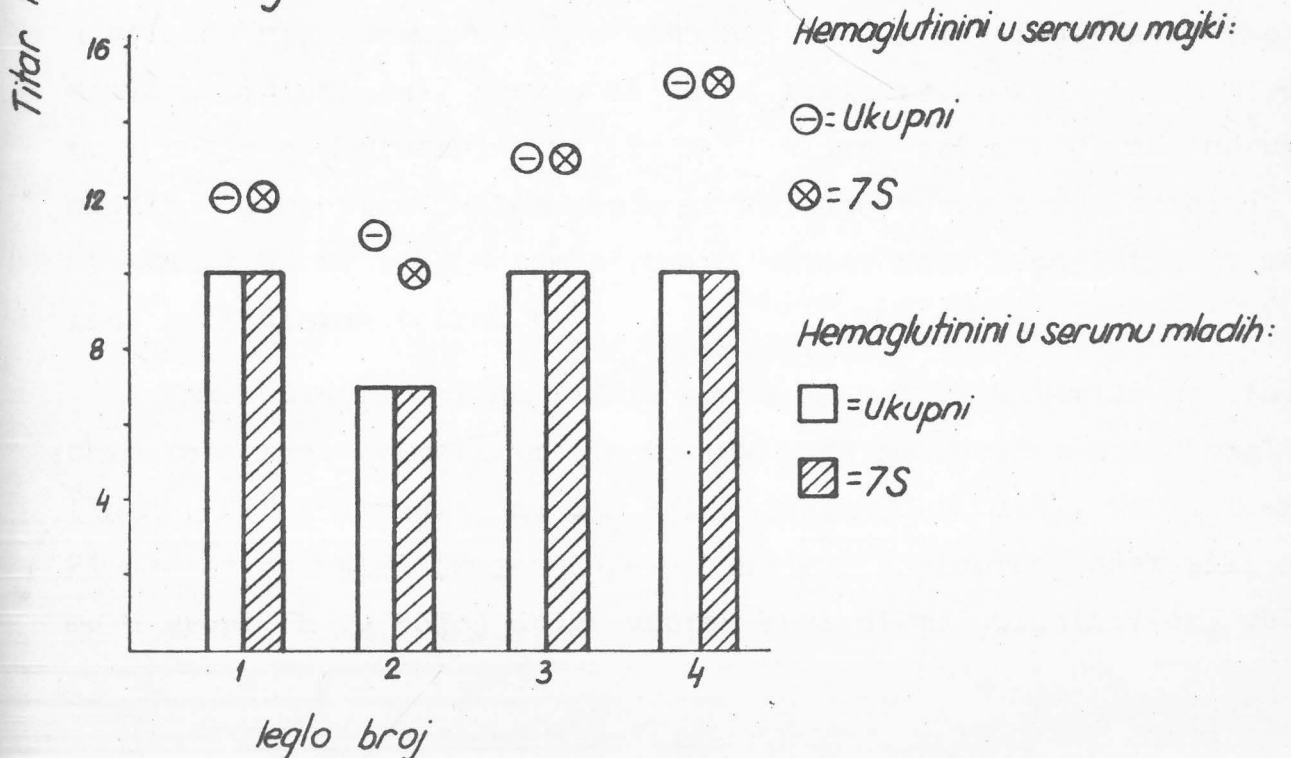
Nakon trokrotnog kalemljenja ženki iz grupe BH, kožnim kalemljenjem mužjaka, uzimali smo u 5 navrata uzorak njihove krvi za određivanje titra hemaglutinina prema eritrocitima mužjaka. Srednje vrijednosti titra hemaglutinina, izražene kao  $\log_2^{-1}$ , prikazane su na slici 11a. Nanesene su vrijednosti titra ukupnih hemaglutinina, kao i hemaglutinina malene molekularne težine (7S tipa). Ženkama su vađeni uzorci krvi 16, 11 i 4 dana prije okota mladih, te drugi i 12-i dan nakon okota. Iako je prilično dugo vremensko razdoblje

# Razina hemaglutinina u serumu majki grupe BH i njihov prijenos u mlade

a) Razina hemaglutinina u serumu majki u toku trudnoće i nakon okota



b) Razina ukupnih i 7S hemaglutinina u serumu majki i mladunčadi stare 2 dana



lje od ušivanja trećeg kalema do uzimanja zadnjeg uzorka krvi, i-  
pak titar hemaglutinina nije pokazivao znatnije promjene. Hemaglu-  
tinacijska aktivnost je u serumima vrlo visoka (prosječna vrijed-  
nost titra oko 11, a raspon 8-15). Važno je istaći da obrada seru-  
ma sa merkaptotanolom skoro uopće ne snizuje hemaglutinacijsku ak-  
tivnost, što znači da su u serumu majki gotovo isključivo zastup-  
ljeni 7S hemaglutinini. Porod nije bitnije utjecao na razinu hema-  
glutinina, jer je titar u serumima 4 i 5 neznatno porastao u odno-  
su na titar u serumima 1 i 2.

Za objašnjenje facilitacijskog učinka bilo je važno ispitati  
slijedeće: a) Prolaze li humoralna protutijela iz organizma majke  
u mladunčad, te b) ako prolaze, kakvi su odnosi razine hemagluti-  
nina u krvi majke i mladih. Da bi se o tome orjentirali uzimali smo  
i uzorak krvi od mladunčadi stare 2 dana, što smo objasnili u opi-  
su pokusnih grupa. Ovi rezultati su prikazani na slici 11b, a od-  
nose se na titar ukupnih i 7S hemaglutinina u serumu majki i njho-  
ve mladunčadi, iz 4 legla. Serum majke uvijek ima viši titar hema-  
glutinina nego serum njene mladunčadi. Serum majki je sadržavao sa-  
mo 7S hemaglutinine, izuzev majke iz legla br.2, koja ima u seru-  
mu i nešto hemaglutinina velike molekularne težine. Obrada seruma  
mladih s merkaptotanolom uopće ne snizuje titar hemaglutinina,  
što znači da se u njihovim serumima nalaze samo hemaglutinini ma-  
lene molekularne težine.

Nakon što smo mladunčad iz grupa A, H i BH kalemili roditelj-  
skim kalemima, uzimali smo im uzorak krvi za određivanje hemaglu-  
tinina. Krv smo vadili na dan kalemljenja (0-ti dan), te 7, 11 i  
21 dan nakon kalemljenja. Od ove šeme smo djelomično odstupili sa-  
mo u grupi BH, u kojoj drugi uzorak krvi nismo uzimali 7-og, već

5-og dana nakon kalemljenja. Slika 12 prikazuje razinu ukupnih i 7S hemaglutinina u serumu mladih protiv eritrocita majke (lijeva strana slike) i eritrocita oca (desna strana slike). Štakori u kontrolnoj grupi A nemaju prirodnih hemaglutinina protiv majčinih eritrocita, što se vidi iz aktivnosti seruma uzetog na dan kalemljenja ( $S_0$ ). Hemaglutinine već nalazimo u serumu uzetom 7-og dana nakon kalemljenja. U ovom serumu prevladavaju hemaglutinini velike molekularne težine, iako je već prisutna i produkcija 7S hemaglutinina. Hemaglutinacijska aktivnost seruma dostiže 11-og dana vrijednost titra od preko 7, a 21-og dana je samo neznatno viša. Potrebno je istaknuti da u serumu izvađenom 11-og dana, a posebno onom od 21-og dana, gotovo sva hemaglutinacijska aktivnost pripada hemaglutininima malene molekularne težine. Hemaglutinacijski odgovor u pokusnim grupama H i BH, prema eritrocitima majke, razlikuje se od opisane dinamike za grupu A, utoliko što je razina hemaglutinina u svim serumima niža negoli u grupi A.

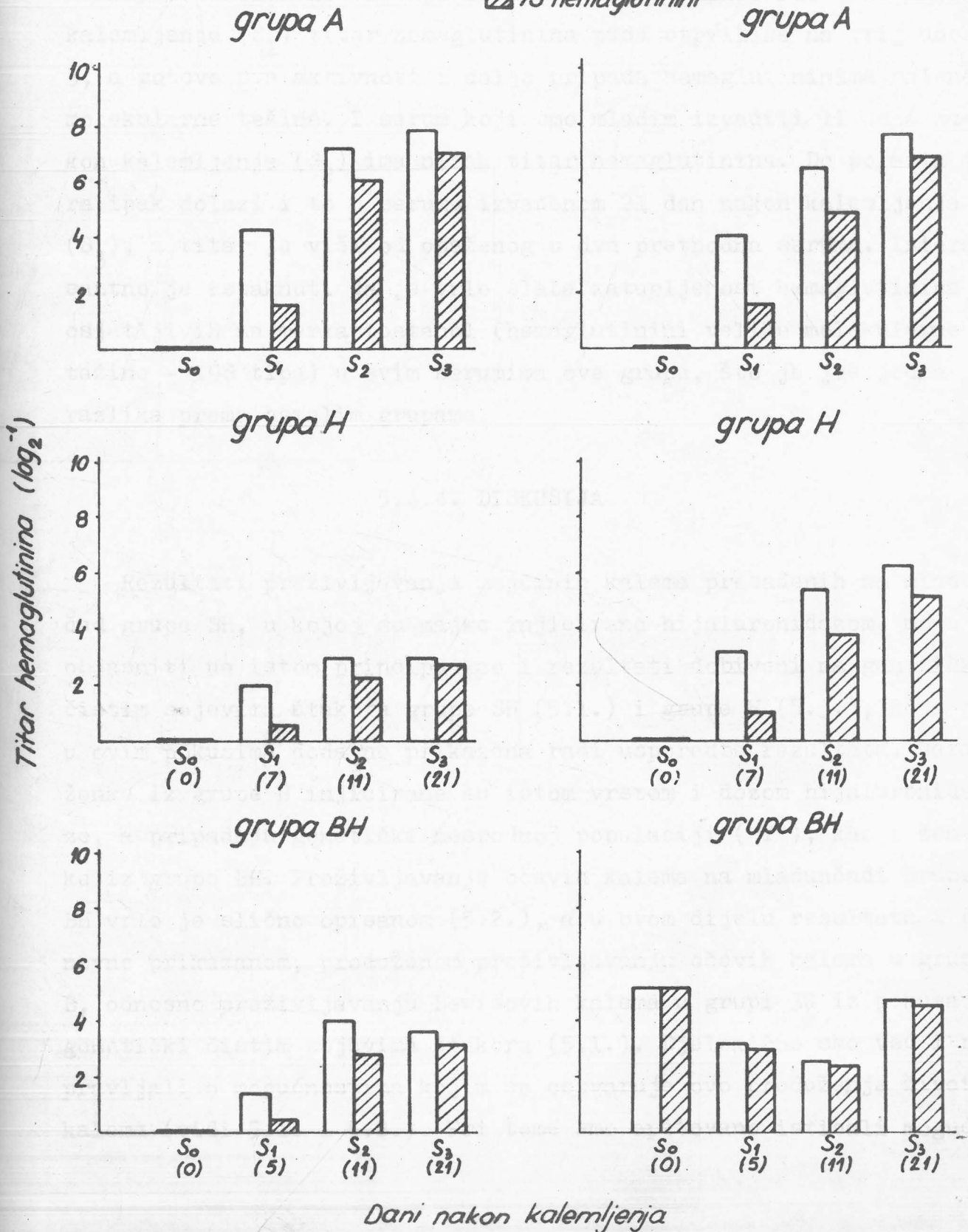
Dinamika stvaranja hemaglutinina protiv očevih eritrocita, u grupi A, vrlo je slična opisanoj dinamici za majčine eritrocite u istoj grupi (sl. 12). U serumu izvađenom na dan kalemljenja ne nalazimo hemaglutinine, a nakon kalemljenja titar im stalno raste i dostiže najvišu vrijednost 21-og dana. U tome serumu ( $S_2$ ), gotovo sva aktivnost hemaglutinina pripada protutijelima malene molekularne težine (7S tipa). Dinamika produkcije hemaglutinina u grupi H vrlo je slična opisanoj dinamici za grupu A. Jedino je u grupi H malo niža razina hemaglutinina u svim serumima nakon kalemljenja. Dio slike koji prikazuje hemaglutinine u pokusnoj grupi BH bitno se razlikuje od opisanih grupa, ne samo za eritrocite oca, već i majke. U ovoj grupi serum mladih  $S_0$  sadržava hemaglutinine protiv očevih eritrocita već i prije kalemljenja mladih sa njegovom

# Hemaglutinini u serumu mladih iz grupa A, H, i BH protiv eritrocita roditelja

ERITROCITI MAJKE

ERITROCITI OCA

□ ukupni hemaglutinini  
 ▨ 7S hemaglutinini



Dani nakon kalemjenja



kožom. Titar hemaglutinina u  $S_0$  iznosi oko 5, a obrada seruma sa merkaptotanolom ne mijenja razinu hemaglutinina. Pet dana nakon kalemljenja ( $S_1$ ) titar hemaglutinina pada otprilike na vrijednost 3, a gotovo sva aktivnost i dalje pripada hemaglutininima malene molekularne težine. I serum koji smo mladim izvadili 11 dana nakon kalemljenja ( $S_2$ ) ima nizak titar hemaglutinina. Do porasta titra ipak dolazi i to u serumu izvađenom 21 dan nakon kalemljenja ( $S_3$ ), a titar je viši od opaženog u dva prethodna seruma. Interesantno je istaknuti da je vrlo slaba zatupljenost hemaglutinina osjetljivih na merkaptotanol (hemaglutinini velike molekularne težine - 19S tipa) u svim serumima ove grupe, što je još jedna razlika prema ostalim grupama.

#### 5.4.4. DISKUSIJA

Rezultati preživljavanja majčinih kalema presađenih na mladunčad grupe BH, u kojoj su majke injicirane hijaluronidazom, mogu se objasniti na istom principu kao i rezultati dobiveni na genetički čistim sojevima štakora grupe SH (5.1.) i grupe H (5.3.), koja je u ovim pokusima dodatno prikazana radi usporedbe rezultata. Naime, ženke iz grupe H injicirane su istom vrstom i dozom hijaluronidaze, a pripadaju genetički nesrodnoj populaciji ("Y"), kao i ženke iz grupe BH. Preživljavanje očevih kalema na mladunčadi grupe BH vrlo je slično opisanom (5.2.), a u ovom dijelu rezultata i ponovno prikazanom, produženom preživljavanju očevih kalema u grupi B, odnosno preživljavanju Lewisovih kalema u grupi 3G iz pokusa na genetički čistim sojevima štakora (5.1.). Djelomično smo već i raspravljali o mogućnostima kojim se ostvaruje ovo produženje života kalema (vidi 5.1. i 5.2.). Pri tome smo opetovano isticali moguću

ulogu, u tom smislu, humoralnih protutijela koja se mogu prenijeti iz organizma majke u fetus i novorođenče, pa ćemo je sada i šire razmotriti u svjetlu opisanih rezultata. Stoga ćemo u diskusiji posebno obraditi prijenos majčinih protutijela i aktivni humoralni odgovor mladunčadi, a rezultate preživljavanja očevih kalema uglavnom ćemo razmotriti u ovisnosti o humoralnoj imunosti. Jasno je, već iz opisanih rezultata, da se to u prvom redu odnosi na rezultate u grupi BH.

Štakori genetički nesrodne populacije ("Y"), na kojim smo izvodili ove pokuse, međusobno se znatno razlikuju u antigenima tkivne srodnosti. O tome možemo zaključivati na temelju srednjeg vremena odbacivanja kožnih kalema (8,9 dana) izmjenjenih među odraslim štakorima, odabranim nasumce. Stoga i ne začuđuje nalaz visoke razine hemaglutinina u krvnom serumu majki grupe BH (prosječan titar oko 11). U sličnom pokusnom modelu, u grupi 3G, koju smo opisali u pokusima na visokosrodnim štakorima (5.1.), majke su imale dvostruko nižu razinu hemaglutinina u serumu (titar 5,2). Razina hemaglutinina u serumu ženki grupe BH kontinuirano je visoka, bez upadljivijih oscilacija, iako je vremensko razdoblje u kojem smo određivali protutijela prilično dugo (slika 11a). Skoro sva aktivnost hemaglutinina u serumu majki pripada klasi protutijela male molekularne težine, što se slaže sa mišljenjem većine autora da hiperimuni serum sadržava gotovo isključivo ova protutijela (Anderson i sur. 1967).

S obzirom na ovakav serološki nalaz u majki, logično je pretpostaviti da su protutijela koja smo utvrdili u serumu mladih pasivno prenesena iz organizma majke. Visoka razina hemaglutinina u serumu mladih (titar 7-10), ukazuje da je prijenos majčinih protu-

tijela prilično obiman. To se ipak nije odrazilo na razini protutijela u serumu majki pri kraju trudnoće i u postnatalnom razdoblju, kako je već rečeno. Stoga se može pretpostaviti da se u majci i dalje odvija produkcija protutijela. Ova produkcija protutijela mogla je biti potaknuta i samom trudnoćom, odnosno porodom. Tome u prilog govorili bi i rezultati Sazam-a i Breyere-a (1969), koji su utvrdili da se majčina tolerancija na dio antigena fetalnog porijekla, koji je mladunče naslijedilo od oca, može očitovati najranije 12-og dana gestacije. Kao što je poznato i akt poroda dovodi do pojačane izmjene stanica između mladog i majke (Kirby 1968), što također može potaknuti produkciju protutijela u majci. Uzorak krvi za serum 3 vadili smo 18-og dana trudnoće, a za serume 4 i 5 nakon poroda, tj. već u vrijeme kada je majka mogla odgovoriti jačom produkcijom protutijela i tako kompenzirati obiman prijenos u mlade. Postoje brojni podaci u literaturi koji ukazuju na mogućnost prijenosa majčinih protutijela u mladunčad sisavaca. U štackora se ovaj prijenos obavlja prenatalno kroz fetalne membrane, ali i postnatalno putem mlijeka (Halliday 1955b). Postnatalni prijenos je vjerojatno i znatno obimniji od prenatalnog, jer se majčina protutijela prenose do 21-og dana života mladunčeta, tj. skoro do prestanka dojenja (Halliday 1955a). Mi smo određivali titar hemaglutinina u mladunčadi stare 2 dana, pa možemo pretpostaviti da je visoka razina majčinih protutijela u njihovom serumu rezultat obimnog prenatalnog, ali i postnatalnog prijenosa. Prijenos majčinih protutijela iz mlijeka, preko sluznice crijeva, odvija se vrlo brzo, pa prenesena protutijela već nakon 3 sata dosegnu maksimalnu koncentraciju u krvi mladunčeta (Halliday 1957b). To možda i objašnjava visoku razinu protutijela u serumu mladunčadi. Protutijela koja se prenose preko mlijeka i stalno "dodaju" u cirkulacijski

sustav mladih, mogla bi podržavati relativno visoku koncentraciju hemaglutinina u njihovoj krvi. U serumu mladih smo pronašli samo hemaglutinine 7S tipa (slika 11b). Doduše i serumi majki sadržavaju uglavnom hemaglutinine 7S tipa. Serum majke iz legla br.2 imao je i nešto, iako vrlo malo, hemaglutinina velike molekularne težine, ali ni u serumu njene mladunčadi nismo našli ovih hemaglutinina. Prema tome, moglo bi se zaključiti da samo hemaglutinini malene molekularne težine prelaze u cirkulacijski sustav mladih. To se slaže sa mišljenjem da u većine sisavaca fetalne membrane služe kao "molekularno sito", koje u fetus propušta samo protutijela malene molekularne težine (Šterzl i Silverstein 1967). U štakora se makroglobulinska protutijela ne prenose ni postnatalno, jer je za njih sluznica crijeva nepropusna (Halliday i Kekwick 1957). Tako je osigurana efikasna barijera koja spriječava prijelaz majčinih makroglobulina u mladunčad štakora.

Prolaz majčinih protutijela, u našoj grupi BH, nije ograničen samo na rano postnatalno razdoblje. To potvrđuje nalaz hemaglutinina, usmjerenih na očeve eritrocite, u serumu mladunčadi  $S_0$ , koji je izvađen na dan ušivanja očevog kalema. Mladi su tada bili stari između 25 i 30 dana (slika 12). I u njihovom serumu nalazimo samo hemaglutinine 7S tipa, a titar ima vrijednost 5,2. Nismo istovremeno uzimali uzorak krvi od majki ove mladunčadi, pa ne znamo kolika je razina hemaglutinina u njihovom serumu. Serum majki  $S_5$ , koji smo vadili 12-i dan po okotu mladunčadi (slika 11a) imao je titar oko 11. Obzirom da su mladi kalemljeni prosječno 2 tjedna poslije uzimanja seruma  $S_5$  od majki, to se može pretpostaviti da razina protutijela u krvi majke nije znatnije opala. Tome u prilog govori i stabilnost razine majčinih hemaglutinina u prethodnom razdoblju, u kojem smo ih određivali. Prema tome, vje-

rojatno je da je razina hemaglutinina u krvi majke viša od razine hemaglutinina u krvi mladunčadi. To bi bilo u skladu i sa razlikama u titru hemaglutinina između majke i mladih, što smo ih imali u ranom postpartalnom razdoblju. Slične odnose u razinama hemaglutinina opazili su i drugi istraživači (Kaliss 1968). Kako postnatalni prijenos potpuno prestaje 21-og dana (Halliday 1955a), to je prošlo najmanje 4, a najviše 9 dana od prestanka prijenosa do uzimanja seruma  $S_0$  od mladih (serum je vađen 25-30 dana nakon okota). S obzirom da protutijela u serumu  $S_0$  mladih imaju relativno visoku razinu, to možda ukazuje da ih mladunče i sporo eliminira.

Nalaz protutijela prema očevim eritrocitima, u serumu mladih, prije nego što su kalemljeni njegovom kožom ( $S_0$ ), treba razmotriti u vezi s znatno dužim preživljavanjem očevih kalema u grupi BH (Tablica IX). S tog stajališta posebno je važan nalaz Kaliss-a (1958), dobiven u pokusima sa tumorskim tkivom, prema kojem je titar hemaglutinina protuseruma u pozitivnoj korelaciji s facilitacijskim učinkom. Među našim rezultatima u grupi BH takva korelacija između specifičnih hemaglutinina (serum  $S_0$ ) i preživljavanja očevog kalema ne postoji ( $r = -0,20$ ;  $p \geq 0,1$ ). Ovo odsustvo korelacije može značiti da hemaglutinini nisu odgovorni za opaženi facilitacijski učinak. Slično mišljenje izrazili su Kaliss i sur. (1963), koji su vršili pokuse sa tumorskim tkivom, na sličnom eksperimentalnom modelu kao što je naš. Oni su facilitaciju kalema mogli utvrditi u prisustvu visoke razine hemaglutinina, ali i onda kada u serumu uopće nije bilo hemaglutinina. Isti autori smatraju da je ova životna dob životinje (do prestanka dojenja) pogodna za očitovanje djelovanja prenesenih protutijela. Kada životinja

dosegne dob od 31 ili više dana, tada je sve manje vjerojatnosti da će facilitacija biti uspješna. No, i pored toga ne treba potpuno otkloniti ulogu hemaglutinina u produženju života kalema, pa tako i u ovom modelu.

Opisano smanjenje razine hemaglutinina, koje smo opazili 5-og dana po ušivanju očevog kalema na mladunčad grupe BH, moglo bi se pripisati njihovoj apsorpciji na antigene kožnog kalema. Tome u prilog može se iznijeti i mišljenje Moore-a (1965). On je utvrdio da 5-og dana nakon presađivanja kožnog kalema miševima, koje je prethodno injicirao protuserumom, dolazi do maksimalnog pada razine hemaglutinina. Moore i Pareira (1965) su višekratno imunizirali miševe alogenim splenocitima i tako inducirali snažnu produkciju i visoki titar hemaglutinina u njihovom serumu. Dobili su duže preživljavanje kožnih kalema, presađenih na senzibilizirane životinje, samo onda kada je u serumu, koji je izvađen 5-og dana nakon kalemljenja, bilo hemaglutinina, tj. ako ih kalem nije uspio potpuno "pokupiti" iz seruma. Moore i Pareira (1965) su dobili identične rezultate i u pokusima sa pasivnim prijenosom hiperimunog protuseruma u miševe, koje su zatim kalemili kožom. I naš serum koji smo izvadili 5-og dana mladim iz grupe BH, imao je niži titar hemaglutinina negoli serum prije kalemljenja (pad titra od 5,2 na 3,2), što se vjerojatno može objasniti apsorpcijom protutijela na antigene kalema. Važno je da je u serumu mladih bilo hemaglutinina i 5-og dana nakon kalemljenja, jer je takav nalaz po mišljenju Moore i Pareira (idem), od bitnog značenja za očitovanje facilitacijskog učinka.

Općenito se može reći da se znatno razlikuje produkcija hemaglutinina u grupi BH, od dinamike hemaglutinina u drugim pokusnim grupama. Za objašnjenje ovog nalaza treba detaljnije razmotri-

ti i karakteristike produkcije hemaglutinina u drugim grupama, kao i podatke iz literature koji se odnose na utjecaj prenesenih protutijela na aktivni humoralni odgovor. Hemaglutinini seruma 2 i 3, u grupama A i H, imaju znatno viši titar u odnosu na odgovarajuće serume u grupi BH. U grupama A i H svaki naredni serum ima višu razinu hemaglutinina u odnosu na prethodni. To pokazuje da se, u ovim grupama, stalno intenzivira produkcija hemaglutinina, što nije slučaj u grupi BH. U grupama A i H nismo našli hemaglutinine prije kalemljenja, što može biti od važnosti za vlastitu produkciju protutijela. Kako smo pretpostavili da se u grupi BH protutijela vežu za antigene kalema, što se je 5-og dana očitovalo u padu hemaglutinina, isto tako možemo pretpostaviti da su ova protutijela na neki način "ozidala" antigene kalema, pa tako spriječila njihov prijenos do imunih centara domaćina. Tako bi mogla i nešto zakasniti produkcija vlastitih hemaglutinina u grupi BH, jer je mnogo slabije potaknuta, što se odrazilo na njihovu razinu u serumu. To nije slučaj i u grupama A i H, jer su ovdje antigeni kalema mogli nesmetano dospjeti do centara imunog odgovora i tako poticati sve to jaču produkciju hemaglutinina. U grupama A i H mladunčad je relativno brzo odbacila očeve kaleme, što također može utjecati na dinamiku produkcije hemaglutinina i njihovu razinu u serumu. Povećanje produkcije hemaglutinina obično ide paralelno sa napredovanjem procesa odbacivanja kalema, a ponekad se hemaglutinini niti ne mogu utvrditi u serumu prije konačnog odbacivanja kalema (Moore 1965).

Grupa BH razlikuje se od grupâ A i H i po tome što u serumima mladih gotovo uopće ne nalazimo protutijela velike molekularne težine (19S). Poznato je da se u prvoj fazi humoralnog odgovora u serumu nalaze uglavnom 19S hemaglutinini. Produkcija 7S hema-

glutinina pojačava se tek u kasnijem razdoblju, a tada naglo pada razina 19S hemaglutinina (Kren i sur. 1968). U serumu 1 izvađenom u grupi BH praktički nema 19S hemaglutinina, dok isti serumi u grupama A i H ( $S_1$ ) imaju znatan sadržaj ovih protutijela. Ni ostali serumi u mladunčadi grupe BH nemaju 19S protutijela, bar ne u znatnijim količinama, što ih također razlikuje prema grupama A i H, posebno obzirom na  $S_2$ . Protutijela malene molekularne težine (7S), koja čitavo vrijeme dominiraju u serumu mladunčadi grupe BH, u početku su potjecala od majke. Međutim, u kasnijem razdoblju ova su protutijela mogla biti i aktivno producirana, posebno u serumima 2 i 3, jer i u grupama A i H ova protutijela dominiraju u kasnijem razdoblju nakon kalemljenja. Majčina protutijela, prenesena u mladunčad grupe BH, mogla su u prvoj fazi blokirati ili odgoditi aktivnu produkciju vlastitih hemaglutinina, što prvo pogoda 19S protutijela, jer ona prethode produkciji 7S hemaglutinina. Takvo su mišljenje izrazili i drugi autori, koji su pri tome posebno istakli ulogu 7S protutijela. Tako pasivno prenesena protutijela 7S tipa mogu spriječiti daljnju produkciju 19S protutijela, koja je u domaćinu već započeta ( Sahiar i Schwartz 1964 ). Pasivno prenesena protutijela mogu inhibirati i aktivnu produkciju 7S protutijela, ali im<sup>je</sup> efikasnost u tom smislu, mnogo manja ( Pearlman 1967 ). Ako to primijenimo na rezultate u grupi BH, onda bismo mogli pretpostaviti da je produkcija vlastitih protutijela 7S tipa odgođena i u početku oslabljena, a u kasnijem razdoblju se pojačava, što se očituje u porastu njihove razine u  $s_3$  mladunčadi.



Na temelju ovih razmatranja vidi se da je u grupi BH došlo do supresije hemaglutinacijskog odgovora mladih na eritrocite oca, što se manifestira u mnogo nižoj razini hemaglutinina u svim serumima nakon kalemljenja, kada ih se uspoređi sa odgovarajućim serumima u grupama A i H. Obzirom, pak, na prethodno diskutirane rezultate proživljavanja očevog kalema na mladunčadi ove grupe, mogli bismo zaključiti slijedeće: U grupi BH je preinačena imunološka reaktivnost mladih prema očevim tkivima, što se očituje na preosjetljivosti odgođenog tipa i humoralnoj imunosti.

Već smo na više mjesta ukazali na neke načine kojima bi se mogla ostvariti ova kompleksna promjena reaktivnosti mladih prema očevom tkivu. Treba se podsjetiti da smo o tome, s nešto općenitijeg stajališta, diskutirali i u prethodnim dijelovima radnje ( vidi 5.1. i 5.2. ). No, za potpunije tumačenje dobivenih rezultata treba iznijeti još neke podatke iz literature, a neke točke iz dosadašnje diskusije, u nešto drugačijem svjetlu, ponocno istaknuti. Tu u prvom redu mislimo na odnos antigen-protutijelo, te na facilitacijska protutijela. Tek tako se možemo približiti ispravnijem tumačenju mehanizma kojim su se mogle ostvariti ove promjene.

Opisana opća supresija humoralne i stanične imunosti, opažena u grupi BH, može se objasniti i interakcijom između antigema i protutijela. Poznato je da imunizirajući kompleksi koji se injiciraju u životinju, a sadrže mješavinu antigena i protutijela - sa suviškom protutijela, imaju manju antigenost negoli antigen sam ( Uhr i Baumann 1961b; Leskowitz 1960 ). Injiciranje protuti-

jela prije unošenja antigena, istovremeno sa njim, ili kratko vrijeme nakon antigena, dovodi do nekog atupnja imunološke tolerancije prema injiciranom antigenu ( Neiders i sur. 1962; Rowley i Fitch 1964 ). Ovaj učinak imaju sva protutijela, bez obzira na njihovu molekularnu težinu ( Uhr i Baumann 1961b; Rowley i Fitch 1964 ), ali su ipak 7S protutijela, u tom smislu, efikasnija ( Sahiar i Schwartz 1964; Finkelstein i Uhr 1964; Möller i Wigzell 1965 ). Majčina protutijela, koja su prenijeta u mladunčad grupe BH ( s<sub>0</sub> ), sadržavala su samo 7S hemaglutinine. Ova protutijela su bila prisutna u cirkulaciji mladih još i prije negoli su oni došli u kontakt sa očevim antigenima iz kožnog kalema. Nadalje, prisustvo hemaglutinina i u serumu 5-og dana, ( s<sub>1</sub> ), kada je maksimalan intenzitet spajanja protutijela iz seruma sa antigenima kalema ( Moore 1965 ), važan je dokaz da se pasivno prenesena protutijela analaze u suvišku. Inače, teško je pretpostaviti da su protutijela u serumu 5-og dana nastala vlastitom produkcijom, nakon stimulacije antigenom. U to možemo opravdano sumnjati iz više razloga: a/ prekratko je vremensko razdoblje između antigenne stimulacije ( ušivanja kalema ) i vađenja seruma ( 5 dana ); b/ "vezanje" prisutnih protutijela na antigene kalema otežava imuniziranje domaćina; c/ kada su pasivno prenesena protutijela u suvišku, tada inhibiraju vlastitu produkciju protutijela; d/ 19S protutijela nema u serumu koji je izvađen 5-og dana nakon kalem-ljenja. Sve navedene točke opširno smo razmotrili i objasnili u ovom tekstu.

U dosadašnjoj diskusiji isticali smo ulogu protutijela male molekularne težine ( 7S tipa ) u supresiji humoralne reaktiv-

nosti. Općenito smo govorili i o mogućoj ulozi ovih protutijela u facilitaciji presađenih kalema ( vidi 2.1.3. ). Već smo djelomično diskutirali i o razlozima koji su nas potakli da mislimo o mehanizmu imunološke facilitacije kao prihvatljivom objašnjenju naših rezultata. U daljnjem dijelu diskusije trebalo bi nešto više reći o svojstvima facilitacijskih protutijela i o načinu kojim se, prema našem mišljenju, ostvaruje facilitacija u ovim pokusima.

Može se smatrati sigurno da <sup>dokazanim</sup> facilitacijska protutijela spadaju u grupu protutijela malene molekularne težine ( Tokuda i McEntee 1967; Voisin i sur. 1969; Ovary 1966 ). Protutijela 7S tipa ne predstavljaju jedinstvenu frakciju imunoglobulina, a još nije sa sigurnošću utvrđeno koja od subklasa ove frakcije ima facilitacijsku ulogu. U tom smislu nedovoljno je istražena funkcija pojedinih subklasa 7S protutijela u štakora, ali se mnogo više zna o njihovoj ulozi u miša. Elektroforezom gamaglobulina miša mogu se razlučiti dvije subklase: gama 1 i gama 2 ( Fahey i sur. 1964a i b; Ovary i sur. 1965 ). Voisin i sur. ( 1969 ) pripisuju facilitacijski učinak primarno 7S gama 1 protutijelima, ali smatraju da i 7S gama 2 protutijela mogu djelovati facilitacijski, kada su zastupljena u niskim koncentracijama. Tokuda i McEntee ( 1967 ), međutim, smatraju da su, u tom pogledu, efikasnija 7S gama 2 protutijela. Daljnju podršku ovom mišljenju daju i radovi Takasugi i Hildemann-a ( 1969 a i b ). Isticali smo pripadnost facilitacijskih protutijela imunoglobulinima 7S tipa da bismo podvukli značenje ove činjenice za objašnjenje naših rezultata u grupi BH. Nismo određivali zastupljenost pojedinih

subklasa 7S protutijela, ali smo mogli zaključivati, na temelju hemaglutinacijske tehnike, o odnosima između protutijela velike i malene molekularne težine. Činjenica da smo u serumu ( $s_0$ ), mladih iz grupe BH, našli samo 7S hemaglutinine, govori u prilog prisutnosti i drugih protutijela malene molekularne težine, pa tako i facilitacijskih.

Za objašnjenje mehanizma kojim se imunološka facilitacija ostvaruje, predložene su teorije aferentne, centralne i eferentne inhibicije, o čemu smo u Općem dijelu opširnije govorili ( vidi 2.1.3. ). Čini nam se najprihvatljivijim tumačenje naših rezultata mehanizmom centralne inhibicije imunološkog odgovora. No, pri tome ne bismo potpuno isključili ni dodatni utjecaj aferentne i eferentne inhibicije, jer su mogli istovremeno djelovati na supresiju imunološkog odgovora. Pod centralnom inhibicijom misli se na djelovanje protuseruma na razini imunokompetentne stanice, a očituje se ili u promjeni imunološkog aparata, ili u promjeni biosintetskog kapaciteta imunog odgovora ( Billingham i sur. 1956 b ). Noviji radovi Takasugi i Hildemann-a ( 1969a i b ) dali su snažnu podršku centralnoj inhibiciji, kao vjerovatnom načinu na koji se facilitacija ostvaruje, iako nisu potpuno isključili ulogu aferentne i eferentne inhibicije. Slično misle i McKenzie i sur. ( 1971 ), na temelju pokusa sa normalnim tkivima. Smatraju da protutijela direktno djeluju na stanice limfnih čvorova ( centralna inhibicija ), a cirkulirajuća protutijela dodatno sprečavaju "brzi" dolazak antigena iz kalema u limfne čvorove ( aferentna inhibicija ). Prema njihovim rezultatima "ozidavanje" antigena kalema, što predstavlja eferentnu inhibiciju, ne može biti najvažnije mjesto na koje protutijela djeluju,

iako i to može imati neku ulogu u zaštiti kalema. Važno je podvući i njihovo mišljenje da je imunološki odgovor domaćina, prema antigenima kalema, prije odgođen, negoli inhibiran. SUpresija reakcije odbacivanja kalema, kao i produkcije humoralnih protutijela, koju smo opazili u grupi BH, privremenog je karaktera. U kasnijim fazama obje se reakcije oporavljaju, pa možemo tvrditi da su za neko vrijeme odgođene, a u intenzitetu znatno oslabljene. Teško je objasniti mehanizmom periferne inhibicije ovo izrazito slabljenje oba tipa imunološke reaktivnosti, pa djelovanje prenesenih protutijela na razini imunokompetentne stanice, ostaje kao najprihvatljivije tumačenje. Opažena visoka razina hemaglutinina mogla je pomoći u facilitaciji kalema, napr. vezanjem hemaglutinina za antigene kalema i otežavanjem prijenosa "oslobođenih" antigena do centara imunog odgovora. No, nije mogla u potpunosti objasniti facilitaciju jer nema nikakve korelacije između hemaglutinina i preživljavanja kalema. Prema tome, osnovno djelovanje treba pripisati facilitacijskim protutijelima, koja su istovremeno prisutna u serumu, a u tome su im mogla pomoći ne samo hemaglutinacijska, već i druga protutijela hiperimunog seruma. .

Od interesa je utvrditi i kakav je udio, u ovim rezultatima, imala hijaluronidaza, koju smo injicirali u gravidne ženke grupe BH. Treba ponovno istaknuti da su majke mladunčadi u grupi B identično senzibilizirane kao i majke u grupi BH, osim što nisu injicirane hijaluronidazom. Kako je bilo vidljivo iz razmatranja rezultata ( Tablica IX ) između ovih grupa ne postoje značajnije razlike u preživljavanju očevih kalema na mladunčad. Prema tome, na opisane učinke hijaluronidaza nije znatnije utjecala. To j

i razumljivo kada se podsjetimo da protutijela 7S tipa mogu slobodno, i bez pomoći hijaluronidaze, prolaziti preko fetalnih barijera u cirkulaciju mladih. Postnatalni prijenos protutijela, koji je i obimniji od prenatalnog, mogao se odvijati jednakim intenzitetom u obje grupe. No, ako hijaluronidaza nije utjecala na preživljavanje očevih kalema, njeno djelovanje se je moglo očitovati na preživljavanje majčinih kalema, o čemu će biti govora u nastavku diskusije.

Kožni kalemi majki, koji su istovremeno sa očevim kalemima presađeni na mladunčad, preživljavaju duže samo u grupama H i BH ( Tablica X ). Ovaj rezultat u grupi H smo već prethodno diskutirali, a pripisali smo ga utjecaju hijaluronidaze ( vidi 5.3. ). I gravidne ženke iz grupe BH također su injicirane hijaluronidazom. Već smo u diskusiji sličnog opažanja na genetički čistim sojevima štakora ( vidi 5.1. ), pretpostavili da se vjerovatno radi o prijenosu imunokompetentnih stanica preko propusnije placente, iz cirkulacije majke u fetalni krvotok. I u tim pokusima smo dobili produženje života kalema koji ima isti antigenski sastav kao i prenesene stanice. Produženje života kalema bilo je skromnije izraženo, negoli u grupi H, a ni jedna životinja nije trajno prihvatila presađeni kalem, kao u grupama H i BH. Smatrali smo da je te rezultat jakih razlika u tkivnoj srodnosti između prenesenih stanica i fetusa, pa je broj stanica bio nedovoljan za indukciju trajne tolerancije. Međutim, u grupama H i BH, hijaluronidazu smo injicirali u gravidne ženke heterozigotne populacije, pa smo mogli očekivati i povoljnije efekte na preživljavanje majčinih kalema, negoli u kombinaciji čistih sojeva koji se razlikuju na Rt H-1 lokusu. Kada su slabije razlike u antigenima tkivne srodnosti, između

stanica i domaćina, tada je toleranciju mnogo lakše inducirati, pa čak i sa manjim brojem stanica ( Woodruff 1960 ). Među prenesenim majčinih stanicama vjerovatno ima i imunokompetentnih, što je od posebnog značaja. Imunokompetentne stanice se mogu i u domaćinu <sup>pro</sup>reducirati, pa tako svojim prisustvom trajno održavati stanje tolerancije na tkiva koja imaju isti antigenski sastav kao i one ( Billingham i Silvers 1962b; Billingham i sur. 1962b). Na taj način se osigurava i trajna tolerancija ( visoko tolerantni ) na majčine kaleme u neke mladunčadi. U grupi H je i znatno viša vrijednost SVO **negoli** u drugim grupama ( Tablica X ), jer su mnoge od ovih životinja, prema našim kriterijima, tolerantne na majčine kaleme. Tolerancija nije fenomen "sve ili ništa", tj. ne moraju sve životinje koje su injicirane stanicama biti i trajno tolerantne ( visoko tolerantne ). Tolerancija se može pojaviti u svim stupnjevima, od vrlo slabe, do potpune ( Woodruff 1960 ).

U prilog iznesenog objašnjenja za rezultate tolerancije mladih prema majčinih kalemima, što smo našli u grupama H i BH, govore i naši pokusi u kojima smo određivali broj stanica, koji je potreban za izazivanje bolesti kržljanja ( Rukavina 1968; Rukavina i Vlahović 1968 ). Navedene pokuse smo također izvodili na genetički nesrodnoj populaciji štakora ("Y") i utvrdili da je najmanji broj stanica, koji je neophodan za indukciju bolesti kržljanja, iznosi  $8 \times 10^6$ . Maksimalnu učestalost bolesti ( 100 % ) moglo se očekivati, u uvjetima tih pokusa, tek nakon injiciranja više od 100 milijuna stanica. Ovi podaci ukazuju da je u genetički nesrodnoj populaciji vrlo teško očekivati povećaru djelotvornost injiciranih stanica ( toleranciju/bolest kržljanja ) paralelno sa

povećanjem njihovog broja. Sve kada bismo i pretpostavili da će hijaluronidaza dovesti do jednakog učinka unutar svakog legla, tj. do prijenosa istog broja majčinih stanica u sve fetuse, ipak ne bismo mogli očekivati jednako preživljavanje majčinih kalema. Jasno je da to još više dolazi do izražaja kada se promatraju rezultati na mladunčadi iz više legala, iako su njihove majke identično tretirane.

Interesantno je, da ni jedno mladunče nije pokazivalo znakove bolesti kržljanja, iako je broj visoko tolerantnih vrlo visok, posebno u grupi H ( 73 % ). Tolerancija i bolest kržljanja u suštini su samo dvije manifestacije istog procesa: ravnoteže ili poremećaja u ravnoteži između stanica domaćina i tuđih stanica ( Nakić 1962; Nakić i Silobrčić 1962; Nakić i sur. 1962; Voisin 1962 ). Moglo bi se misliti da je broj prenesenih majčinih stanica bio nedovoljan, u smislu naših prethodno citiranih rezultata ( Rukavina 1968; Rukavina i Vlahović 1968 ). Za razliku od tolerancije, bolest kržljanja je učestalija kada su genetičke razlike između primaoca i davaoca veće, tj. kada se radi o razlikama na jakim lokusima histokompatibilnosti ( Gowland 1965; Billingham i sur. 1960 i 1962b; Billingham i Silvers 1962b; Sinkowics i Howe 1964 ). Kako se, u našim pokusima, prenose majčine stanice, koje su djelomično slične sa fetusom, to <sup>se</sup> može lakše shvatiti veću učestalost visoko tolerantnih štakora, u grupama H i BH, a da pri tome ni jedno mladunče ne pokazuje znakove bolesti kržljanja. Moglo bi se misliti i da je broj prenesenih majčinih stanica, u datim odnosima u tkivnoj srodnosti, bio upravo dovoljan da se <sup>u</sup> neke mladunčadi uspostavi tolerancija ili visoka tolerancija, ali nedovoljan za indukciju bolesti kržljanja.



Pažljiva analiza rezultata preživljavanja majčinih kalema, u grupama H i BH, pokazuje da među njima postoje, pored diskutiranih sličnosti, i znatne razlike. Iako su gravidne ženke, u obje grupe, injicirane istom dozom hijaluronidaze, ipak se znatno razlikuje učestalost visoko tolerantnih na majčine kaleme. U grupi BH ima 34 % visoko tolerantnih, a u grupi H 73 % ( Tablica X ). No, to nije i jedina razlika, jer se razlikuju i SVO majčinih kalema. SVO u grupi H iznosi 19 dana, što je znatno duže nego u grupi BH ( 10,3 dana ). Kako pri izračunavanju SVO nismo uzimali u račun visoko tolerantne, koji su zastupljeni u obje grupe, to znači da i ostali štakori u grupi H mnogo duže nose majčine kaleme, negoli štakori iz grupe BH. Činjenica da hijaluronidaza nije ženkama injicirana u iste dane trudnoće, već 4-5 dana prije okotavanja mladih u grupi BH, a 2-4 dana u grupi H, teško da može objasniti ovako velike razlike. Prije bi se moglo misliti da je tome doprinijela razlika u tretmanu ženki iz ovih grupa. Naime, ženke iz grupe BH snažno su senzibilizirane, trokratnim kalemljenjem, na tkiva mužjaka, još i prije rasploda sa njim. Tako su imunokompetentne stanice majke, kojima je hijaluronidaza omogućila prijenos u fetuse, primile "informaciju" o stranim antigenima. Ove će stanice mnogo snažnije djelovati, negoli normalne-nesenzibilizirane stanice u mladim grupe H, protiv onog dijela građe, koji je fetus naslijedio od oca. Ovaj snažni imunološki atak ne treba smatrati bezopasnim za reaktivne stanice, o čemu postoje brojni dokazi. Tako Boyse ( 1959 ), te Gorer i Boyse ( 1959b ) smatraju da imunokompetentne stanice mogu pretrpjeti znatna oštećenja za vrijeme reakcije. Oni su opazili vrlo brzo iščezavanje prethodno

senzibiliziranih parentalnih stanica, koje su injicirane u  $F_1$  hibride. Kako je  $F_1$  hibrid genetički tolerantan na parentalne stanice, to se ni pomenuto eliminiranje ovih stanica ne može pripisati aktivnosti njegovog imunološkog sustava. Autori (idem) smatraju da je došlo do "alergijske smrti" injiciranih stanica u ponovnom kontaktu sa antigenima protiv kojih su senzibilizirane. Slično mišljenje izrazili su Matošić i Allegretti ( 1966 ), na temelju citološke analize rezultata pokusa na czraćenim miševima, koji su bili injicirani stanicama  $F_1$  hibrida. Možemo pretpostaviti da su<sup>i</sup> snažno senzibilizirane majčine imunokompetentne stanice, nakon kontakta sa fetalnim tkivima, prošle kroz fazu "iscrpljujuće" aktivnosti, što je moglo dovesti do njihovog bržeg eliminiranja, negoli u grupi H. Vjerovatno se je zbog toga trajni kimerizam mogao uspostaviti u mnogo manjem broju mladunčadi grupe BH, a njihova reaktivnost na majčine kaleme skoro da potseća na fenomen "sve ili ništa". Naime, u ovoj grupi nalazimo dvije skupine životinja: visokotolerantne ( 34 % ) i netolerantne ( 56 % ), dok je broj tolerantnih praktički zanemariv ( 10 % ).

Obzirom na ovu diskusiju o snažnoj reaktivnosti senzibiliziranih stanica, kao i na prethodno opisani nalaz visoke razine hemaglutinina u serumu majki i mladih grupe BH, moglo se je očekivati oštećenja mladunčadi bilo prenesenim humoralnim protutijelima ili stanicama. Takva oštećenja opažena su samo u mladunčadi iz 1 legla. Slično smo opažanje iznijeli i u opisu rezultata grupe B ( vidi 5.2. ), u kojoj je također mladunčad iz jednog legla uginula nekoliko dana nakon dcta. I mladi iz spomenutog legla grupe BH su bili kahektični i skoro skeletirani, iako su uzimali mlijeko. Koža im je bila žučkaste boje, a uginuli su u

prva 4 dana nakon okota. Njihova majka imala je u serumu vrlo visoku razinu hemaglutinina ( titar 16 ), a hemaglutinine u serumu mladih nismo odredili. Još je jedna ženka, iz grupe BH, imala tako visoku razinu hemaglutinina, ali njena mladunčad nije pokazivala nikakve promjene, u tom smislu. Obzirom da su majke iz grupe BH bile injicirane i hijaluronidazom, to nismo mogli utvrditi dali je oštećenje mladunčadi nastupilo zbog djelovanja majčinih stanica ili humoralnih protutijela. Da bismo to ipak utvrdili, stavili smo u rasplod 2 normalne ženke populacije "Y" sa mužjacima iz spomenuta 2 legla grupe BH. Kada su ženke bile visoko gravidne, injicirali smo ih, kroz 3 dana, sa ukupno 3,6 ml odgovarajućeg protuseruma, izvađenog od ovih ženki iz grupe BH. Taj protuserum je specifičan, jer je stvoren na tkivo oca mladunčadi. Serum majke, čiji su mladi uginuli, izazvao je, i u ovom pokusu, teška oštećenja mladih i njihovu smrt unutar 4 dana po okotu. Iako je serum druge ženke imao istu razinu hemaglutinina, njegov prijenos ni ovaj puta nije doveo do oštećenja mladih. Kako ove majke nisu injicirane hijaluronidazom, to opisana oštećenja mladih treba pripisati djelovanju humoralnih protutijela. Prema tome, i oštećenja mladih u odgovarajućem leglu grupe BH vjerovatno je, također, izazvano humoralnim protutijelima. Tome u prilog govori i vrlo kratko vrijeme unutar kog je uginula sva mladunčad. Opisana klinička slika mladunčadi podsjeća na hemolitički sindrom, koji je realtivno čest u kliničkoj praksi. Međutim, vrlo teško<sup>ga</sup> je izazvati spontano ( trudnoćom ) u drugih vrsta sisavaca. Mišljenje Kaliss-a i sur. ( 1963 ), da je tome razlog niska razina protutijela u serumu majki ne može

se prihvatiti u našim pokusima, jer su majke snažno senzibilizirane na očeva tkiva i posjeduju visoki titar protutijela. Može se pretpostaviti da je za ovakva oštećenja odlučan sastav protutijela u serumu, o čemu mi nemamo podatke, jer smo određivali samo hemaglutinine..Pri tome vjerojatno najveći utjecaj imaju specifične razlike u antigenima tkivne srodnosti, između majke i oca mladih, što je moglo doći do posebnog izražaja u opisanim kombinacijama.

Iako smo, na temelju ovih dodatnih pokusa, utvrdili da su za oštećenje mladih odgovorna humoralna protutijela, ipak začuđuje da u grupi BH nije bilo životinja sa znacima KFD reakcije. Čirjenica da su mnoge od majčinih stanica mogle pretrpjeti teška oštećenja, pa i brzo počleći u kontaktu sa fetalnim tkivima, ne može predstavljati adekvatno objašnjenje. Naime, Simonsen ( 1960 ) smatra da se bitno oštećenje domaćina, koji je injiciran imunokompetentnim stanicama, događa vrlo rano, Davanje imnog seruma ili imuniziranih stanica domaćinovog soja, u svrhu sprječavanja bolesti kržljanja, efikasno je samo 1-2 dana nakon injiciranja splenocita u novorođenčad miševa ( Russell 1962 ), što se slaže sa mišljenjem Simonsena. Možda bi reakcija senzibiliziranih stanica na fetalna tkiva, u grupi BH, bila i snažnija, a možda za fetuse/novorođenčad i fatalna, da mladunčad ove grupe nije bila zaštićena humoralnim protutijelima majke. Naime, ova su protutijela također stvorena na očeve antigene, pa prema tome mogu i djelovati na onu komponentu antigene građe koju je fetus naslijedio od oca. Ova protutijela su prenesena u fetuse i prije senzibiliziranih stanica, a prenose se i nakon što su majčine stanice prešle u cirkulaciju fetusa. Opetovano

smo naglašavali, a prema rezultatima i dokazali, da među ovim protutijelima ima i facilitacijskih, Mnogi autori pripisuju upravo ovim protutijelima, koja se stvaraju i za vrijeme normalne trudnoće, važnu ulogu u sprječavanju imunoloških oštećenja fetusa ( Kaliss i Dagg 1964 ). No, za vrijeme trudnoće može se manifestirati, u imunološkom sustavu majke, i stanična imunost. Tako je Sörén ( 1967 ) dobio intenzivnu KpD reakciju kada je injicirao limfatičke stanice multipare u odgovarajuće  $F_1$  hibride. Hellström i sur. ( 1969b ) su utvrdili da limfociti majke mogu oštetiti fetalne stanice, kada ih se zajedno uzgaja in vitro, što se inače ne događa in vivo. No, ako se u kulturu doda<sup>i</sup> serum majke, tada<sup>je</sup> opisani učinak limfocita znatno oslabljen ili inhibiran ( idem ). Prema tome, humoralna protutijela iz seruma majke sprječavaju očitovanje učinaka istovremeno prisutnih staničnih protutijela. Na temelju iznesenog mogli bismo pretpostaviti da su se prenesena facilitacijska, kao i druga protutijela ( napr. hemaglutinini ), u našoj grupi BH, **vezala** za većinu antigenih determinanti fetalnih stanica i tako ih "prekrila". Na taj način su fetalna tkiva bila donekle zaštićena od snažnog napada senzibiliziranih stanica majke, što je inače mogle imati i fatalne posljedice za fetuse.

Obzirom da smo majke ove mladunčadi senzibilizirali očevim tkivima, to se je moglo pretpostaviti da će ovako snažna senzibilizacija imati odraza i na tok same trudnoće. Tim više, što se i u kliničkoj praksi neki slučajevi višekratnih spontanijih abortusa pokušavaju objasniti reakcijom organizma majke, koja je senzibilizirana na antigene što ih je fetus naslijedio od oca. Međutim

ni u jednom slučaju nismo opazili spontane abortuse. Možda se i ovaj nalaz može objasniti istovremenim prisustvom humoralnih pa tako i facilitacijskih protutijela, u organizmu senzibilizirane majke. Naime humoralna protutijela bi mogla spriječiti učinak staničnih protutijela, po istom principu, kako smo to već objasnili u prethodnoj diskusiji, pa tako zaštititi fetuse od majčine reakcije odbacivanja.

6. ZAKLJUČNI PREGLED

Kako je vidljivo, iz izloženih pokusa, htjeli smo ispitati kako stanična i humoralna protutijela, koja se prenose iz organizma majke u mladunčad, utječu na njihovu reaktivnost prema alogenim tkivima. Pri tome smo pratili i stanični i humoralni odgovor mladih, jer su to nedjeljive komponente reakcije na presađeno alogeno tkivo. Na temelju rezultata ovih istraživanja, koja su obavljena u pokusima na genetički nesrodnim, kao i visokoprodnim štakorima, možemo iznijeti neke najvažnije, opće, zaključke.

#### A. PREŽIVLJAVANJE ALOKALEMA PRESAĐENIH MLADIM ŠTAKORIMA

a/ Višekratna senzibilizacija majke tkivima oca mladih ( trokratnim kalemljenjem kožom ili jednokratnim kalemljenjem i trokratnim injiciranjem krvnih stanica ) značajno produžuje život očevog kalema presađenog mladima (  $p < 0,01$  ). Ovaj učinak je specifičan, jer mladi odbacuju na uobičajeni način istovremeno presađeni majčin kalem. Mislimo da je za ovaj učinak odgovoran prijenos facilitacijskih protutijela iz organizma senzibilizirane majke, u mladunčad.

b/ Slabiji intenzitet stimulacije ženki ( jednokratno kalemljenje ili injiciranje krvnih stanica samih ) ne dovodi do produženja života očevih kalema na mladima.

c/ Trokratno kalemljenje ženki Y-59, Lewisovim kožnim kalemima, dovodi do značajnog produženja života Lewisovih kalema presađenih na mladunčad (  $p < 0,001$  ). Ovo opažanje je na razini opažanja iznesenog pod a/, pa se i tumači istim mehanizmom.



d/ Produženje života majčinih kalema, presađenih na mlade, može se postići injiciranjem gravidnih ženki hijaluronidazom (  $p < 0,01$  ). Pri tome mnoga mladunčad trajno prihvaća majčine kaleme. Ovaj nalaz se tumači specifičnom stečenom tolerancijom, koja nastaje kao rezultat kimerizma u mladunčadi. Spomenuti učinak je specifičan, jer mladi odbacuju na uobičajeni način istovremeno presađene očeve kaleme.

e/ Hijaluronidaza omogućuje i prijenos tuđih stanica ( Lewisovi splenociti ) injiciranih u visoko gravidne ženke Y-59, što se očituje u produženju života Lewisovih kalema presađenih na mladunčad (  $p < 0,001$  ). Isto se događa i sa Lewisovim splenocitima injiciranim u gravidne ženke genetički nesrodne populacije ( "Y" ), jer i njihova mladunčad duže nosi Lewisove kaleme (  $p < 0,05$  ).

#### B. HUMORALNA REAKTIVNOST MLADIH ŠTAKORA

a/ Hemaglutinacijska protutijela iz krvi majke prelaze u cirkulacijski sustav mladih. Razina hemaglutinina u serumu rođenoj mladunčadi niža je negoli u serumu njihovih majki. U serumu mladih mogu se utvrditi samo protutijela malene molekularne težine (7S tipa). Fetalne membrane i sluznica crijeva djeluje poput "molekularnog sita", koje propušta samo ova protutijela.

b/ Štakori genetički čistih sojeva, kao i nesrodni štakori, nakon senzibilizacije alogenim tkivom, prvo produciraju hemaglutinine velike molekularne težine ( 19S tipa ). Ubrzo zatim slijedi snažna produkcija 7S hemaglutinina. U serumima izvađenim 11-og i 21-og dana, nakon kalemljenja, skoro sva hemaglutini-

nacijska aktivnost pripada protutijelima 7S tipa.

c/ Pasivno prenesena majčina protutijela utječu na aktivni humoralni odgovor mladih prema istom, alogenom tkivu. Odgovor mladih nije potpuno inhibiran, već je oslabljen i vremenski odgođen. Naročito je pogođena produkcija hemaglutinina 19S tipa, koji se praktički niti ne nalaze u serumima mladih.

d/ Hemaglutinacijska protutijela, prenesena iz cirkulacije senzibilizirane majke u mlade, nisu odgovorna za produženo nošenje kalema presađenih mladima. Naime, preživljavanje kalema može biti produženo pri visokoj razini prenesenih hemaglutinina ali i onda kada ih<sup>se</sup> u serumu uopće ne može utvrditi.

e/ Produženo preživljavanje tuđih alokalema, na mladunčadi senzibiliziranih majki, treba pripisati prijenosu facilitacijskih protutijela. Iako ih nismo određivali u serumu majki i mladih, to ipak možemo tvrditi na temelju rezultata preživljavanja presađenih kalema. Produženo preživljavanje kalema tumačimo mehanizmom centralne inhibicije, tj. djelovanjem protutijela na razini imunokompetentne stanice.

### C. UČINAK PRENESENIH STANICA I STANIČNIH PROTUTIJELE

a/ Kako smo već istakli ( pod A.d ) prijenos majčinih stanica inducira u neke mladunčadi trajnu toleranciju ili produženje života majčinih kalema. Ako prenesene stanice potječu od majki koje su senzibilizirane tkivima mužjaka ( grupa BH - 5.4. ), tada je ovaj učinak slabiji, što se tumači "alergijskom smrću" reaktivnih stanica u ponovnom kontaktu sa očevim antigenima,

koji su zastupljeni na stanicama mladih.

b/ Ako se u mlade istovremeno prenosi dvije vrste stanica: majčine i Lewisove stanice (grupa SHY - 5.3.), tada će u mladome doći i do kompeticije između ovih stanica. U neke mladunčadi "prevladaju" majčine stanice, a u druge Lewisovi splenociti, što se očituje u duljem nošenju majčinih ili Lewisovih kalema. Neka mladunčad eliminira obje vrste stanica, što se očituje "normaliziranjem" reaktivnosti mladih na tkiva davaoca stanica. Nijedno mladunče nije istovremeno tolerantno na oba kalema, što znači da se obje vrste stanica ne mogu održati u limfatičkom aparatu mladih. Majčine stanice su ipak "povoljnije" za mlade, jer visoko tolerantne štakore nalazimo samo na majčine kaleme.

c/ Samo dio mladunčadi, koja je visoko tolerantna na prvi majčin kalem, trajno prihvaća i drugi kalem. Stoga se može pretpostaviti da je u ove mladunčadi kimerizam stabilan i trajan. Preostala mladunčad odbacuje ponovljeni kalem, iako je prvi kalem i dalje ostao prihvaćen. Ovaj nalaz tumači se mehanizmom adaptacije prvog kalema.

#### D. PATOLOŠKE MANIFESTACIJE NA MLADUNČADI

a/ Navedeni postupci senzibilizacije majki, kožnim kalemima i stanicama oca mladih, nisu doveli do spontanijh abortusa, tj. do odbacivanja fetusa kao alokalema. Pretpostavljamo da su istovremeno prisutna humoralna protutijela spriječila manifestiranje reakcije specifično senzibiliziranih majčinih imunokompetentnih stanica (staničnih protutijela), pa tako spriječila i oštećenja u tom smislu.

b/ Nijedno mladunče nije pokazivalo znakove KpD reakcije ( bolest kržljanja ), pa ni u slučaju prijenosa majčinih stanica koje su senzibilizirane na očevu komponentu građe fetusa. Vjerojatno je fetus bio zaštićen istovremeno prenesenim humoralnim protutijelima, koja su mogla "prekriti" antigene determinante, protiv kojih bi reagirale senzibilizirane stanice.

c/ Iako prenesena stanice nisu dovele do oštećenja mladih, i-pak su takva oštećenja nastala zbog humoralnih protutijela. Učestalost ovih oštećenja bila je vrlo niska, pojavila su se samo u 2 legla. Pasivni prijenos protuseruma majke iz jednog od ovih legala (grupa BH - 5.4. ), u drugu gravidnu majku, izazvao je istu kliničku sliku sa fatalnim ishodom. Visoka razina hemaglutinina u serumu ove majke ( titar 16 ) nije uzrok oštećenja mladih, jer mladunčad majke, koja je imala isto tako visoku razinu protutijela, nije pokazivala znakove oštećenja.

7. L I T E R A T U R A

- ALBERT F., G.I. LEJEUNE-LEDANT, P. MOUREAU i A. ANDRÉ, 1959,  
U : "Biological problems of grafting" (izd. Albert i  
Lejeune-Ledant), Blackwell, Oxford, str. 369-379
- ALGIRE, G.H., 1959, J.Natl.Cancer Inst., 23: 435
- AMOROSO E.C., 1952, u "Marshall's Physiology of Reproduction"  
(3rd ed.), vol.II: 127
- AMOS D.B., 1953, Brit.J.Exp.Path., 34: 455
- AMOS D.B., 1962, Ann. New York Acad.Sci., 97: 69
- AMOS D.B. i E.D. DAY, 1957, Ann. New York Acad.Sci., 64: 851
- AMOS D.B. i J.D. WAKEFIELD, 1958, J.Natl.Cancer Inst., 21: 657
- AMOS D.B. i J.D. WAKEFIELD, 1959, J.Natl.Cancer Inst., 22: 1077
- ANDERSON J.M., 1965, Nature, 206: 786
- ANDERSON J.M., 1970, Proc.Roy.Soc.(B), 176: 115
- ANDERSON B., H. WIGZELL i G. KLEIN, 1967, Transplantation, 5: 11
- ANDRESEN M.H. i C.W. MONROE, 1962, Amer.J.Obstet.Gynec., 84:1096
- ARCHER O.K., W.D. KELLY, B.W. PAPERMASTER i R.A. GOOD, 1963a,  
Federation Proc., 22: 599
- ARCHER O.K., D.E.R. SUTHERLAND i R.A. GOOD, 1963b, Nature,  
200: 337
- AVDALOVIĆ N., D. RUKAVINA i P. EBERHARDT, 1970, Proc.Soc.Exp.  
Biol.Med., 134: 943
- AXELRAD M.A., 1968, Immunology, 15: 159
- BARDAWIL W.A. i B.L. TOY, 1959, Ann. New York Acad.Sci., 80:197
- BARNES D.W.H., P.L.T.ILBERY i J.F. LOUITIT, 1958, Nature, 181: 488
- BARNES A.D. i P.L. KROHN, 1957, Proc.Roy.Soc.(B), 146: 505
- BASCH R.S. i C.A. STETSON, 1963, Transplantation, 1: 469
- BATCHELOR J.R., 1965, Brit.Med.Bull, 21: 100
- vanBekkum W.D., O. VOS i W.W.H. WEYZEN, 1959, J.Natl.Canc.Inst.,  
23: 75

- BELLANTI J.A., D.V. EITZMAN, J.B. ROBBINS i T.R. SMITH, 1963,  
J.Exptl.Med., 117: 479
- BERRIAN J.H. i L. BRENT, 1958, Ann. New York Acad.Sci., 73:654
- BILLINGHAM R.E., 1957, Ann. New York Acad.Sci., 64: 799
- BILLINGHAM R.E., 1961a, u "Transplantation of tissues and cells"  
(izd. Billingham i Silvers), The Wistar Inst.Press,  
str. 87-106
- BILLINGHAM R.E., 1961b, u "Transplantation of tissues and cells"  
(izd. Billingham i Silvers), The Wistar Inst. Press,  
str. 1-26
- BILLINGHAM R.E. i L. BRENT, 1959, Proc.Roy.Soc.(B), 242: 439
- BILLINGHAM R.E. i L. BRENT, 1956a, Brit.J.Exp.Path., 37: 566
- BILLINGHAM R.E. i L. BRENT, 1956b, Proc.Roy.Soc.(B), 146: 78
- BILLINGHAM R.E., L. BRENT i P.B. MEDAWAR, 1953, Nature,172:603
- BILLINGHAM R.E., L. BRENT i P.B. MEDAWAR, 1954, Proc.Roy.Soc.  
(B), 143: 58
- BILLINGHAM R.E., L. BRENT i P.B. MEDAWAR, 1956a, Phil.Tr.Roy.  
Soc.(London), 239: 357
- BILLINGHAM R.E., L. BRENT i P.B. MEDAWAR, 1956b, Transpl. Bull.,  
3: 84
- BILLINGHAM R.E., J.B. BROWN, V. DEFENDI, W.K. SILVERS i D. ST-  
EINMÜLLER, 1960, Ann. New York Acad.Sci., 87: 457
- BILLINGHAM R.E., V. DEFENDI, W.K. SILVERS i D. STEINMÜLLER,  
1962b, J.Natl.Canc.Inst., 28: 365
- BILLINGHAM R.E., B.A. HODGE i W.K. SILVERS, 1962a, Proc.Natl.  
Acad.Sci., 48: 138
- BILLINGHAM R.E., J. PALM i W.K. SILVERS, 1965, Science,147: 514
- BILLINGHAM R.E. i W.K. SILVERS, 1959, Transpl.Bull., 6: 399
- BILLINGHAM R.E. i W.K. SILVERS, 1960, J. Immunol., 85: 14

- BILLINGHAM R.E. i W.K. SILVERS, 1962a, u "Ciba found.symp. on transplantation"(izd. WOLSTENHOLME i CAMERON), Churchill, London, str. 90-108
- BILLINGHAM R.E. i W.K. SILVERS, 1962b, u "Mechanisms of immunological tolerance"(izd. Hašek i sur.), Publ.House Czech. Acad.Sci., Praha, str. 21-30
- BILLINGHAM R.E., W.K. SILVERS i D.B. WILSON, 1963, J.Exp.Med., 118: 397
- BILLINGHAM R.E. i E.M. SPARROW, 1955, J.Embryol.Exp.Morphol., 3: 265
- BILLINGTON W.D., 1965, J.Reprod.Fertil., 10: 343
- BOYD W.C., 1956, u "Fundamentals of Immunology", Intersc.Publ. Inc., New York, str. 379-452
- BOYSE E.A., 1959, Immunology, 2: 170
- BRAMBELL F.W.R., 1966, Lancet, 2: 1087
- BRAMBELL F.W.R. i R. HALLIDAY, 1956, Proc.Roy.Soc.(B), 145: 170
- BRAMBELL F.W.R., R. HALLIDAY, E.F. McCARTHY i R.A. KEKWICK, 1949, J.Physiol.(London), 108: 177
- BRAMBELL F.W.R., W.A. HEMMINGS, C.L. OAKLEY i R.R. PORTER, 1960, Proc.Roy.Soc.(B), 151: 478
- BRENT L., 1958, Progr.Allergy, 5: 271
- BRENT L. i P.B. MEDAWAR, 1962, Proc.Roy.Soc.(B), 155: 392
- BRENT L., P.B. MEDAWAR i M. RUSZKIEWICZ, 1962, u "Ciba found. Symp. on Transplantation" (izd. Wolstenholme i Cameron), Churchill, London, str. 6-19
- BRIGHT A.S. i A.H. MASER, 1961, Obstet.Gynec., 17: 316
- BREYERE J.E. i M.K. BARETT, 1960a, J.Natl.Canc.Inst., 24: 699
- BREYERE E.J. i M.K. BARETT, 1960b, J.Natl.Canc.Inst., 25: 1405
- BRIDGES R.A., R.M. CONDIE, S.J. ZAAK i R.A. GOOD, 1959, J.Lab. Clin.Med., 53: 313



- BURNETT F.M. i F. FENNER, 1949, The production of antibodies,  
(Monograph of the Walter and Eliza Hall Institute, Mel-  
bourn), MacMillan & Comp., Melbourne
- BURWELL R.G., 1962, Ann. New York Acad.Sci., 99: 821
- BUTLER N.R., M. BARR i A.T. GLENNY, 1954, Brit.Med.J., 1: 476
- CEPPELLINI R., 1968, u "Human Transplantation"(izd. Rapaport i  
Dausset), Grune & Straton, New York, str. 21
- CELADA F. i W.J. WELSHONS, 1962, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 48:326
- CHAN P.C.Y. i H.F. DEUTSCH, 1960, J.Immunol., 85: 37
- CHASE M.W., 1953, u "The nature and significance of the antibody  
response", Columbia Univ.Press, New York, str. 156
- CHUTNA J., 1959, Fol.Biol.(Praha), 5: 32
- CHUTNA J. i Z. POKORNA, 1961, Fol.Biol.(Praha), 7: 32
- CLEMENDSON C.J. i A. NELSON, u "Mechanisms in Radiobiology",1960,  
(izd.Errera i Forssberg),Acad.Press, New York, str.92-205
- CONGDON C.C., 1962, J.Natl.Canc.Inst., 28: 305
- COHEN I., H. BRAUTBAR i D. NELKEN, 1971,Transplantation,11:135
- CURRIE G.A., 1968, Proc.Roy.Soc.Med., 61: 1206
- CURZEN P., 1970, Proc.Roy.Soc.Med., 63: 65
- DAUSSET J., 1969, Vox Sang., 16: 263
- DAVIES D.A.L., 1967, Transplantation, 5: 31
- DESSAI R.G. i W.P. CREGER, 1963, Blood, 21: 665
- DIETRICH F.M. i W.O. WEIGLE, 1964, J.Immunol., 92: 167
- DIXON F.J. i W.O. WEIGLE, 1957, J.Exptl.Med., 105: 75
- DIXON F.J. i W.O. WEIGLE, 1959, J.Exptl.Med., 110: 139
- EBERHARDT P. i Š. VLAHOVIĆ, 1969, Proc.Yug.Immunol.Soc., 1: 20

- EGDAHL R.H., 1957, citirano prema GOOD R.A. i W.B. PAPERMASTER, 1964, str. 35
- EICHWALD E.J., 1963, u "Advances in Biol. and Medical Physics" (izd. Lawrence i Gofman), Acad.Press, New York and London, vol. 9, str. 93-205
- EICHWALD E.J. i C.R. SILMSER, 1955, Transpl.Bull., 2: 148
- EICHWALD E.J., B. WETZEL i E. LUSTGRAAF, 1966, Transplantation, 4: 530
- EVANS D.G. i J.W.G. SMITH, 1963, Brit.Med.Bull., 19: 225
- FAHEY J.L., J. WUNDERLICH i R. MISHELL, 1964a, J.Exp.Med., 120: 223
- FAHEY J.L., J. WUNDERLICH i R. MISHELL, 1964b, J.Exp.Med., 120: 243
- FINKELSTEIN M.S. i J.W. UHR, 1964, Science, 146: 67
- FISHER R.A., 1958, Statistical Methods for research workers, Hafner Publ.Comp., New York
- FISHMAN M., 1961, J.Exp.Med., 114: 837
- FISHMAN M. i F.L. ADLER, 1963, J.Exp.Med., 117: 592
- FISHMAN M., R.A. HAMMERSTROM i V.P. BOND, 1963, Nature, 198: 549
- FOWLER R.jr., W.K. SHUBERT i C.D. WEST, 1960, Ann. New York Acad Sci., 87: 403
- FRENCH M.E. i J.R. BATCHELOR, 1969, Lancet, 2: 1103
- FUDENBERG H.H. i H.G. KUNKEL, 1957, J.Exp.Med., 106: 689
- GABOUREL J.D., 1961, Cancer Res., 21: 506
- GALTON M., 1960, Lancet, 1: 495
- GIBSON T. i P.B. MEDAWAR, 1943, J.Anat.(London), 77: 299
- GITLIN D., F.S. ROSEN i J.G. Michael, 1963, Pediatrics, 31: 197

- GOOD R.A., 1966, Thymus, Experimental and Clinical Studies, Ciba Found.Symp., J.and A. Churchill, Ltd.
- GOOD R.A., W.D. KELLY i A.E. GABRIELSEN, 1962, u "Mechanisms of Cell and Tissue Dammage Produced by Immune Reactions" (izd. Grabar i Miescher), Benno Schwabe, Basel, str.353-384
- GOOD R.A. i B.W. PAPERMASTER, 1964, u "Advances in Immunology", (izd. Dixon i Humphrey), Acad.Press, New York, <sup>vol.4,</sup> str.1-115
- GOOD R.A., R.L. VARCO, J.B. AUST i S.J. ZACK, 1957, Ann.New York Acad.Sci., 64: 882
- GOODLIN R.C. i L. HERZENBERG, 1963, Transplantation, 2: 357
- GORER P.A., 1937, J.Path.Bact., 44: 691
- GORER P.A., 1938, J.Path.Bact., 47: 231
- GORER P.A., 1962, cit. po: VOISIN G.A., 1962, str.444
- GORER P.A. i E.A. BOYSE, 1959a, u "Biological problems of grafting"(izd. Albert i Medawar), Blackwell, Oxford, str.193
- GORER P.A i E.A. BOYSE, 1959b, Immunology, 2: 182
- GORER P.A., J.F. LOUITIT i H.S. MICKLEM, 1961, Transpl.Bull., 28: 139
- GORER P.A. i Z.B. MIKULSKA, 1954, Cancer Research, 14: 651
- GORER P.A. i P. O'GORMAN, 1956, Transpl.Bull., 3: 142
- GORDON I., 1960, Nature, 185: 118
- GOWANS J.L., 1962, Ann. New York Acad.Sci., 99: 432
- GOWANS J.L., B.M. GESNER i D.D. MCGREGOR, 1961, u "Biological activity of the leucocyte"(Ciba found. study group no. 10), Churchill, London, str. 32
- GOWANS J.L., D.D. MCGREGOR, D.M. COWEN i C.E. FORD, 1962, Nature, 196: 651
- GOWANS J.L., D.D. MCGREGOR i D.M. COWEN, 1963, u "The immunologically competent cell", (Ciba found.study group no. 16), Churchill, London, str.20

- GOWLAND G., 1965, Brit.Med.Bull., 21: 123
- GRAUSZ J.P., 1969, Med.Clin.North Am., 53: 1051
- HALASZ N.A. i M.J. ORLOFF, 1963, J.Exp.Med., 118: 353
- HALASZ N.A. i M.J. ORLOFF, 1965, J.Immunol., 94: 253
- HALLIDAY R., 1955a, Proc.Roy.Soc.(B), 143: 408
- HALLIDAY R., 1955b, Proc.Roy.Soc.(B), 144: 427
- HALLIDAY R., 1957a, J.Physiol.(London), 140: 44
- HALLIDAY R., 1957b, Proc.Roy.Soc.(B), 148: 92
- HALLIDAY R., 1959, J.Endocr., 18: 56
- HALLIDAY R. i R.A. KEKWICK, 1957, Proc.Roy.Soc.(B), 146: 431
- HANSON L.A., 1960, Intern.Arch.Allergy Appl.Immunol., 17: 45
- HANSON L.A. i B.G. JOHANSSON, 1962, Intern.Arch. Allergy Appl. Immunol., 20: 65
- HAŠEK M., 1953, Českoslov.Biol., 2: 25
- HAŠEK M., V. HAŠKOVA, A. LENGEROVA i A. VOJTIŠKOVA, 1962, u "Ci-ba found.symp. on Transplantation"(izd. Wolstenholme i Cameron), Churchill, London, str. 118-128
- HAŠEK M., T. HRABA i J. HOST, 1958, Ann.New York Acad.Sci., 73: 570
- HAŠEK M. i A. LENGEROVA, 1960, u "Mechanisms in Radiobiology" (izd. Errera i Forssberg), Acad.Press, New York, str. 207-227
- HAŠEK M., A. LENGEROVA i T. HRABA, 1961, u "Advances in Immunology"(izd. Taliaferro i Humphrey), Acad.Press, New York, vol. 1, str. 1-67
- HATHAWAY W.E., V.A. FULGINITI, C.W. PIERCE, J.H. GITHENS, D.S. PEARLMAN, F. MUSCHENHEIM i C.H. KEMEE, 1967, J.Am.Med. Assoc., 201: 1015
- HELSTRÖM I. i K.E. HELLSTRÖM, 1969, Intern.J.Cancer, 4: 587

- HELLSTRÖM I., K.E. HELLSTRÖM, C.A. EVANS, G.H. HEPPNER, G.E. PIERCE i J.P.S. YANG, 1969a, Proc.U.S.Nat.Acad.Sci., 62: 362
- HELLSTRÖM K.E., I. HELLSTRÖM i J. BRAUN, 1969b, Nature, 224: 914
- HELLSTRÖM I., K.E. HELLSTRÖM i G. PIERCE, 1968, Intern.J.Cancer, 3: 467
- HEMMINGS W.A. i R.E. JONES, 1962, Proc.Roy.Soc.(B), 157: 27
- HESLOP R.W., P.L. KROHN i E.M. SPARROW, 1954, J.Endocr., 10: 325
- HILDEMANN W.H. i R. HAAS, 1962, u "Mechanisms of immunological tolerance"(izd. Hašek i sur.), Publ.House Czech.Acad.Sci., Praha, str. 35-49
- HILDEMANN W.H., W.D. LINSOTT i M.J. MORLINO, 1962, u "Ciba found.symp. on Transplantation"(izd. Wolstenholme i Cameron), Churchill, London, str. 236-263
- HOWARD J.G. i D. MICHIE, 1962, Transpl.Bull., 29: 1
- IVANYI P. i J. DAUSSET, 1966, Vox sang., 11: 3
- IVANYI P. i P. DEMANT, 1965, Fol.Biol.(Praha), 11: 321
- IVANYI P. i D. IVANYI, 1961, Fol.Biol.(Praha), 7: 369
- JANKOVIĆ B.D., B.H. WAKSMAN i B.G. ARNASON, 1962, J.Exp.Med., 116: 159
- JUTILA J.W. i R.S. WEISER, 1962, J.Immunol., 88: 621
- KALIŠ N., 1956, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 42: 269
- KALIŠ N., 1957, Ann.New York Acad.Sci., 64: 977
- KALIŠ N., 1958, Cancer Res., 18: 992
- KALIŠ N., 1962, Ann.New York Acad.Sci., 101: 64
- KALIŠ N., 1966, Ann.New York Acad.Sci., 129: 155
- KALIŠ N., 1968, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 129: 83

- KALISS N., 1969, Intern.Rev.Exp.Path., 8: 241
- KALISS N. i B.F. BRYANT, 1958, J.Natl.Canc.Inst., 20: 691
- KALISS N i M.K. DAGG, 1964, Transplantation, 2: 416
- KALISS N., M.K. DAGG i J.H. STIMPFLING, 1963, Transplantation,  
1: 535
- KALISS N., N. MOLOMUT, J.L. HARRISS i S.D. GAULT, 1953, J.Natl.  
Canc.Inst., 13: 847
- KALISS N. i P. RUBINSTEIN, 1968, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 128:1214
- KANDUTSCH A.A. i J.H. STIMPFLING, u "Immunopathology"(izd. Gra-  
bar i Miescher),Grune & Straton,New York, str. 134-144
- KEČKEŠ S. i N. ALLEGRETTI, 1963, Int.J.Rad.Biol., 7: 561
- KIRBY D.R.S., 1968, u "Human transplantation"(izd. Rapaport i  
Dausset),Grune & Straton, New York, str. 565-587
- KIRBY D.R.S., W.D. BILLINGTON, S.BRADBURY i D.J. GOLDSTEIN,  
1964, Nature, 204: 548
- KIRBY D.R.S., W.D. BILLINGTON i D,A. JAMES, Transplantation,  
4: 713
- KONDIĆ-MITIN NADA; 1970, Disertacija (Prirodoslovno-matemetički  
fakultet), Zagreb
- KREN V., R. BRDIČKA i O. ŠTARK, 1968, Fol.Biol.(Praha),14: 274
- KRETSCHMER R.R. i R. PEREZ-TAMAYO, 1961, J.Exp.Med., 114: 509
- KRETSCHMER R.R. i R. PEREZ-TAMAYO, 1962, J.Exp.Med., 116: 879
- LALEZARI P.M., M. NUSSBAUM, S. GELMAN i T.H. SPAET, 1960, Blood,  
15: 236
- LAMM M.E. i P.A. SMALL, 1966, Biochem., 5: 267
- LANMAN J.T., J. DIRNSTEIN i S. FIKRIG, 1962, Ann. New York Acad.  
Sci., 99: 706
- LAWRENCE H.S., 1957, Ann. New York Acad.Sci., 64: 826
- LAWRENCE H.S., 1960, Physiol.Rev., 11: 207

- LECCE J.G., 1964, J.Nutr., 84: 43
- LECCE J.G. i D.O. MORGAN, 1962, J.Nutr., 78: 263
- LEE R.E. i J.J. VAZQUEZ, 1962, Lab.Invest., 11: 580
- LENGEROVA A., 1959, Fol.Biol.(Praha), 5: 18
- LENGEROVA A., 1960, Nature, 187: 160
- LEPOW M.L., R.J. WARREN, N. GREY, V.G. INGRAM i F.C. ROBBINS,  
1961, New Engl.J.Med., 264: 1071
- LESKOWITZ S., 1960, J.Immunol., 85: 56
- LOUTIT J.F. i H.S. MICKLEM, 1961, Brit.J.Exp.Pathol., 42: 577
- MAKINODAN T., 1957, J.Cell.Comp.Physiol., 50(suppl.1): 157
- MAKINODAN T. i W.J. PETERSON, 1964, J.Immunol., 93: 886
- MANNICK J.A. i R.H. EGDAHL, 1968, u "Human Transplantation"(izd.  
Rapaport i Dausset), Grune & Stratton, New York, str. 472
- MARLER E., C.A. NELSON i C. TANFORD, 1964, Biochem., 3: 279
- MATHÉ G., J.L. AMIEL, M. MATSUKURA i A.M. MÈRY, 1964, Brit.J.  
Haemat., 10: 257
- MATHÉ G., J.L. AMIEL, L. SCHWARZENBERG i sur., 1965, Blood, 25: 179
- MATOŠIĆ M. i N. ALLEGRETTI, 1966, Fol.Biol.(Praha), 12: 452
- MATOŠIĆ M., S. KEČKEŠ i N. ALLEGRETTI, 1967, Nature, 216: 371
- McKENZIE I.F.C., R. KOENE i H.J. WINN, 1971, Transpl.Proc., 3: 711
- McKHANN C.F., 1964, Transplantation, 2: 620
- MEDAWAR P.B., 1945, J.Anat.(London), 79: 157
- MEDAWAR P.B., 1948, Brit.J.Exp.Pathol., 29: 58
- MEDAWAR P.B., 1953, Symp.Soc.Exp.Biol., 7: 320
- MEDAWAR P.B., 1958a, Proc.Roy.Soc.(B), 148: 145
- MEDAWAR P.B., 1958b, u "The Harvey Lectures", ser. 52, str. 144
- MEDAWAR P.B., 1959a, u "Cellular and humoral aspects of hypersen-  
sitive states"(izd. Lawrence H.S.), Hoeber-Harper, New  
York, str. 504

- MEDAWAR P.B., 1959b, u "Biological problems of grafting" ( izd. Albert i Medawar), Blackwell, Oxford, str. 6
- MEDAWAR P.B., 1962, u "Mechanisms of immunological tolerance" (izd. Hašek M. i sur.), Publ.House Czech.Acad.Sci., Praha, str. 17-20
- MEDAWAR P.B., 1963a, Transplantation, 1: 21
- MEDAWAR P.B., 1963b, u "The immunologically competent cell: its nature and origin"(Ciba found. study group no. 16), Churchill, London, str. 1
- MEDAWAR P.B. i M.F.A. WOODRUFF, 1958, Immunology, 1: 27
- MILLER J.F.A.P., 1961, Lancet, 2: 748
- MILLER L.L. i W.F. BALE, 1954, J.Exp.Med., 99: 125
- MILLER F. i H. METZGER, 1965, J.Biol.Chem., 240: 3325
- MITCHISON N.A., 1954, Proc.Roy.Soc.(B), 142: 72
- MITCHISON N.A., 1955, J.Exp.Med., 102: 157
- MITCHISON N.A., 1959, u "Biological problems of grafting" ( izd. Albert i Medawar), Blackwell, Oxford, str. 596-670
- MITCHISON N.A. i O.L. DUBE, 1955, J.Exp.Med., 102: 179
- MÜLLER G., 1963a, J.Natl.Canc.Inst., 30: 1177
- MÜLLER G., 1963b, J.Natl.Canc.Inst., 30: 1205
- MÜLLER G., 1971, Transpl.Proc., 3: 15
- MÜLLER E. i G. MÜLLER, 1962, J.Exp.Med., 115: 527
- MÜLLER G. i H. WIGZELL, 1965, J.Exp.Med., 121: 969
- MONACO A.P., M.L. WOOD i P.S. RUSSELL, 1964, S.Forum, 15: 133
- MOORE D.B., 1965, Transplantation, 3: 74
- MOORE D.B. i M.D. PAREIRA, 1965, Transplantation, 3: 627
- MORRIS I.G., 1965, Proc.Roy.Soc.(B), 163: 402
- MURRAY J.E. i sur., 1962, Ann.Surg., 156: 337
- MURRAY J.E. i sur., 1964, Ann.Surg., 160: 449



- NAJARIAN J.S. i F.J. DIXON, 1963, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 112:136
- NAJARIAN J.S. i J.D. FELDMAN, 1962, Ann.New York Acad.Sci., 99:  
470
- NAKIĆ B., 1962, Ann.New York Acad.Sci., 99: 689
- NAKIĆ B., A. KAŠTELAN i N. AVDALOVIĆ, 1962, u "Ciba found.symp.  
on transplantation"(izd. Wolstenholme i Cameron), Chur-  
chill, London, str. 328-343
- NAKIĆ B., N. KONDIĆ-MITIN i M. HAUPTFELD, 1967, Yug.Physiol.  
Pharmacol.Acta, 3: 356
- NAKIĆ B. i V. SILOBRČIĆ, 1962, u "Mechanisms of immunological to-  
lerance"(izd. Hašek M. i sur.), Publ.House Czech.Acad.  
Sci., Praha, str. 337-343
- NATHAN P., E. GONZALEZ i B.F. MILLER, 1960, Nature, 188: 77
- NEIDERS M.E., D.A. ROWLEY i F.W. FITCH, 1962, J.Immunol., 88: 718
- NOSSAL G.J.V., 1957, Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 35: 549
- OSBORN J.J., J. DANCIS i J.F. JULIA, 1952a, Pediatrics, 9: 736
- OSBORN J.J., J. DANCIS i J.F. JULIA, 1952b, Pediatrics, 10: 328
- OVARY Z., 1966, Ann. New York Acad.Sci., 129: 776
- OVARY Z., W.F. BARTH i J.L. FAHEY, 1965, J.Immunol., 94: 410
- OWEN R.D., 1945, Science, 102: 400
- PALM J., 1961, u "Transplantation of tissues and cells"(izd. Bi-  
llingham i Silvers), Wistar Inst.Press, str. 113-130
- PAPERMASTER B.W. i R.A. GOOD, 1962, Nature, 196: 838
- PEARLMAN D.S., 1967, J.Exp.Med., 126: 127
- PERKINS F.T., R. YETTS i W. GAISFORD, 1958, Brit.Med.J., 2: 68
- PERKINS F.T., R. YETTS i W. GAISFORD, 1959, Brit.Med.J., 1: 680
- PETZ B., 1964, Osnovne statističke metode, Zagreb
- PIKE R.M. i M.L. SCHULZE, 1965, J.Immunol., 94: 31

- POPP D.M., 1967, Transplantation, 5: 300
- PORTER K.A., 1960, Nature, 185: 789
- PREHN R.T., 1960, J.Natl.Canc.Inst., 25: 883
- PREHN R.T. i J.M. MAIN, 1954, J.Natl.Canc.Inst., 15: 191
- PREHN R.T. i J.M. MAIN, 1958, J.Natl.Canc.Inst., 20: 207
- RAPAPORT F.T. i J.M. CONVERSE, 1958, Ann.Surg., 147: 273
- REJNEK J., 1964, Fol.Microb.(Praha), 9: 299
- RIHA I., 1962, u "Mechanisms of immunological tolerance"( izd. Hašek M. i sur.), Publ. House Czech.Acad.Sci., Praha, 103-106
- ROWLEY D.A. i F.W. FITCH, 1964, J.Exp.Med., 120: 987
- RUBINSTEIN P.A., A. PUZA, Š. VLAHOVIĆ i J.W. FERREBEE, 1964, Fol.Biol.(Praha), 10: 36
- RUKAVINA D., 1968, Magisterski rad, Medicinski fakultet Rijeka
- RUKAVINA D. i P. EBERHARDT, 1966, Acta Fac.Med.Flumin., 1: 117
- RUKAVINA D. i Š. VLAHOVIĆ, 1968, Acta Fac.Med.Flumin., 3/4: 91
- RUSSELL P.S., 1962, u "Ciba found.symp. on transplantation"(izd. Wolstenholme i Cameron), Churchill, London, str.350-383
- RUSSELL P.S. i A.P. MONACO, 1965, The Biology of Tissue Transplantation, Little Brown and Co., Boston
- SAHIAR K. i R.W. SCHWARTZ, 1964, Science, 145: 395
- SAHIAR K. i R.W. SCHWARTZ, 1965, J.Immunol., 95: 345
- SAZAMA K.P. i E.J. BREYERE, 1969, Transplantation, 8: 502
- SELL S. i W.O. WEIGLE, 1959, J.Immunol., 83: 257
- SHERKARCHI I.C. i T. MAKINODAN, 1958, Rad.Res., 9: 181
- SHRECK R., 1958, Arch.Path., 66: 569
- SILVERSTEIN A.M. i K.L. KRANER, 1965, u "Molecular and cellular basis of antibody formation"(izd. Šterzl J. i sur.), Publ.House Czech.Acad.Sci., Praha, str. 341-348

- SILVERSTEIN A.M. i R.A. PRENDERGAST, 1964, J.Exp.Med., 119: 955  
SILVERSTEIN A.M., R.A. PRENDERGAST i K.L. KRANER, 1963, Science,  
142: 1172
- SIMMONS R.L. i P.S. RUSSELL, 1962, Ann.New York Acad.Sci., 99:717  
SIMMONS R.L. i P.S. RUSSELL, 1963, Amer.J.Obstet.Gynec., 85:583  
SIMONSEN M., 1960, Ann. New York Acad.Sci., 87: 382  
SIMONSEN M., 1962, Progr.Allergy, 6: 349  
SINKOVICS J.G. i C.D. HOWE, 1964, Texas Rep. on Biol.Med., 22:591  
SMITH R.T., 1960, u "Ciba found.symp. on cellular aspects of imm-  
unity"(izd. Wolstenholme i O'Conor), Churchill, Lon-  
don, str. 348-368  
SMITH R.T., 1961, <sup>u</sup>Advances in Immunology,(izd. Taliaferro i Hum-  
phrey), Academic Press, New York, vol.1, str. 67-129  
SNELL G.D., 1948, J.Genetics, 49: 87  
SNELL G.D., 1956a, Transpl.Bull., 3: 29  
SNELL G.D., 1956b, Transpl.Bull., 3: 83  
SNELL G.D., 1957, Ann.Rev.Microbiol., 11: 439  
SNELL G.D., P. SMITH i F.J. GABRIELSON, 1953, J.Natl.Canc.Inst.,  
14: 457
- SÖREN L., 1967, Nature, 213: 621  
STASTNY P., 1963, Federation Proc., 22; 273  
STASTNY P., 1965, J.Immunol., 95: 929  
STAVITSKY A.B., u "Advances in Immunology"(izd. Taliaferro i Hum-  
phrey), Acad.Press, New York i London, vol.1, str.211-261  
STEINMULLER D., 1962, Ann. New York Acad.Sci., 99: 629  
STEINMULLER D. i L. WEINER, 1963, Transplantation, 1: 97  
STETSON C.A., 1963, u "Advances in Immunology"(izd. Dixon i Hum-  
phrey), Acad.Press, New York i London, vol.3, str.97-130  
STETSON C.A. i R. DEMOPOULOS, 1958, Ann.New York Acad.Sci., 73:687  
STETSON C.A. i E. JENSEN, 1960, Ann.New York Acad.Sci., 87: 249

- STIMPFLING J.H. i A. RICHARDSON, 1967, Transplantation, 5: 1496
- STONE H. i sur., 1965, Science, 148: 1335
- STONER R.D. i G. TERRES, 1960, J.Immunol., 91: 761
- ŠTARK O. i M. HAUPTFELD, 1969, Fol.Biol.(Praha), 15:35
- ŠTARK O. i V. KREN, 1967a, Fol.Biol.(Praha), 13: 299
- ŠTARK O. i V. KREN, 1967b, Fol.Biol.(Praha), 13: 306
- ŠTARK O. i V. KREN, 1967c, Fol.Biol.(Praha), 13: 312
- ŠTARK O., V. KREN, B. FRENZEL i R. BRDIČKA, 1968, u "Advance in transplantation", Munksgaard, Copenhagen, str. 331
- ŠTERZL J., J. KOSTKA, L. MANDEL, I. RIHA i M. HOLUB, 1960, u "Mechanisms of antibody formation"(izd. Holub i Jarošková), Publ.House Czech.Acad.Sci.,Praha, str. 130-145
- ŠTERZL J. i A.M. SILVERSTEIN, 1967, u "Advances in Immunology" (izd. Dixon i Humphrey), Acad.Press, New York i London, vol. 6, str. 337-460
- TAI C. i N.A. HALASZ, 1967, Science, 158: 125
- TAKASUGI M. i W.H. HILDEMANN, 1969a, J.Natl.Canc.Inst., 43: 843
- TAKASUGI M. i W.H. HILDEMANN, 1969b, J.Natl.Canc.Inst., 43: 857
- TERASAKI P.I., E.J. BOLD, J.A. CANNON i W.P. LONGMIRE jr., 1961, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 106: 133
- TERASAKI P.I. i D.P. SINGAL, 1969, Ann.Rev.Med., 20: 175
- TERASAKI P.I., D.L. VREDEVOE i M.R. MICKY, 1967, Transplantation, 5: 1057
- TERRES G. i R.D. STONER, 1962, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 109: 88
- TERRES G. i W. WOLINS, 1961, J.Immunol., 86: 361
- TOKUDA S. i P.F. McENTEE, 1967, Transplantation, 5: 606
- TRNKA Z. i J. ŠTERZL, 1960, u "Mechanisms of antibody formation" (izd. Holub i Jarošková), Publ.House Czech.Acad.Sci., Praha, str. 190-194

TURK J.L., 1967, Transplantation, 5: 952.

UHR J.W. i J.B. BAUMANN, 1961a, J.Exp.Med., 113: 959

UHR J.W. i J.B. BAUMANN, 1961b, J.Exp.Med., 113: 935

UPHOFF D.E., L.P. PRESS i R. LIEBERMAN, 1965, J.Natl.Canc.Inst.,  
35: 695

VLAHOVIĆ Š., 1968, Medicina, 5: 161

VLAHOVIĆ V., 1968, Medicina, 5: 309

VLAHOVIĆ V., O. BELEZNAY i M. JURETIĆ, 1968, Vox Sang., 15: 59

VLAHOVIĆ Š. i D. RUKAVINA, 1970, Fol.Biol.(Praha), 16: 330

VLAHOVIĆ Š. i M. SABOL, 1968, Acta Fac.Med.Flumin., 3/4: 71

VLAHOVIĆ Š. i V. VLAHOVIĆ, 1969, u "Imunologija i transplantaci-  
ja", Jug. Akad. znanosti i umjetnosti, Zagreb, str.  
183-191

VLAHOVIĆ Š., V. VLAHOVIĆ i J.W. FERREBEE, 1964, Transplantation,  
2: 644

VLAHOVIĆ Š., V. VLAHOVIĆ i N. LEMPERT, 1965, Fol.Biol.(Praha),  
11: 452

VOISIN G.A., 1962, u "Mechanisms of immunological tolerance"(izd.  
Hašek M. i sur.), Publ.House Czech.Acad.Sci., Praha,  
str. 435-455

VOISIN G.A., R. KINSKY, F. JANSEN i C. BERNARD, 1969, Transplan-  
tation, 8: 618

VUČIĆ D., 1970, Magisterski rad, Prirodoslovno-matematički fakul-  
tet, Zagreb

VOS O., M.J. DeVRIES, J.C. COLLENTEUR i D.V. vanBekum, 1959,  
J.Natl.Canc.Inst., 23: 53

VRANIĆ-SERDAR, 1960, Statističke metode, Zagreb

- WAKEFIELD J.D. i D.B. AMOS, 1958, Proc.Am.Assoc.Cancer Res.,  
2: 354
- WALKER J.G. i G.W. SISKIND, 1968, Immunology, 14: 21
- WALLACH D.F.H. i V. VLAHOVIĆ, 1967, Nature, 216: 182
- WEBER R.A., J.A. CANNON i W.P. LONGMIRE, 1954, Ann.Surg., 139: 473
- WINN H.J., 1962, Ann. New York Acad.Sci., 101: 23
- WINN H.J., 1970, Transpl.Proc., 2: 83
- WOODRUFF M.F.A., 1960, "Transplantation of Tissues and Organs",  
C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, str. 118-  
137
- WOODRUFF M.F.A. i B. LENNOX, 1959, Lancet, 2: 476
- WOODRUFF M.F.A. i L.O. SIMPSON, 1955, Brit.J.Exp.Path., 36: 494
- ZAK S.J. i R.A. GOOD, 1959, J.Clin.Invest., 38: 579