

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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:188:865139>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



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 rod. 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

Br.strana, slika, grafikona,
tablica i lit.
Ustanova ili mjesto gdje je
izradena
Naučna disciplina iz koje je
postignut doktorat nauka
Fakultet na kojem je obranjena

"Fiziologija reaktivnosti mladih
štakora na alogenih kalem nakon
senzibilizacije majke"
176 strana, 12 slika i grafikona,
10 tablica i 17 str. lit.
Zavod za fiziologiju Medicinskog
fakulteta u Rijeci
doktorat medicinskih nauka iz
područja Fiziologija
Medicinski fakultet - Rijeka

III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme
Datum predaje rada
Datum sjednice Vijeća na kojoj
je rad prihvaćen za disertaciju
Sastav Komisije koja je rad
ocjenila

Datum obrane rada
Sastav Komisije pred kojom je
rad obranjen

Datum promocije

19. I 1970. godine
11. XI 1971. godine

12. I 1972. godine
dr Šime Vlahović, izv.prof., dr
Nikša Allegretti, red.prof. i
Davor Perović, red.prof.
24. siječnja 1972. godine
dr Šime Vlahović, izv.prof., dr
Nikša Allegretti, red.prof. i
Davor Perović, red.prof.

3. III 1972.

Ova disertacija izrađena je u cijelosti u Zavodu za fizilogiju 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 Mickić, 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 Ž 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 transplantacijskoj reakciji</u>	6
2.1.2.2. <u>Uloga humoralnih protutijela u transplantacijskoj 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. STEĆENA IMUNOLOŠKA TOLERANCIJA.....	30
2.2.3. SAZRIJEVANJE IMUNOLOŠKOG ODGOVORA.....	35
2.2.4. UTJECAJ IMUNOSTI MAJKE NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI.....	38
3. O B R A Z L O Ž 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 PRESAĐENE KALEME</u>	52

	stranica
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 DEKSTRONOM)</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, PRENESENIH IZ ORGANIZMA MAJKE, NA IMUNOLOŠKU REAKTIVNOST MLADUNČADI. POKUSI NA GENETIČKI ČISTIM SOJE- VIMA 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 PRO- TUTIJELA: HUMORALNIH I STANIČNIH, NA IMUNO- LOŠKU 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. Z A K L J U Č N I P R E G L E D	155
7. L I T E R A T U R A	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 mладунчeta 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 prepusteni utjecaju, ponekad čak i vrlo agresivne, okoline. Jasan je da pri tom ne možemo zanemariti utjecaj prvobitne fizio-loške veze s majkom na reaktivnost bilo kojeg njegovog funkcionalnog sustava. Takvih utjecaja nije lišena ni imunološka reaktivnost mладунчeta. Štoviše, dobro je poznata zaštitna uloga pasivno prenijetih protutijela iz majke. No, ta adoptirana imunost majke, može, čini se, znatno utjecati i na konačno uspostavljanje vlastite imunološke reaktivnosti mладе životinje. Može se stoga pretpostaviti da će i drugi oblici imunoloških reakcija mладунчeta ovisiti i o imunološkoj kompetenciji majke.

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

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 tki-
vo općenito. Pri tome se posebno opisuje uloga stanica i uloga
humoralnih protutijela u transplantacijskoj reakciji, jer fizi-
ološke veze između majke i fetusa, odnosno mладунčeta omoguća-
vaju prijenos i jednih i drugih. U drugom dijelu se govori o
osobitim oblicima reaktivnosti organizma sisavaca u perinatal-
noj dobi. Tu se pored kratkog prikaza saznanja o sazrijevanju
imunološke reaktivnosti posebno razmatra položaj fetusa kao
prirodnog alogenog kalema i stečena imunološka tolerancija. Ko-
načno, navode se i oni podaci koji nam omogućavaju uvid u poz-
nate utjecaje majčine imunosti na imunološku reaktivnost mla-
dunčadi.

2. O P C 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 kalem-a. 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 uvjek 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 proizvodi gena tkivne srodnosti. Odbacivanje presađenog alokalema predstavlja imunosni odgovor domaćina koji je usmjeren baš na antigene tkivne srodnosti koji su prisutni na kalemjenom tkivu, a udsutni u domaćinu (Berrian i Brent 1958;

Snell 1957; Palm 1961; Batchelor 1965; Hašek i sur. 1961; Russell i Monaco 1965.). Međutim, svi geni, odnosno antigeni jedne jedinke 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 pre-sađenog kalema bez nekih posebnih mjera rezultira samo jedimo 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 ko-jeg 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 odba-civanje kalema mužjaka. Kalem ženke presađen na mužjaka, unutar čistog soja, normalno se prihvata, jer mužjak je genetički to-lerantan na antigene determinirane spolnim X kromozomom. Ovo o-pažanje poznato je kao Eichwald-Silmserov fenomen (Eichwald i Silmser 1955; Billingham i Silvers 1960; Snell 1956a.).

U zadnjih tridesetak godina, od radova Gorera (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 najsnažniji, pa uzrokuju vrlo snažni imuni odgovor primaoca. Intenzitet imunog odgovora u miša nalazi se u korelaciјi sa brzinom odbacivanja alokalema^X 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 (Stark 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

^X Prema terminologiji predloženoj od Gorera i sur (1961) alokalemi su kalemi koji se presadjuju 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 nativne 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 ujetovan 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 anatomsку podlogu imunosnih reakcija.

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

ili kao suspenzija pojedinačnih stаница, о чему овise osobine imunološkog odgovora, па и начин 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 djelovima teksta (vidi: 4.2.). Važno je naglasiti da se orto-alotopno ušiven 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 antiga (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 kontekstu regionalnih limfnih čvoro-va 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 antiga, 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 imunos- ti (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 imunošku 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 stаницa 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 zadrže 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 transplantacijske 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 reaktiv, 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 zaštитilo od hematopoetske smrti (Vos i sur. 1959; VanBeekum 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 novookoćenoj životinji. Takav mladi organizam, imunološki nezreo, ne može reagirati na unos tuđeg tkiva, već ga prihvata 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. Potome 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 alogen tkivo, što potvrđuju brojni eksperimenti, ipak se čini da nisu i jedini faktori 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 alogen ^{solidno} 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 mišu. U toku transplantacijske reakcije u mišu 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 mišu predodređuje dvije vrste antigena: antigene koji imaju svojstva hemaglutinina i one koji predstavljaju antogene 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 mišu nalaze se i na eritrocitima. Za razliku od ovih rezultata iz pokusa na miševima, mnogo je nejasnija situacija u drugih 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 (Stark 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 ABO sistemu osnovni preduvjet za uspješnu funkciju presadenog alokalema (Russell i Monaco 1965).

Vrlo je teško preciznije opisati ulogu humoralnih protutijela u transplantacijskoj reakciji, jer to ovisi o nizu činilaca. Protutijela iz imunog seruma mogu doprinijeti skraćenju, ali i produženju života presađenog alokalema, što ovisi o izvoru, 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 istraživanje 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 poteškoćama. Kada konačno protutijela i komplement, koji su prošli u komoricu, dostignu određeni nivo, mnoge vrste alogenih stanica 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, negoli 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 tumorskim stanicama. Na djelovanje humoralnih protutijela posebno 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 cito-toksi~~ki~~ 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 njihovo djelovanje i nakon što su stanice disocirane(Winn 1970). Čini se, da osjetljivost tumora na humoralna protutijela više ovisi o koncentraciji antiga 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 i 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; Stets~~ky~~ 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 njegovoј 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.).

Kalemjenje kožnim kalemima najjednostavniji je i najčešći upotrebljavani postupak u 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 imuniziranom primaocu, (Stetson i Demopoulos 1953). 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 kalemjenja). 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 malobrojnim 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 (1961) 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 produkcijom plazma stanica i specifičnih protutijela na stimulaciju antigenom. Sposobnost za većinu reakcija odgođenog tipa doduše 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 pro- učena, 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 biološku svoju aktivnost ako se izlože djelovanju 2-merkaptoetanola, 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), hemijska 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 uspehu 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 1956ⁱ; Kaliss i sur. 1957, 1953). Oni su uspjeli produžiti život presađenog allogenog 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 humorálnih 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 tumor-ska tkiva. No, ovaj izbor modela nije slučajan. Poznato je, nai-me, 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 periferno i centralne inhibicije. Periferna inhibicija može biti aferentna ili eferentna, već prema tome, dali blokira aferentni ili efferentni 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 antigenu 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" antogene, 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 pre-sađivanja 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). Producenje 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 pos-tupkom 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. Producenje 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 presadevnih 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 naslijedja). Budući da je organizam majke imunološki potpuno zreo i sposoban da odbaci genetički strano tkivo, to je logično pretpostaviti da fetus može doživiti 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 mладунčad 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). Presadjivanje kalema tuđeg tkiva neprirodan je događaj za organizam. Kalemjenje 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). Mechanizam ove tolerancije nije dovoljno objašnjen. Mnoge teorije o tom mehanizmu samo ukazuju na moguće pristupe ovom problemu.

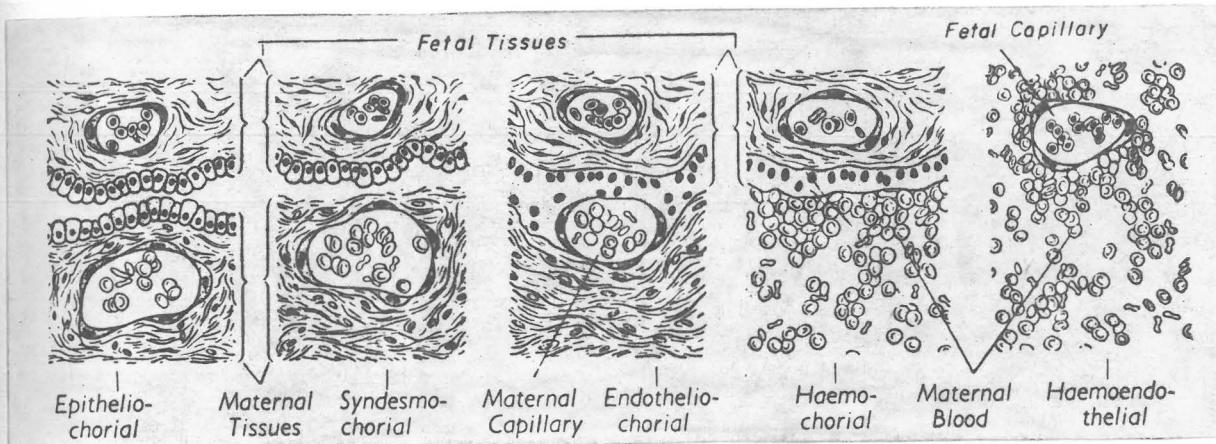
Čini se da je najprihvatljivije razmišljati o interakciji brojnih faktora koji se međusobno dopunjaju, što ćemo razmotriti u dalnjem tekstu.

Već je u Općem dijelu naglašeno (vidi 2.1.2.1.), da kalemi koji se presađuju u tzv. "povlaštena" mjesto kao napr. u vrećice na obrazima hrčka, mozak i prednju očnu komoru, imaju izgleda da duže prežive. To se objašnjava bilo specifičnom građom tih mesta 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 zmetka, ipak on nije neophodan za normalan tok trudnoće. Dobro je pozнато да uznapredovala abdominalna trudnoća može završiti rođenjem donešenog djeteta carskim rezom (Bright i Maser 1961). Ovaj podatak ipak ne isključuje zaštitnu ulogu uterusa, što provistiće 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 stечene 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 životinjskim vrsta. Utoliko je od interesa klasifikacija placentâ u različitim vrsta sisavaca, na temelju tkivnih slojeva što su umetnuti (slika 1).

Slika 1.

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



Prema: Amoroso (1952)

Tablica I prikazuje nešto modificiranu klasifikaciju placentā 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 placentā 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 placentā 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 zaštитiti fetus od majčine imunološke aktivnosti, usmjerenе 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. Kalemi fetalnog tkiva F_1 hibrida na životnjama majčinog soja, koje su prethodno senzibilizirane antigenima očevog soja, bivaju redovito razorenici. Isto se dešava i sa kalemima placentarnog tkiva. Važnu iznimku, u tom pogledu, čini baš tkivo trofoblasta, koje ne samo da nije razorenici, već mu je i rast unaprijedjen do te mjeri 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 mišu 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 ~~zakrivljeno imuno~~ loški reagirati na većinu tudićih 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 Barett (1960 a i b) su pokazali da ponovljene heterospecifične trudnoće slabе 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. STEĆENA 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 prihvata 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 mладунчад u perinatalnoj dobi (Billingham 1961a; Hildemann i Haas 1962; Hašek i sur. 1958). Toleranciju je moguće izazvati u toj životnoj dobi, jer sposobnost mладог организма da imunološki reagira još nije funkcionalno sazrela, pa se tuđe injicirane stanice prihvataju 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 opisac 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 sinhorijalni 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, uvezši u obzir ove rezultate, postavili opću teoriju imunološkog prepoznavanja. Oni smatraju da organizam u

embrionalno doba prepoznaće 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 ^{nije} 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 tudi antigen prihvaca 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 pilićim 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 imunosnog 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 imunološ-

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 antiga za indukciju imunološke tolerancije su žive stanice, tj. stanice koje se mogu reproducirati. To su stanice limfnih čvorova, splenociti, mali limfočiti, stanične 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 imunkompetentne 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 napр. bjelančevine, bakterijski antigeni, eritrociti itd. (Smith 1961). Tolerancija na ove antigene je prolazna, ali joj se trajanje može produžiti ponovljenim davanjem antiga. Tolerantno stanje

prestaje u roku od par dana do 3 tjedna nakon iščezavanja zadnje količine antiga 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 nekim životinjskim vrstama toleranciju možemo izazvati samo prenatalno, kao napr. u kunića (Porter 1960), dok se u mišu i štakoru 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 mnogim životinjskim vrstama već i ranije, ne može se izazvati toleranciju jer uporedno 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 vreme 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 ^uodrasle 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 embriiona 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 novokoćenih kunića spriječava razvoj ostalih limfatičkih struktura (Archer i sur. 1963a i b). U novokoćenih 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 novookoćeni štakori mogu alokalem čak i trajno prihvati (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 Prengast 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 odstupa 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 allokalemu, 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, amnionsku 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. Epiteliohorijalna 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 sindesmohorijalna placenta ima jedan sloj manje (nedostaje majčin epitel), ipak i ona spriječava prolaz imunoglobulina. U životinja koje posjeduju ove dvije vrste placentâ 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 PLACENTĀ PREMA SLOJEVIMA TKIVA I KORELACIJA SA VREMENOM PRIJENOSA
IMUNOSTI IZ MAJKE U MLADE

VRSTE PLACENTE	ŽIVOTINJA	UTERINA TKIVA			FETALNA TKIVA		VRIJEME PRIJENOSA PROTUTIJELE	
		Endotel	Vezivo	Epitel	Trofo- blast	Vezivo	Endo- tel	Prenatalno
EPITELIOHORIJAL-								
NA	konj,svinja	+	+	+	+	+	+	0
SINDESMOHORIJAL-								
NA	ovca,koza, krava,govedo	+	+	0	+	++	+	0
ENDOTELIOHORT- 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 jednom brzinom 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 prihvata za 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 gammaglobulini 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, gammaglobulini 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 mlađih 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 placente (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 placente 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 gammaglobulina u serumu novorođenčeta ista je, ili čak i nešto viša negoli u serumu majke. U narednih nekoliko mjeseci dolazi do pada razine gammaglobulina, 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 placente 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 antogene 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 drugovrsnih 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).

Frisutnost 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 mislio 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 nesrođnoj 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 hemolitučku bolest mладунчeta. 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-novorođenčeta 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 mладунčeta prema istom imunološkom podražaju. Tom tipu preosjetljivosti pripada i imunosna reakcija na presadeno 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 mладунčadi. Predmet ove rasprave je, stoga, analiza utjecaja majčine imunosti, potaknute alogenim tkivom, na tkivnu imunost mlađih 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 mладунčeta 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 mладунče 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 mладунčetu prouzrokovati oštećenja zbog citotoksičkih svojstava protutijela, ili pak facilitaciju rasta onih stanica ili tkiva prema kojima su specifično usmjerena. Budući da reaktivnost na alogenim kalem neodvojivo uključuje kako tkivnu, tako i humoralnu imunitost, to smo u mладунčadi ispitivali i jedan i drugi oblik imunološke reaktivnosti. Tkvnu imunitet mладунčeta 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 odabralih štakora, koji kožne kaleme nose duže od prvobitno utvrđenog srednjeg vremena preživljavanja, pa je tome poklonjena odgovarajuća pažnja i u ovom radu. Štakori se stavlju na rasplod po principu slučajnog izbora, pa se mogu dobiti kombinacije životinja koje su genetički više ili manje slične. Okoćena mladunčad ostaje u istom kavezu sa majkom do navršenih mjesec dana, a tada se prenosi u odvojne kavezе, 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 prihvatali 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 mjesечно) hrane se i svježom goveđom jetrom.

4.2. TEHNIKA KOŽNOG KALEMA

Presadživanje kožnog kalema je dovoljno osjetljiva i pristupačna metoda za ocjenjivanje stupnja tkivne srodnosti transplantacijskih partnera, kao i za analizu reaktivnosti primalača izloženih specifičnim imunološkim postupcima, koji su predviđeni eksperimentalnim protokolom. Upotrebljavali smo ortotopni kalem kože, tj. kalem koji se životinji primaocu ušije na anatomske analogne mjesta. 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 (Chloral 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.

Narkotiziranim 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 mlađih 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 okreće 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 leukoplast. 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 u-palnom infiltracijom (Eichwald i sur. 1966). Koža postaje edematozna, a zatim joj se promijeni boja od svjetloružičaste prema žučkaštoj, 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 ovakovom tipu reakcije, uzimali smo kao kriterij za odbacivanje kalema. U pokušima 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 viđali u mlađih štakora. Značajnije smanjenje kalema i pojavu brazgotina, uzimali smo u svim reakcijama ovog tipa kao znak odbacivanja.

4.3. KATEGORIZACIJA STUPNJA TOLERANCIJE NA PRESAĐENE KALEME

Da bi iskazali stupanj tolerancije primalaca na presađene kaleme poslužili smo se srednjim vremenom odbacivanja (SVO) kalema. 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 mlađe 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 trostrukе vrijednosti SVO za kaleme iz odgovarajuće kontrolne grupe.

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

4.4. PRIPREMA STANIČNIH SUSPENZIJA ZA SENZIBILIZACIJU

Suspenziju stanica slezene (splenocita) pripravljali smo od slezene mužjaka genetički čistog soja Lewis. Štakor se anestezira, abdomen otvoriti uzdužnim rezom u medijalnoj liniji i izvadi slezena. Slezena se prvo isječe škararama 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 odbací, a sedimentu ponovno doda puferirana Ringerova rastopina. Ovaj se postupak ponovi još dva puta. Sediment se konačno razrijadi u 1-2 ml Ringerove rastopine, dobro promiješa da se dobije jednolična suspnezija i odredi broj stanica u mm^3 . Broj stanica se određuje standardnim hemocitometrijskim postupkom, tj. broje se nukleirani elementi.

Ovisani postupak pripremanja splenocita dovodi do mehaničkih oštećenja, pa i ugibanja, izvjesnog broja stanica. Stoga smo uvi-jek određivali postotak preživjelih stanica metodom ekskluzije boje (Schreck 1958). Upotrijebili smo 0,2 % eozina (Eozinum flavum - "Kemika") - u fiziološkoj rastopini, kojom se razrije-di 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" (ezin 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 mišanje, 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 mikrobakterija 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, tretriranih sa hijaluronodazom iz dva različita izvora i s različitim deklaracijama direktno ne uspoređuju, ovu okolnost ne smatrano kritičnom za konačnu interpretaciju opažanja.

1. Hyaluronidase - Wydase (ex bovine testes, lyoph. Wyeth Lab.

Inc. Philadelphia) nalazi se u bočicama koje sadržavaju 150 T.R. (turbidity reducing) jedinica. Sadržaj boćice se razrijedi sa 1 ml sterilne fiziološke NaCl rastopine i tako se liofilizat rastopi. Takvu rastopinu hijaluronidaze injicirali smo jednokratno intravenski gravidnim ženkama 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 "aCl rastopini kao gore, i gravidnim ženkama smo ga injicirali trokратno 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 blađu etersku narkozu, vršak repa se zasiže škarama i pusti krv da slobodno kapa u sterilnu epruvetu od 10 ml. Epruveta se ostavi 1-2 sata na sobnoj temperaturi. 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, nad oko -25°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 hemaglutinininska 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 aglutanacije 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 razrijedivanjem ispitivanog seruma progresivno smanjuje i koncentracija bjelančevina u mediju. Stoga se pored "olakšavajuće" uloge dekstrana ova metoda može još unaprijediti održavanjem konstantne koncentracije bjelančevina u serijskim razrijedenjima 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 asymptotski, u dalnjim epruvetama, približuje koncentraciji od 1,5 g %.

U tako priređena razrijeđenja seruma^u 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-merkaptoetanola u tako priredjenom fosfatnom puferu.
2. Ispitivani serum se pomiješa sa jednakim volumenom merkaptoetanola u fosfatnom puferu i inkubira u termostatu (37°C kroz 30 minuta). I serum bez merkaptoetanola, pomiješan samo sa fosfatnim puferom, podliježe analognoj proceduri.
3. Serijska razrijedenja seruma u BSA, uz dodatak dekstrana, priredi se na analogan način kao što je opisano za nativne serume. Razlika prema dekstranskoj metodi očituje se u finalnom razrijedenju seruma, koje u prvoj epruveti iznosi 1:8. Do ovog povećanog razrijedenja 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 korelacijske iz negrupiranih rezultata (Petz 1964), pri čemu je koeficijent korelacijske (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 korelacijske 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 Ž A N J A I D I S K U S I J A

5.1. UTJECAJ IMUNOKOMPETENTNIH STANICA I HUMORALNIH PROTUTI-JELA PRENESENIH IZ ORGANIZMA MAJKE, NA IMUNOLOŠKU REAK-TIVNOST 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 mlađih. Može se, dakle, pretpostaviti da bi obje vrste imunosti pod određenim uvjetima, mogle preinaciti imunološku reaktivnost mlađih.

U nekim od prijašnjih pokusa ispitivali smo utjecaj senzibilizacije ženki-budućih majki, tkivom oca mlađih, na preživljavanje roditeljskih kalema u mladunčadi (Rukavina 1968; Vlahović i Rukavina 1970). Opazili smo da mladunčad znatno duže nosi očev kožni kalem, ukoliko ^{joj} je majka prije trudnoće bila trokratno senzibilizirana očevim kalemima kože. Ovaj način senzibilizacije nije imao utjecajajna preživljavanje istovremeno presađenih majčinih kalema na mladunčad: iranzitet 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 mlađih, nije dovodilo do opisanog produženja noseњa 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 mlađih. Tek takva analiza može dati više dokaza o stvarnom utjecaju prenesenih humoralnih protutijela na preinaku imunološke reaktivnosti mlađih. Osim toga, spomenute pokuse smo vršili na genetički nesrođnoj 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 tvim 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^X

Alel	Individualni antigeni na eritrocitima				Soj	
H-1 ^L	5	7	8	16	17	Lewis
H-1 ^C		9	10	13	15	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 (Štakr 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, presadili 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.

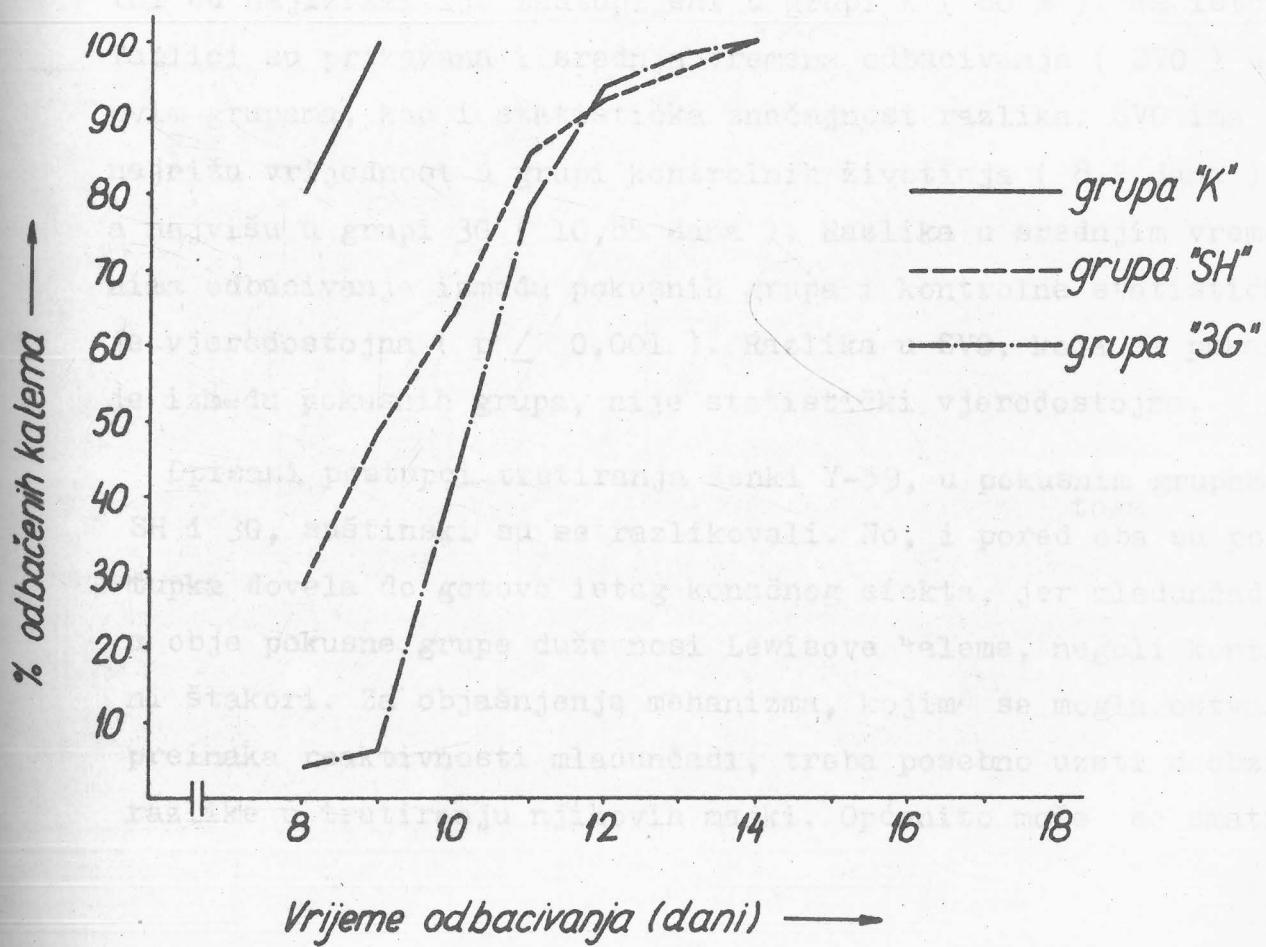
Vrijeme odbacivanja Lewisovih kalema presađenih na mlade Y-59 u kontrolnoj grupi, praktički se ne razlikuje od vremena odbacivanja istih kalema presađenih na odrasle ženke Y-59, što ukazuje da su mladi štakori u ovoj životnoj dobi (stari 25-30 dana) dosegli punu sposobnost imunološke reaktivnosti na allogenih 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 utječe 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 kalemljenja smo uzimali iz rcpne vene maldih, uzorak krvi za određivanje titra hemaglutinina na eritrocite mužjaka Lewis (7,11 i 21-i dan).

U drugoj pokusnoj grupi (grupa 3G), također su upotrebljene 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 uzorka krvi jedna je ženka uginula, pa smo njene mlade, stare 2 dana prebacili nesenzibiliziranoj ženki Y-59, koja je imala mlade približno iste starnosti. 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 presađenih na mlađe štakore soja Y-59



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

Srednje vijeme odbacivanja (SVO) Lewisovih kožnih kalema presađenih na mlađe Y-59 u kontrolnoj grupi iznosi $8,2 \pm 0,1$ dana, a prema prethodno iznesenim kriterijeima tolerancije svi mlađi 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 najrižu 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 toga, 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	VI SOKO TOLERANTNI	X	SVO \pm SP ^x	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 mладунčadi Y-59 na Lewisove kaleme. Producenje života Lewisovih kalema u grupi 3G, mogli bismo pripisati utjecaju prenijetih humorálnih protutijela iz majke. U narednoj raspravi objašnjavaju se načini kojima li 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 dvosmjeran, tj. fetalne stanice prelaze u majčinu cirkulaciju, ali i majčine stanice mogu prijeći u fetus (Kirby 1968). Među majčinim 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 stnica. 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, moglo bi se očekivati specifične preinake imunološkog statusa mlade životinje u kasnijem životu. Takva preinaka imunološke reaktivnosti mладунчeta trebala bi, osim o broju prenijetih stanica, zavisići 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 mладунчeta, ne samo da ne bi 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 mlađih 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 mlađih. 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 mlađih 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 mладунčadi kunića, višekratnim injiciranjem gravidnih ženki hijaluronidazom i subcelularnim antigenima slezene i bubrega nesrodnog davaoca. Stupanj tolerancije na kožni kalem davaoca antiga, ovisio je o injiciranoj dozi.

Broj splenocita koje smo injicirali u gravidne ženke Y-59 (134×10^6) 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 primalacâ (majke, odnosno fetusa) pokazuju da su razlike u jakim antigenima tkivne srodnosti, tj. na RTH-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 очekivati 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 presedenih na mlade. Iako je srednje vrijeme odbacivanja (SVO) u ovoj grupi produženo samo za 1,8 dana, ipak je razlika statistički visoko značajna ($p < 0,001$). 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 34 ukupno 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 mlađih 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 njenе 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 imuno-kompetentnih stanica, koje se istovremeno nađu u fetusu.

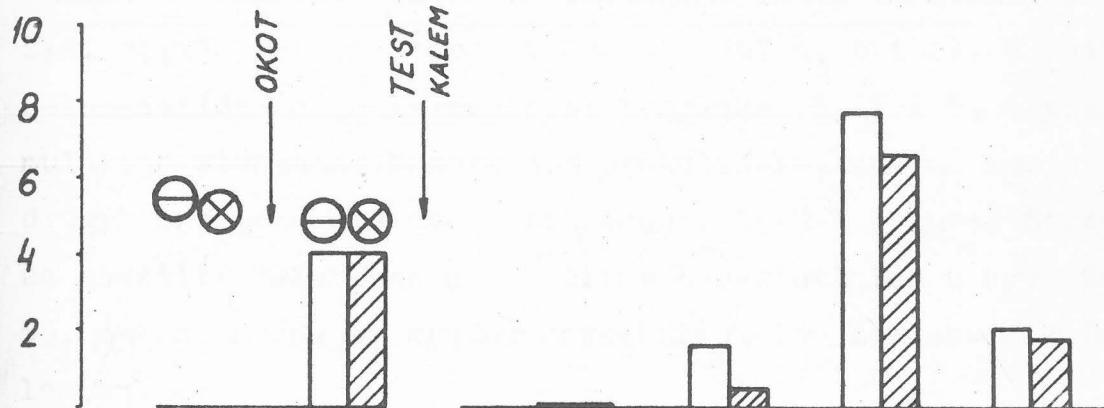
I u drugoj grupi (grupa 3G) mladi štakori Y-59 znatno duže nose Lewisove kaleme, kada se usporede sa štakorima kontrolne grupe K ($p < 0,001$). Razlika u SVO još je izrazitija negoli između grupa K i SH (2,65:1,8 dana). No, i pored toga ne postoji statistički vjerodostojna razlika između pokusnih grupa 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 znatno 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 mладунčadi. Serum mlađih iz preostala 3 legla pokazivao je hemaglutinacijsku aktivnost, ali je tistar hemaglutinina bio nešto niži (prosječno za 1 razrijeđenje), od vrijednosti titra u serumu majki, kojima je istovremeno uzet uzorak krvi. Obradivanje seruma mlađih sa merkaptotanolom nije smanjilo tistar hemaglutinina, što ukazuje da prenesena protutijela pripadaju isključivo grupi hemaglutinina malene molekularne težine (7S tipa).

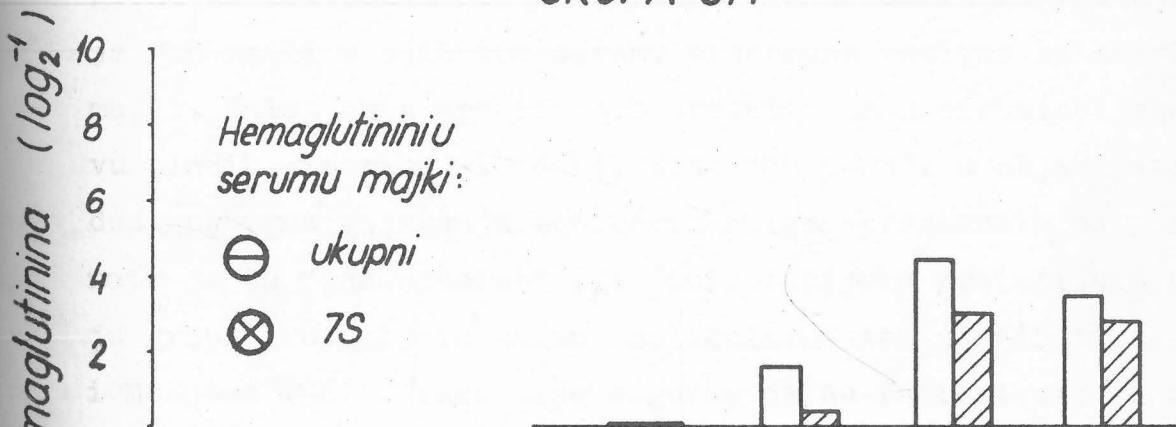
Normalne ženke Y-59 pokazuju snažnu reakciju odbacivanja prema Lewisovim kožnim kalemima (svi presađeni kalemi odbačeni su 8-og dana). To potvrđuje da su razlike u histokompatibilnosti između ova 2 soja (razlike na Rt H-1 lokusu) vrlo jake. Glavne razlike odnose se na Lewisove antigene specifičnosti 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 tistar hemaglutinina trokratno kalemljenih gra-

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

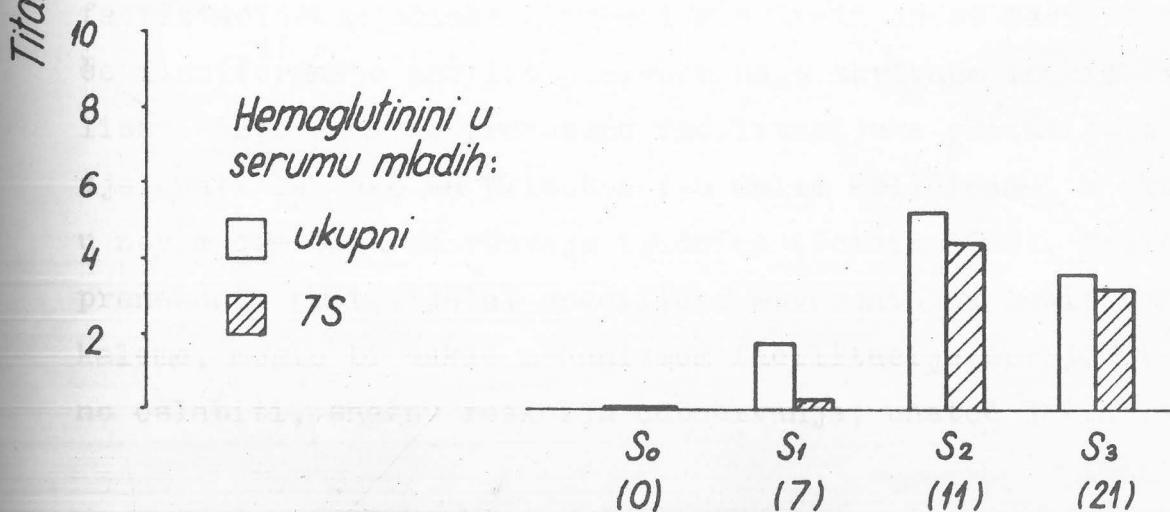
GRUPA "3G"



GRUPA "SH"



GRUPA "K"



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 mладунčад 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 mlađe. 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 rada 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 prođenje preživljavanja Lewisovih kalema presađenih na mlađe Y-59, u pokušnoj grupi 3G, podržava ovu našu pretpostavku. Vjerojatno je da se ova protutijela stalno "dodaju" u cirkulacijski sustav mладунčeta i nakon poroda, jer je sluznica probavnog trakta mладог štakora propusna za protutijela koja dolaze majčinim mlijekom, sve do otprilike 21-og dana života (Halliday 1955a). Upravo ova okolnost omogućuje u nekim životinjskim vrstama, koje imaju hemohorijalnu placentu, efikasniju zaštitu novorođenčeta protiv invazivnih agensa. U njih je postnatalni prijenos majčinskih 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 majčinskih humorálnih protutijela, u serumu, niska. Testiranje mладих 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 mладих na dan ušivanja Lewisovog kalema kože, nije sadržavao hemaglutinine. No i pored toga, kalemi presađeni na mладунčad ove grupe bili su facilitirani. To se slaže sa opažanjem Kaliss-a i sur. (1963) da i tumori koji se presađuju na mладунčad senzibiliziranih majki, u ovoj životnoj dobi, mogu biti facilitirani bez obzira da li su u serumu mладих hemaglutininini prisutni ili odsutni.

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

doblju, te je ovu mладунчад "prihvatile". 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 kaledi odbačeni 8-og dana. Intenzitet ove reakcije otprilike je na razini odbacivanja Lewisovog kalema presađenog na mlađe 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 grupe K, SH i 3G, koji su kalemili kožnim kalemima štakora Lewis. Određivali smo razinu ukupnih i merkaptoetanol rezistentnih hemaglutinina 7-og, 11-og i 21-og dana nakon kalemnjenja (slika 3). Hemaglutinine možemo utvrditi već 7-og dana nakon kalemnjenja, iako je njihov tistar u svim grupama vrlo nizak (prosječan tistar 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 merkaptoetanolom gotovo je potpuno eliminirala cijelu hemaglutacijsku aktivnost.

Prema tome, u prvoj fazi humoralnog odgovora ne postoji uočljivi-je razlike između grupa. Međutim, razlike u jačini hemaglutinacijskog odgovora očituju se već u serumu uzetom 11-og dana nakon ka-lemljenja mlađih. Razina hemaglutininu u krvi viša je u svim gru-pama, ako je uporedimo sa serumima 7-og dana, pri čemu se posebno ističe nagli porast 7S hemaglutininu. Najviši titar ukupnih i 7S hemaglutininu nalazimo u grupi 3G, a najniži u grupi SH. Dvade-set prvog dana nakon kalemljenja dolazi do izrazitog pada razine he-maglutininu u grupi 3G, dok je pad hemaglutininu u grupama K i SH neznatan, a titar ima otprilike jednake vrijednosti u ovim grupa-ma. (oko 4). I 21-og dana u serumu životinja iz svih grupa domini-raju 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 protutije-la. 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 produc-ciju hemaglutininu, za koju je karakteristično rano pojavljivanje 19S protutijela i kasnija izrazita dominacija 7S protutijela. Pokru-se su izvodili na štakorima soja Lewis, koje su imunizirali sa kož-nim kalemom štakora 9 genetički čistih sojeva, koji su nosioci raz-ličitih alela u Rt H-1 sistemu. Hemaglutinine su mogli utvrditi iz-među 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 go-tovo sva hemaglutinacijska aktivnost nalazi u području 7S hemaglu-tinina. Dvadesetog dana nastupa lagani pad razine hemaglutininu. Nadalje, različite alele Rt H-1 sistema pokazuju različitu imuno-genost, što se očituje na razini titra hemaglutininu i brzini nji-

hovog pojavljivanja u serumu. Možda je interesantno napomenuti da kožni kalem štakora soja CAP (isti alel kao Y-59), presađen na štakore Lewisovog soja, izaziva našlabiju 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 mладунčadi. Ta protutijela smo našli u serumu uzetom 4-10 dana nakon ckota, ali ih nismo mogli otkriti u serumima na dan ka-lemljenja. 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 hemaglulinacije, vjerovatno nedovoljno osjetljiva. Kada se iz presađenog kožnog kalema "oslobode" velike količine antigena, dolazi do njihovog spajanja sa ovim protutijelima. Međutim, sve količine antigena ne bi mogle biti vezane, jer je nedovoljna količina protutijela, pa bi dio antigena ostao u "suvišku". Poznato je da

injiciranje kompleksa protutijelo-antigen, sa suviškom antiga, 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 hemaglutinin u serumu 21-og dana u grupi 3G mnogo je izrazitiji, negoli u preostalim grupama. Može se pretpostaviti da je tome pridonijela i nagla pro-dukacija hemaglutinin 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 mlađih, kada se majka senzibilizira alogenim tkivom. U pokusima koji se opisuju u ovom poglavlju, htjeli smo se orijentirati i o utjecaju raznovrsnih postupaka senzibilizacije majki, na reaktivnost mlađih prema istoj vrsti alogenog stimulusa. Moglo se pretpostaviti da će mijenjanje postupaka, kao i jačine senzibilizacije, dovesti do drugačije reaktivnosti mlađih. Osim toga, trebalo bi utvrditi da li je tkivo kojim je do sada ostavljana senzibilizacija majki, tj. kožni kalem, odlučno za manifestaciju specifično promijenjene reaktivnosti mlađih, 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 deseterokratno kalemili kožnim kalemima, a prijenosom njihovog (hiperimunog) seruma, u normalne životinje, uspjeli su znatno produžiti život specifičnog kožnog kalema. Već iznesenii 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

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

Pokuse smo izvodili na genetički nesrođenoj populaciji štakora ("Y"), da bismo izbjegli ujednačene odnose u tkivnoj srodnosti i tako omogućili senzibilizaciju ženki tkivima mužjaka, oca mладунčadi. Poznato je iz kliničke medicine, da senzibilizacija majke očevim antigenima, koje je fetus naslijedio, može dovesti do teških oštećenja mладунčeta. Iako se takva oštećenja ne mogu utvrditi u genetičkoj nesrođenoj populaciji štakora, ipak se mogu pretpostaviti kada se ženke snažno senzibiliziraju tkivima oca mладунčadi. 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 nesrođnim 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).

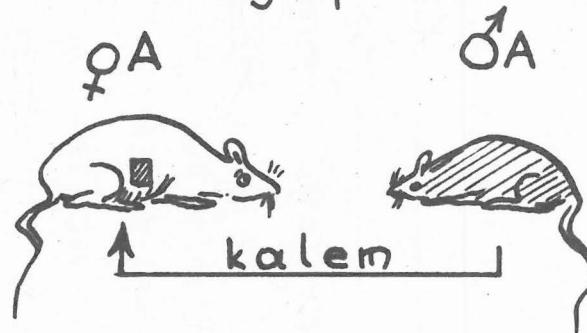
Slika 4 Plan pokusa za grupe A, A₁ i A₂

grupa A



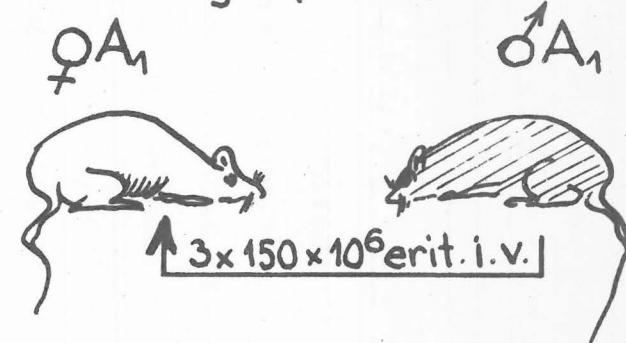
rasplod
↓
okot

grupa A₁

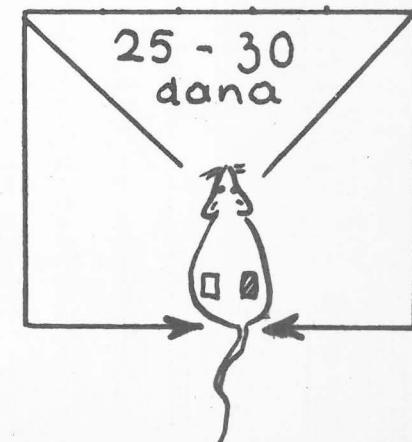
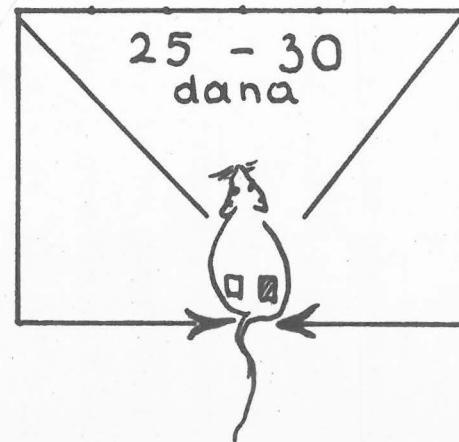
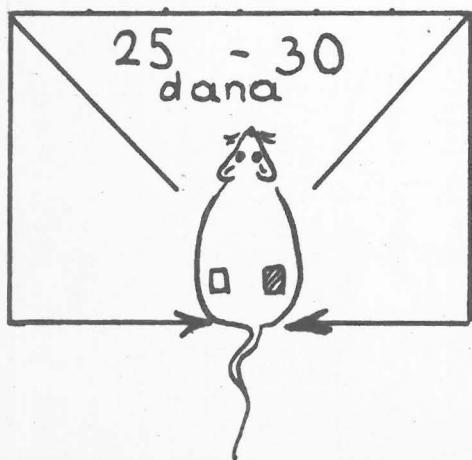


rasplod
↓
okot

grupa A₂



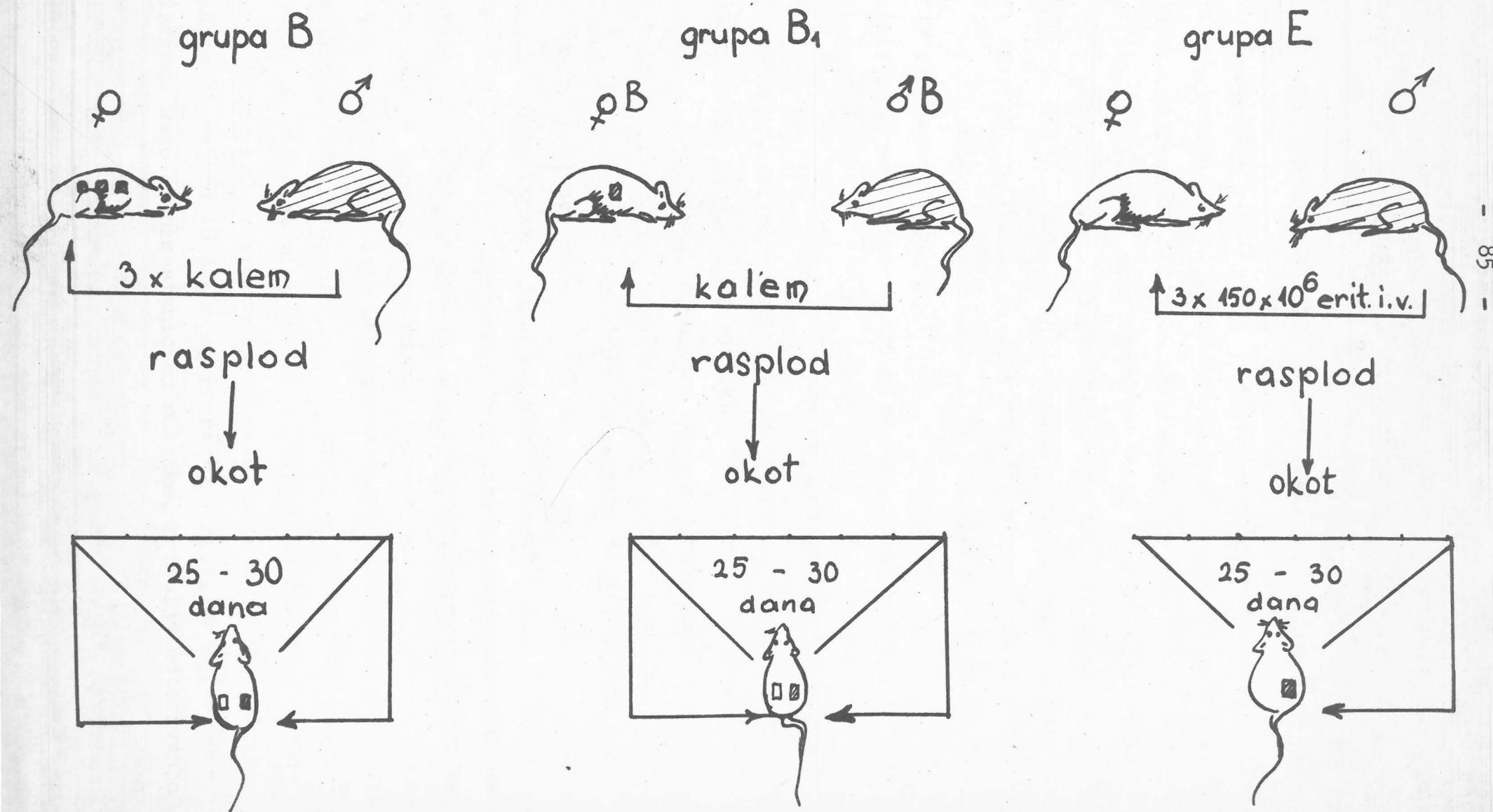
rasplod
↓
okot



Od dijela ženki iz grupe A, nakon što su njihovi mladi kalemljeni, formirana je grupa A₁ (Slika 4). Te su ženke kalemljene kožom oca mlađih i ponovno sa njim stavljene u rasplod. Njihovu mladunčad testirali smo zatim kožom obaju roditelja. Roditeljski partneri iz grupe A₁, nakon kalemljenja mlađih, uzeti su dalje u pokus i čine grupu A₂ (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 mlađe testirali kožnim kalemima.

Na Slici 5 prikazali smo plan pokusa koji se odnosi na grupe B, B₁ 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 B₁. Mlađe smo kalemili kožom obaju roditelja. Plan senzibilizacije ženki u grupi E utoliko se razlikuje od postupka primjenjenog u grupama B i B₁, što materijal za senzibilizaciju nije služio kožni kalem, već suspenzija krvnih stanica mužjaka. Suspenzija je sadržavala 150 milijuna eritrocita i uz pripadajući broj ostalih krvnih stanica, a ženkama je injicirana trokratno intravenski. Nakon toga su roditeljski parovi stavljani u rasplod, a mlađi kalemljeni samo kožom oca, davaoca stanica za senzibilizaciju majki.

Slika 5 Plan senzibilizacije ženki u grupama B, B₁ i E



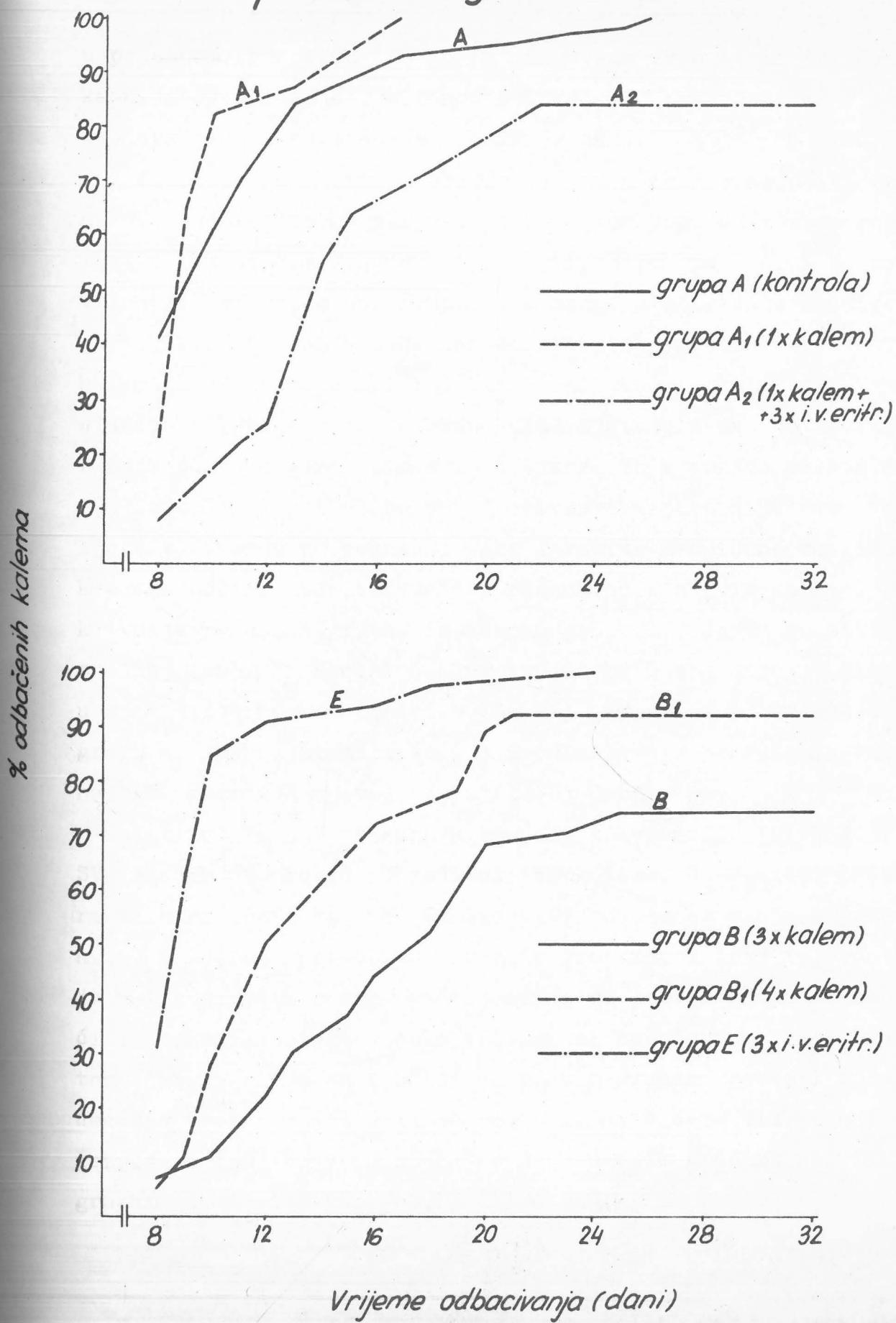
5.2.2. PREŽIVLJAVANJE RODITELJSKIH KALEMA

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 odbačeno 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 odbačeno 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
presadjenog na mlade "Y"



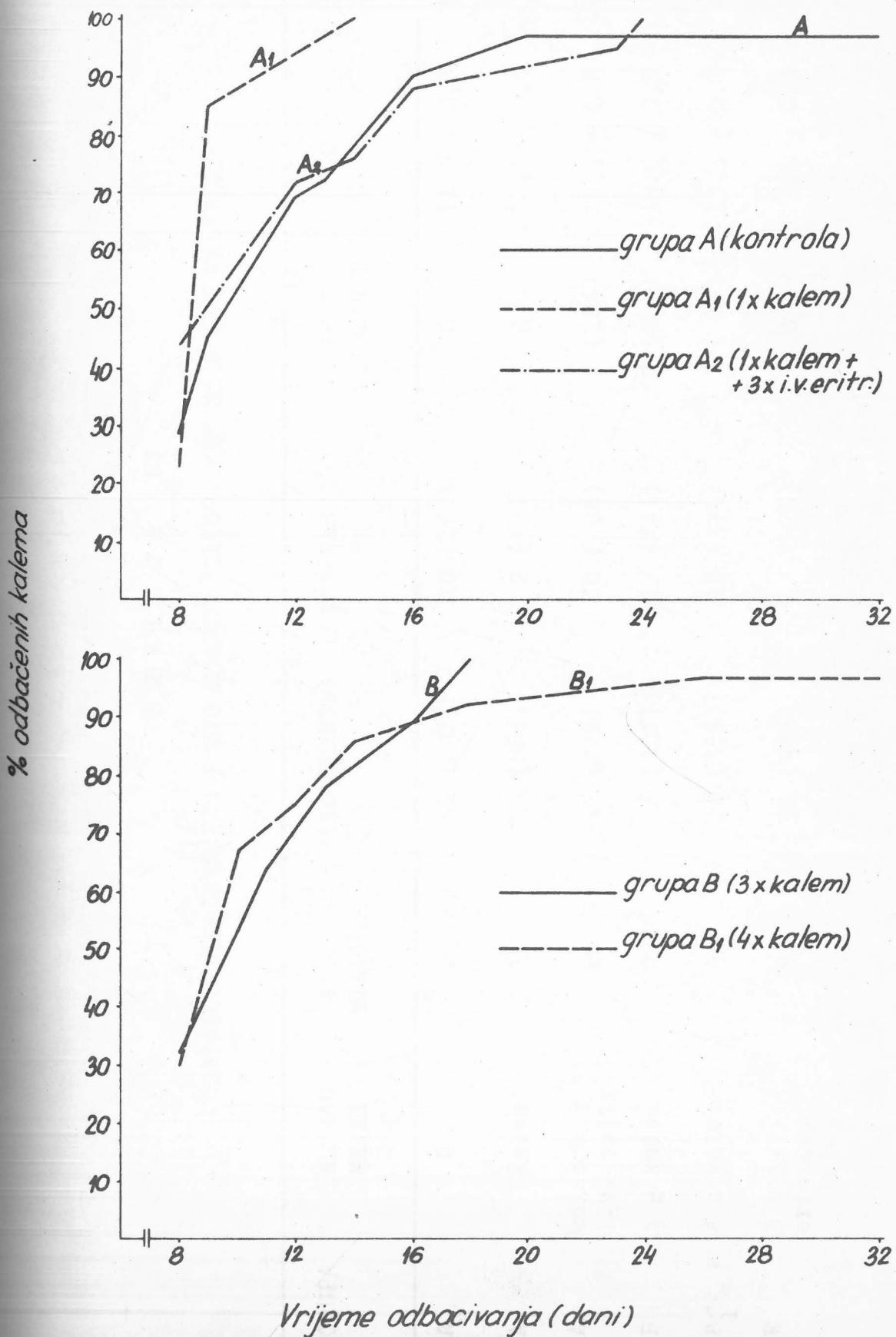
u početnom razdoblju (do 10-og dana) ima vrlo strmi tok, ali je kasnije odbacivanje usporeno. Svi kalemi, presađeni na mladunčad ove grupe, odbačeni su do 24-og dana.

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 mlađih 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 prihvata 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 mlađih 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 $\bar{x} \pm SP^x$	p
A	0	61	51 (84%)	10 (16%)	0	11,0 \pm 0,5	$A_2: A \angle 0,02$
A_1	kalem	17	15 (88%)	2 (12%)	0	10,1 \pm 0,7	$A_2: A_1 \angle 0,01$ $A_2: E \angle 0,01$
A_2	kalem + 3 x i.v. eritr.	25	11 (44%)	10 (56%)	4 (16%)	13,3 \pm 0,8	$B: A \angle 0,01$ $B: A_1 \angle 0,01$
B	3 x kalem	27	8 (30%)	12 (70%)	7 (26%)	15,5 \pm 0,9	$B: E \angle 0,01$
B_1	4 x kalem	36	20 (55%)	13 (37%)	3 (8%)	13,3 \pm 0,7	$B_1: A \angle 0,01$
E	3 x i.v. eritroc.	55	51 (93%)	4 (7%)	0	9,8 \pm 0,3	$B_1: A_1 \angle 0,01$ $B_1: E \angle 0,01$

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 A₂, B i B₁. SVO očevih kalema značajno je duže u ovim grupama, što je na Tablici V 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 mладунčад. 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 mладунčadi grupa A₂, B i B₁. Zajednička karakteristika ovih grupa je višekratna senzibilizacija majki: višekratno kalemljenje kožom mužjaka (grupe B i B₁) ili jednokratno kalemljenje uz dodatno trokratno injiciranje krvnih stanica mužjaka (grupa A₂). Ove pokusne grupe, po načinu senzibilizacije, potsjećaju 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	VIŠOKO TOLERANTNI	SVO $X \pm SP^x$	p
A	0	62	45 (72%)	16 (26%)	1 (2%)	11,3±0,5	$A_2(\text{otac}) : A_2(\text{majka}) < 0,05$
A_1	kalem	17	15 (88%)	2 (12%)	0	9,7±0,4	$B(\text{otac}) : B(\text{majka}) < 0,01$
A_2	kalem + 3x i.v. eritr.	25	18 (72%)	7 (28%)	0	11,4±1,0	$B_1(\text{otac}) : B_1(\text{majka}) < 0,01$
B	3 x kalem	28	22 (78%)	6 (22%)	0	11,2±0,6	
B_1	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 mlađih. 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 oslobođe iz kalema presađenog na majku, mogu proći placentarnu barijeru i ući u cirkulaciju mlađih, 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 ne bi 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 imunosnih stanica, ukazuju i neki rezultati pokusa u "milipore" komoricama. Tako životinja može odbaciti alokalem prema kojem je tolerantna, ako joj se implantiра "milipore" komorica u kojoj se nalaze specifično senzibilizirane ćelije.

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 potsjeća u određenom smislu na "mili pore" 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 pokušne 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 Gorera (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_1 , u kojoj su ženke iz grupe B dodatno (po četvrti put) kalemljene kožom mužjaka. Slične rezultate imamo i u pokušnoj grupi A_2 . 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_2 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_1 . Da bismo utvrdili da li se ovo produženje nošenja očevog kalema može pripisati djelovanju: a) kožnog kalema, b) trokratnog injiciranja suspenzije krvnih stanica, ili c) zajedničkom učinku obaju postupaka senzibilizacije, injicirali smo trokratno intravenski krvne stanice mužjaka u normalne ženke (grupa E). Ima podataka da prethodno tretiranje primaoča 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 dovodi do istog učinka (idem). Međutim, trokratno injiciranje suspenzije krvnih stanica, u našem specifičnom modelu (grupa E), nije utjecalo na preživljavanje očevog kalema presađenog na mlađe. 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_2 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_1 , također nije imao učinka. Na temelju ovih razmatranja može se pretpostaviti da se najvjercnjatnije radi o kombiniranom učinku imunosti stvorene senzibilizacijom ženki kožnim kalemom, a zatim i snažno potaknute trokratnim 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 trokratne trudnoće ženki, iz ove grupe, sa istim mužjakom. Naime, prije-

laz fetalnih stanica u majku tokom trudnoćâ i porodâ može imati kumulativan učinak i dodatno stimulirati produkciiju 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 Barett 1960a). Štaviše, takve ženke duže nose i normalna tkiva (kožni kalem) mužjaka. (Breyere i Barett 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 možepripisati 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 A₂. 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 mlađih.

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_1 i A_2 (Tablica V) pokazuje da stvarno i nema bitnijih razlika. Doduše, u grupi A_1 je najniže SVO, što bi prije ukazivalo na slabiju imunost.

Normalna reaktivnost mladunčadi prema majčinim 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 mlađim. Da bismo to mogli i tvrditi neophodno je sustavno pratiti produkцијu 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 poglavljju 5.4., biti posvećena posebna pažnja analizi humoralnog odgovora senzibilizirane majke i prijenosu protutijela iz njene cirkulacije u krvotok mlađih.

Pretpostavili smo da u ovim pokusima može doći i do oštećenja mладунčadi senzibiliziranih majki. No, iako je senzibilizacija majki, očevim tkivima, bila vrlo snažna, ipak je učestalost takvih incidenata bila neznatna. Samo je mладунčad 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 primaocem. 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 poličaju, 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 opisuju u ovom dijelu radnje htjeli smo se prvo uvjeriti da li majčine stanice prelaze u fetus, kada gravidne majke injiciramo hijaluronidazom. Osim toga, trebalo se orijentirati i o tome, da li dolazi do kompeticije između dviju vrsta zrelih imunokompetentnih stanica, koje se nađu 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 navedenome 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 mlađih 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 mlađi potječu od netretiranih majki. Od mlađih 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 mlađih, 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.

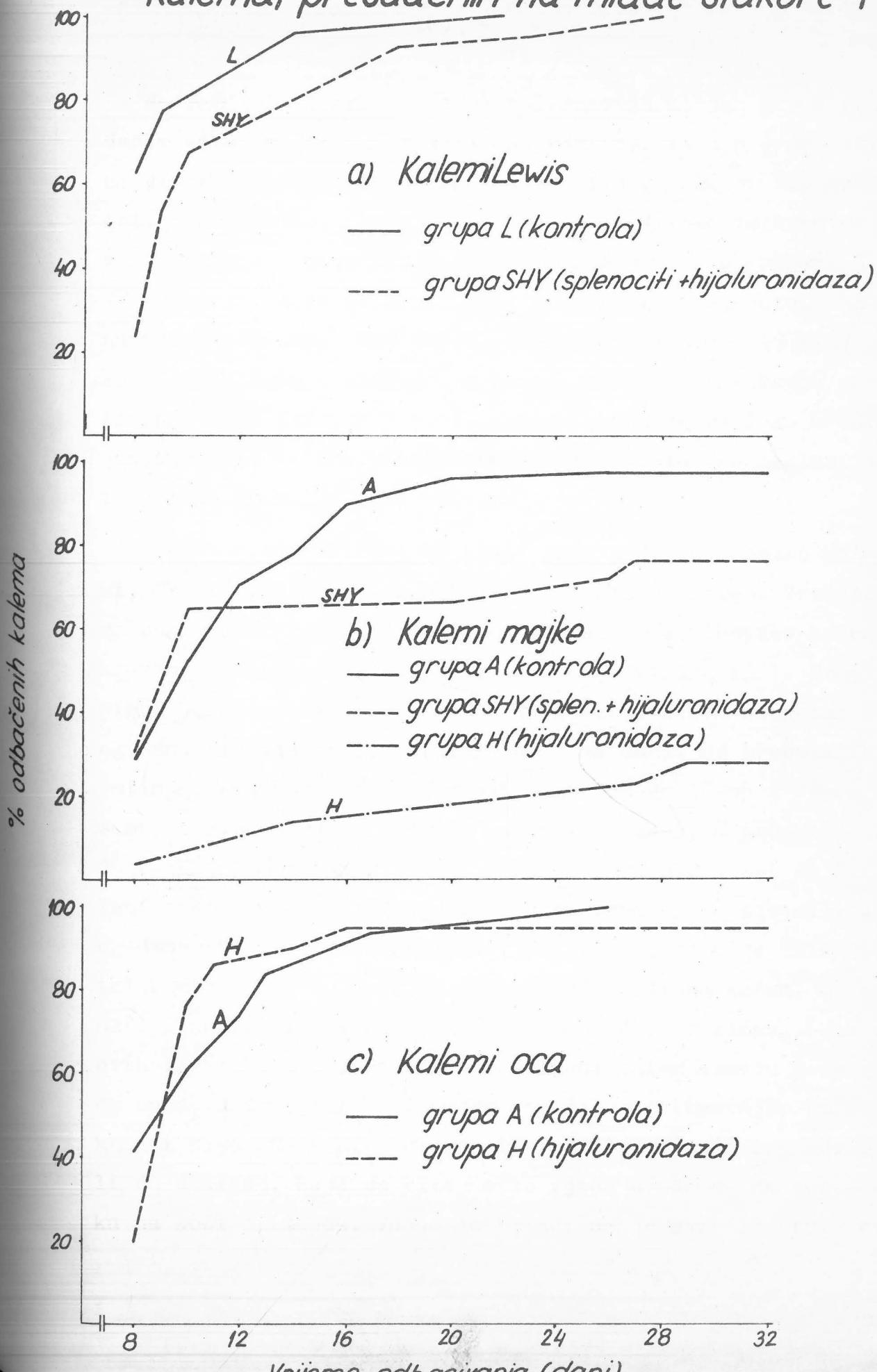
U pokusnoj grupi SHY stavljali smo u rasplod normalne ženke i mužjake populacije Y, stare oko 3 mjeseca. Kada su ženke bile gravidne injicirali smo im i.v. kroz tri dana, splenocite mužjaka Lewis. Svaka gravidna ženka dobila je 300 milijuna stanica. Zadnji inkubator stanica (treći) injicirali smo 1-3 dana prije rođenja mladih, što je ovisilo o leglu. Ukupno je bilo 9 legala. Istovremeno sa splenocitima ženke smo injicirali i hijaluronidom (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 kalemjenja, 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 mlađi koji du i njen prvi kalem nosili znatno duže od istovremeno presađenog Lewisovog kalema. Obrnuto, kožni kalem mužjaka Lewis ponovno su primili oni mlađi, koji su prvi Lewisov kalem duže nosili negoli istovremeno presađeni majčin. Dio mladunčadi, koja je podjefnako brzo odbacila oba kalema, ponovno je kalemjen ili majčinim ili Lewisovim kalemom. Tako je od 55 mlađih koji su prvi puta kalemjeni sa oba kalema, 44 ponovno primile 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 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 ^{naglo} ~~uskorava~~ (plato krivulje). U ovoj grupi je 24 % mlađih trajno prihvatiло majčine kaleme, što je znatno više negoli u grupi A (2 %). Najveći broj mlađih trajno prihvata majčine kaleme u grupi H (73 %). I preostala mladunčad iz ove grupe, usporeno odbacuje majčine kaleme, znatno sporije nego mlađi 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 prihvatiло.

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



Na Tablici VI prikazana je tolerancija mlađih prema presađenim kalemima, SVO i značajnost razlika. Iako u grupi SHY ne-ma visoko tolerantnih na Lewisove kaleme, ipak je SVO duže negoli 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 mlađi odbacivali prvi Lewisov kalem, kretao se u granicama od 8 do 28 dana (Tablica VII). Drugi Lewisov kalem presađen mlađima 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 mlađih 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 prihvataju. Prihvaci-eni kalemi nisu značajnije mijenjali veličinu i opći izgled. Obrasli su dlakama, koje su bile nešto rjeđe u odnosu na gustoću dla-ka 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 PRESAĐENIH NA MLADE ŠTAKORE "Y"

GRUPA	BROJ MLADIH	DAVALAC KALEMA	NETOLERANTNI	TOLERANTNI	VISOKO TOLERANTNI	SVO $X \pm SP^X$	p
L	51	Lewis	15 (83%)	9 (17%)	0	9,4±0,4	za kaleme Lewis :
SHY	55	Lewis	38 (69%)	17 (31%)	0	11,4±0,6	SHY: L \neq 0,05
SHY	55	Majka	36 (65%)	6 (11%)	13 (24%)	11,1±0,9	za kaleme majke :
A	62	Majka	15 (72%)	16 (26%)	1 (2%)	11,3±0,5	H : A \neq 0,01
A	61	Otac	51 (81%)	10 (16%)	0	11,0±0,5	H : SHY \neq 0,01
H	22	Majka	1 (1%)	5 (23%)	16 (73%)	19,0±3,0	
H	21	Otac	18 (86%)	2 (9%)	1 (5%)	9,9±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 PRESAĐENIH MLADIM U GRUPI SHY

BROJ ŠTAKORA	K A L E M I M A J K E	BROJ ŠTAKORA	K A L E M I L E W I S
	I KALEM II KALEM		I KALEM II KALEM
	(dani)		(dani)
3	8	7	8
4	9	7	9
4	10	7	10
2	27	8,9	12
12	visoko tolerantni	3 x 9 12, 14, 16, 18, 19 4 x visoko tolerantni	1 1 2 18 1 1 26 1 28
			7 7 7 13 14 16 9,10 18 20 26 9 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 mlađim, 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 prihvata (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 grupe H i SHY, jer među njima postoji 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 potsjeća 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 mладунčad 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 mладунčeta tuđe stanice mogu biti i eliminirane, pa neće ostaviti nikakvog traga na imunološku reaktivnost mладих, u kasnijem životnom razdoblju. Ako je, međutim, došlo do prevage tuđih stanica, tada organizam mладунčeta 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 konkurenkcije i direktne borbe među njima. Na taj način bi se mogao umanjiti učinak svake od ovih stanic, u smislu iznesene diskusije.

Konačni rezultat ove borbe između fetusa i tuđih stanic, te stаница međusobno, ocjenjivali smo na temelju preživljavanja kožnih kalema presađenih na mладунčad. Iz tih rezultata vidljivo je da neka mладунčad grupe SHY trajno prihvata kožne kaleme majke (visoko tolerantni), dok nijedno mладунче nije trajno prihvatio Lewisov kalem. I pored toga, značajno je produženo vrijeme preživljavanja Lewisovih kalema na mладунčadi ove grupe, kada ga usporedimo sa kontrolnim štakorima iz grupe L ($p < 0,05$). Na temelju

ovih rezultata mogli bismo zaključiti da mладунčад ове групе дуже носи оба калема (majčin i Lewisov). Како се ради о учинку пренесених станица, то би могло значити да су се у младим успјеле одрžати обје врсте станица (kimerizam), што се очituje у неком stupnju tolerancije na kožne kaleme. Међутим, у то се може opravдано sumnjati na temelju rezultata pokusa na ozračenim životinjama. Stoga ћемо неке најваžније ukratko i iznijeti.

Poznato je da životinja која је изложена radioaktivnom zraчењу показује изразиту atrofiju limfatičkog aparata и smanjenje imunološke reaktivnosti (Clemendson i Nelson 1960; Hašek i Lengerova 1960). У томе је bar donekle slična imunološком статусу fetusa-novorođenčeta. Животинje ozraчene letalnom dozom radioaktivnih zraka ugibaju zbog oштећења hematopoeze, па им се у svrhu lijeчења presadivalo koштану srž. Како је bitno oslabljen imunološki потенцијал ozraченог организма, а међу стanicama alogene коштane srži има и imunokompetentnih, то су mnoge životinje ugibale od sekundarne bolesti (Vos i sur. 1959; VanBekkum i sur. 1959; Jutila i Weiser 1962). Sekundarna bolest се може izbjеći ako se životinji injicira autologna ili singena koštana srž, што је у genetički nesrodnoj populацији готово nemoguće osigurati. Prema tome, trebalo је pronaći методу избора najpovoljnijeg davaoca, unutar populације, што би имало veliku vrijednost i u kliničkoj medicini. Pretpostavilo се да bi, у том смислу, bilo najefikasnije injicirati mješavinu stаница коштane srži od više davalaca heterozigotne populacije. Tako би се možda najbolje moglo "pokriti" široki spektar antigenih razlika u tkivnoj srodnosti i omogućiti да у mješavini буду и станице које су vrlo slične primaocu. Lengerova (1960) је постигla najbolji rezultat kada је injicirala mješavinu stаница od 40 davalaca. Међутим, injicirala је fetalne hematopoetske stанице,

što ograničava primjenu ovog nalaza. Vlahović i sur. (1964) su pokušali zaštiti 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 davalca 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 prihvaćanjem 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, donекле 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 podjeliti 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 mладог (kimerizam), onemogućiti drugu vrstu stanica da se održi u младом. 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 mладих ga i trajno prihvata (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 prihvatio Lewisov kalem, što vjerojatno znači da su Lewisove stanice naknadno eliminirane.

Činjenica da je 13 mладих 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	$11,1 \pm 0,9^{(13)x}$	$11,1 \pm 0,6$	
<hr/>				
PODGRUPE				za kaleme Lewis:
1.	20	$8,7 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,2$	2. : 1. $\angle 0,001$ 2. : 3. $\angle 0,001$
2.	16	$8,7 \pm 0,2$	$17,3 \pm 1,7$	za kaleme majke: 3. : 1. $\angle 0,001$ 3. : 2. $\angle 0,001$
3.	19	$25,5 \pm 1,1^{(13)}$	$9,2 \pm 0,2$	Lewis 2. : Majka 2. $\angle 0,001$ 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 mладим negoli Lewisove, jer su mлади dio antigene građe naslijedili od majke. No, u razmatranju rezultata tolerancije na presadene 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 mладунčeta. 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 C₅₇. Uspjeli su smanjiti učestalost bolesti i oslabiti njen intenzitet, kada su novookoćene miševe soja A injicirali mješavinom splenocita sojeva CBA i C₅₇. Pretpostavljaju da su primaocu genetički bliži splenociti CBA jače reagirali protiv stanica drugog davaoca (C₅₇) 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-

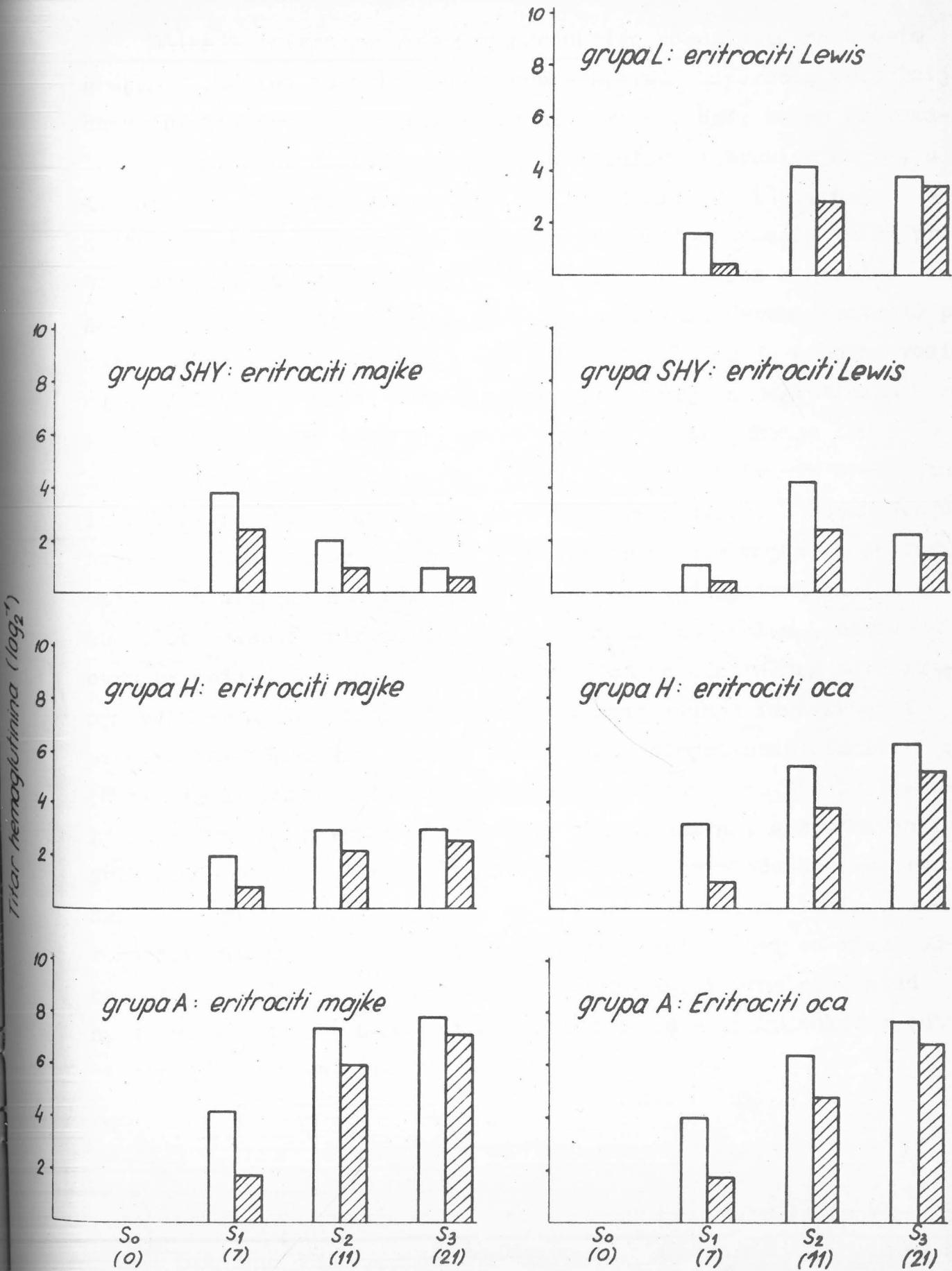
mično slične mladunčetu mogle su se u njemu lakše održati, što se očituje trajnim prihvaćanjem majčinih kalema u neke mladunčadi. S druge strane Lewisovi splenociti su u podgrupi 2. uspjeli eliminirati majčine stanice, ali kako se znatnije razlikuju prema fetusu nisu se mogli trajno održati. Stoga u 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 antiga 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 mlađih sastavljen od vlastitih stanica i stanica davaoca - koje su u dinamičkoj ravnoteži, tada će mlađi prihvatići ne samo prvi, već i svaki naknadni kalem od istog davaoca (Woodruff 1960). Četiri mlađa su ponov-

ljeni majčin kalem prihvatile 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 (Táblica VII). Četiri štakora koji su trajno prihvatali 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 mладунčadi 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 mладунčadi, 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 funkcioniра 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 mlađih štakora "Y" nakon presadijanja 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 mладунчад iz grupe SHY, koja su visoko tolerantna na prvi majčin kalem, imala u serumu hemaglutinine, iako u niskoj koncentraciji. Ovi su mlađi odbacili ponovljeni kalem. Preostala visoko tolerantna mладунчад 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 ovde 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 pokušima 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 fetuse. Prijenos stanica nije ograničen samo na majčine, već se na isti način mogu prenijeti i tuđe stanice, kada se injiciraju u gravidnu ženu.

Produciranje 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 pokušima na genetički nesrodnim štakorima (vidi 5.2.) nismo uopće pratili humoralnu reaktivnost, a u pokušima 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 hemaglutininii (Gorer i Mikułska 1954), leukoaglutininii (Amos 1953), hemolizini (Gorer i O' Gorman 1956) i citotoksini (Terasaki i sur. 1961). Intenzitet humoralnog odgovora pratili smo, u ovim pokušima, određivanjem razi-

ne hemaglutinina u krvi majke i mlađih. 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 humorálni odgovor mlađunčadi (Evans i Smith 1963) pa smo, u ovim pokusima, pratili i djelovanje protutijela u tom smislu.

U dosad opisanim pokusima odvojeno smo pratili utjecaj imuno-kompetentnih stanica, od utjecaja humorálnih protutijela, prenesenih iz organizma majke u mlađunčad. No, kada životinju senzibiliziramo alogenim tkivom, tada se u njenom organizmu razvija dvostruka reakcija, koja se očituje i staničnom i humorálnom 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 pokuša na genetički čistim sojevima (5.1.) su pokazali da oba tipa ove imunosne reakcije mogu imati odraza na imunološku reaktivnost mlađih. Stoga smo u pokusima, koji se dalje iznose, radili na genetički nesrodnoj populaciji štakora ("Y"), što nam je omogućilo da na svakom mlađunčetu promatramo utjecaj ne samo humorálnih 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 mlađih. 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 treba lo 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. Iсти 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 presadeđenih 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 prihvачeno. Ova krivulja je vrlo slična krivulji za očeve kaleme u grupi B.

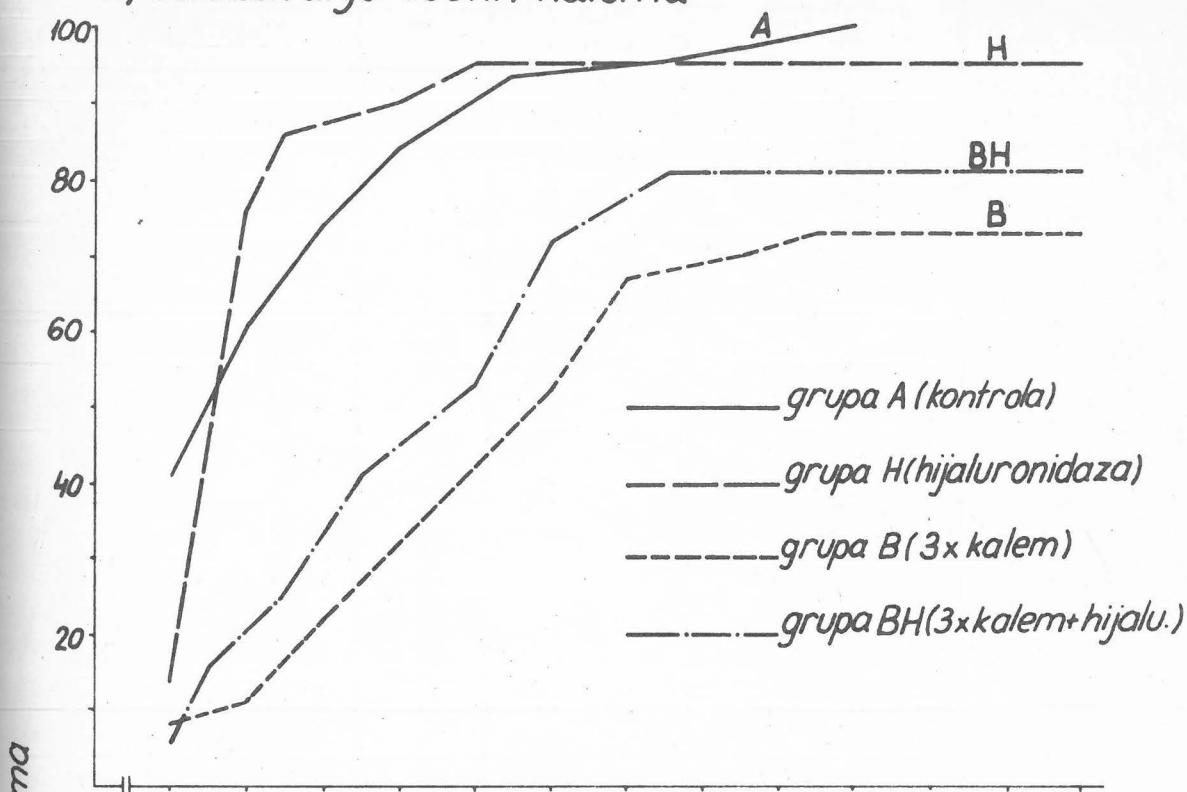
Na slici 10b prikazano je odbacivanje majčinih kalema. Ove krivulje se međusobno još više razlikuju, negoli krivulje za očeve kaleme. Krivulja odbacivanja majčinih kalema u grupi BH smještena je između krivulje za grupu H i krivuljâ za grupe A i B, koje su međusobno vrlo slične. Odbacivanje u grupi BH 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 prihvачeno. Odbacivanje je najsporije u grupi H, a krivulja koja ga prikazuje je izrazito položena. U ovoj grupi je čak 73% kalema trajno prihvачeno.

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.

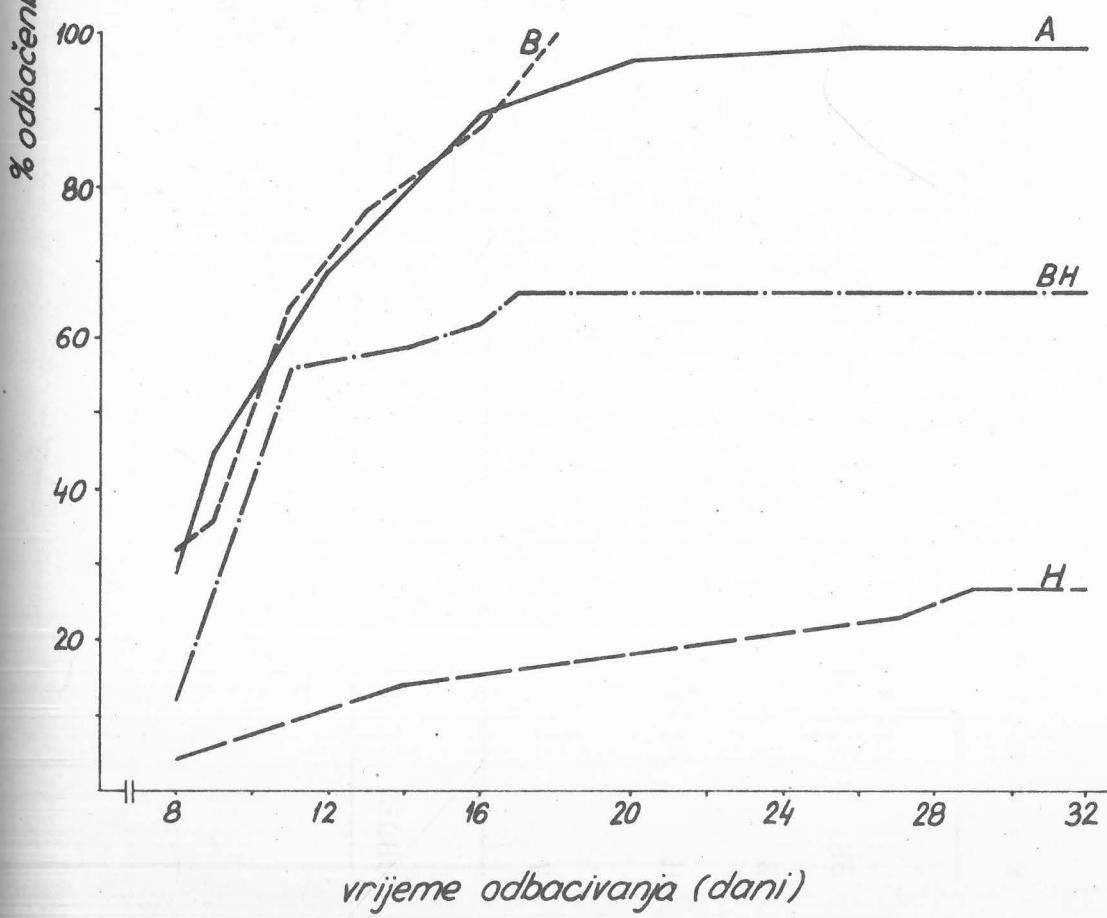
U kontrolnim grupama A i H slična je učestalost tolerancije prema očevim kalemima (Tablica IX). Grupe B i BH znatno se razlikuju od kontrolnih grupa. U ovim grupama je dvostruko niža učes-

Dinamika odbacivanja roditeljskih kalema presadjenih 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 mlađih, obzirom na stupanj tolerancije prema majčinom kalemu, 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% mlađih 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	VIŠOKO TOLERANTNI	SVO $X \pm SP^X$	p
A	0	62	45 (72%)	16 (26%)	1 (2%)	11,3 \pm 0,5	H : A \angle 0,01
H	hijalorunidaza	22	1 (4%)	5 (23%)	16 (73%)	19,0 \pm 3,0	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 prođeno SVO. Međutim, i u ovoj grupi nalažimo 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.

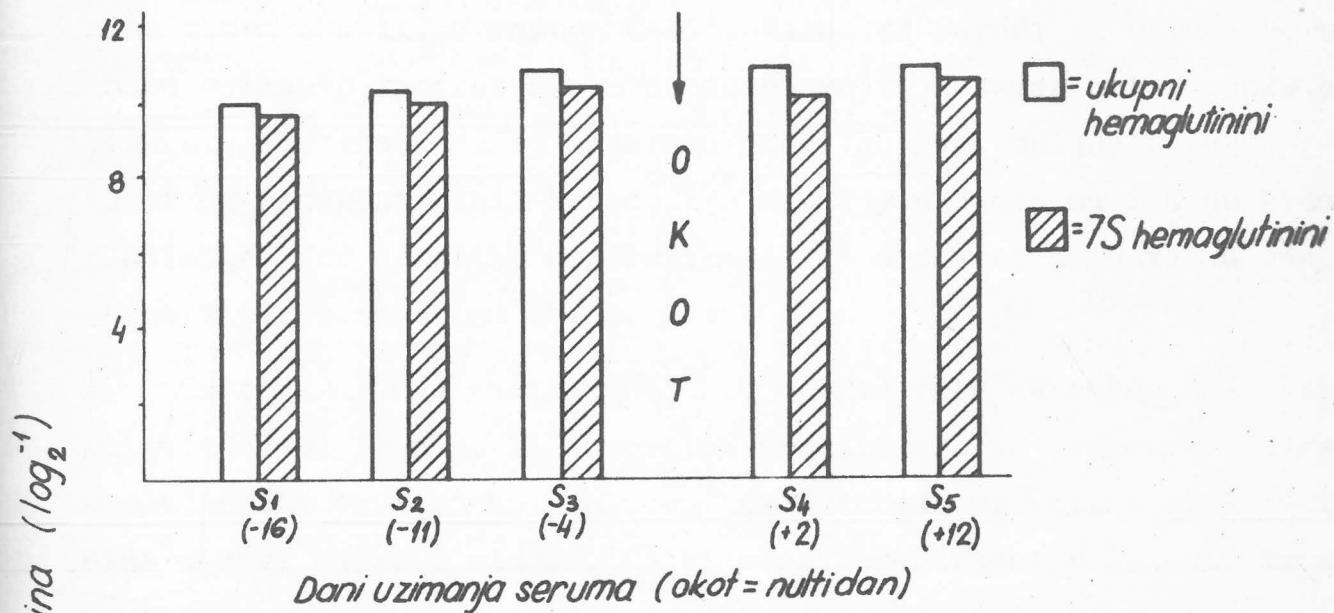
5.4.3. PRODUKCIJA HEMAGGLUTININA

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 dalnjem tekstu iznosimo rezultate hemagglutinacijske aktivnosti krvnog seruma majki i njihove mladunčadi u grupi BH. U ovim pokusima odlučili smo se za hemagglutinacijsku 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).

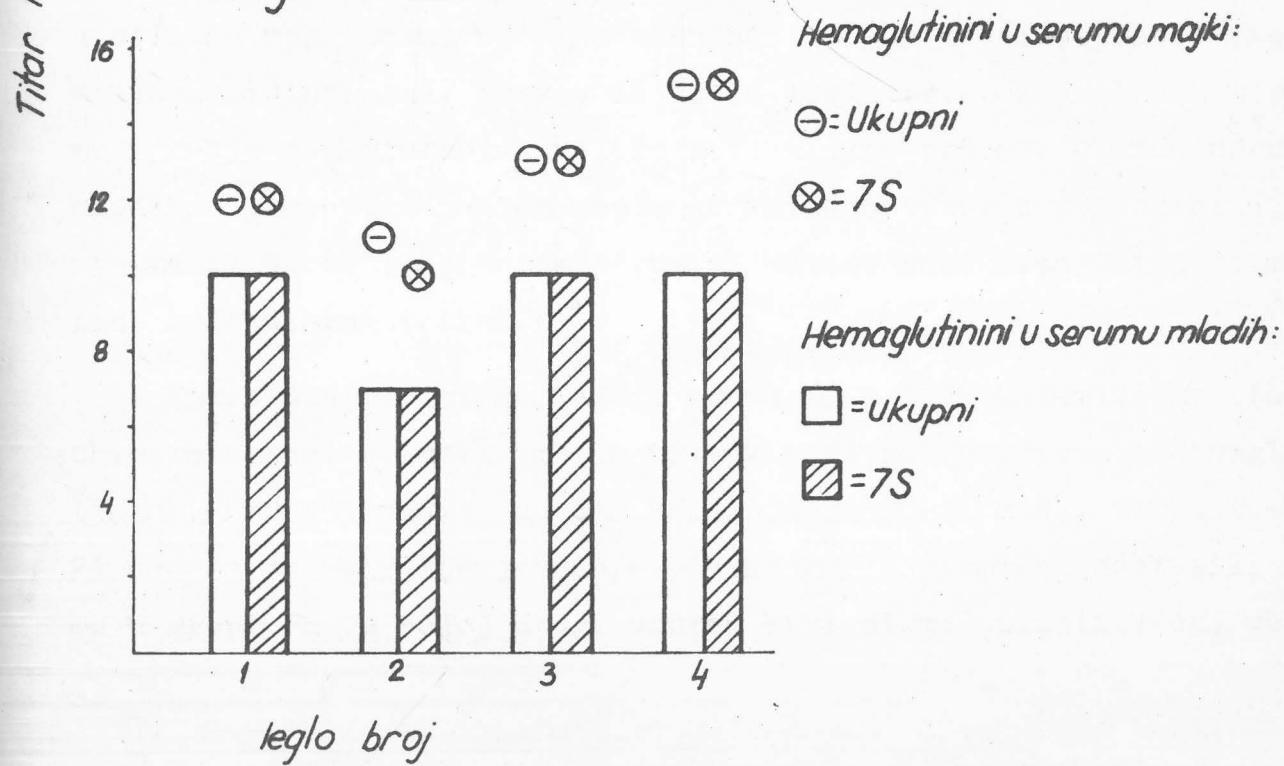
Nakon trokratnog kalemljenja ženki iz grupe BH, kožnim kalemi ma mužjaka, uzimali smo u 5 navrata uzorak njihove krvi za određivanje titra hemagglutinina prema eritrocitima mužjaka. Srednje vrijednosti titra hemagglutinina, izražene kao \log_2^{-1} , prikazane su na slici 11a. Nanesene su vrijednosti titra ukupnih hemagglutinina, kao i hemagglutinina malene molekularne težine (7S tipa). Ženkama su vađeni uzorci krvi 16, 11 i 4 dana prije okota mlađih, 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. Hemaglutinacijska aktivnost je u serumima vrlo visoka (prosječna vrijednost titra oko 11, a raspon 8-15). Važno je istaći da obrada seruma sa merkaptoetanolom skoro uopće ne snizuje hemaglutinacijsku aktivnost, što znači da su u serumu majki gotovo isključivo zastupljeni 7S hemaglutininii. Porod nije bitnije utjecao na razinu hemaglutinina, jer je titar u serumima 4 i 5 neznatno porastao u odnosu 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 mладунčad, te b) ako prolaze, kakvi su odnosi razine hemaglutinina u krvi majke i mладих. Da bi se o tome orijentirali uzimali smo i uzorak krvi od mладунčadi stare 2 dana, što smo objasnili u opisu pokusnih grupa. Ovi rezultati su prikazani na slici 11b, a odnose se na titar ukupnih i 7S hemaglutinina u serumu majki i njihove mладунčadi, iz 4 legla. Serum majke uvek ima viši titar hemaglutinina nego serum njene mладунčadi. Serum majki je sadržavao samo 7S hemaglutinine, izuzev majke iz legla br.2, koja ima u serumu i nešto hemaglutinina velike molekularne težine. Obrada seruma mладих s merkaptoetanolom uopće ne snizuje titar hemaglutinina, što znači da se u njihovim serumima nalaze samo hemaglutinini male molekularne težine.

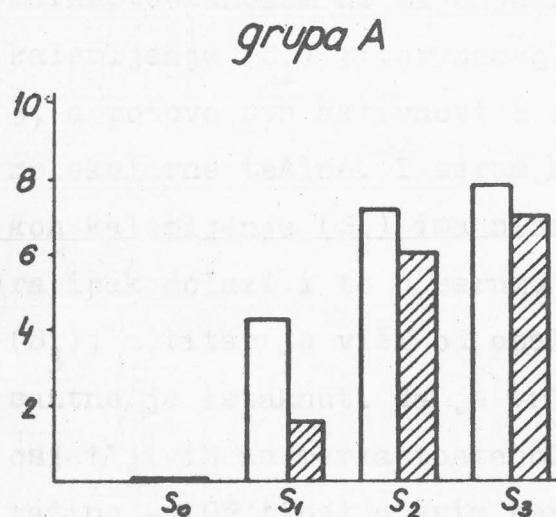
Nakon što smo mладунčad iz grupe A, H i BH kalemili roditeljskim kalemima, uzimali smo im uzorak krvi za određivanje hemaglutinina. Krv smo vadili na dan kalemljenja (0-ti dan), te 7, 11 i 21 dan nakon kalemljenja. Od ove šeme smo djelomično odstupili samo u grupi BH, u kojoj drugi uzorak krvi nismo uzimali 7-og, već

5-og dana nakon kalemljenja. Slika 12 prikazuje razinu ukupnih i 7S hemaglutinin u serumu mlađih protiv eritrocita majke (lijeva strana slike) i eritrocita oca (desna strana slike). Štakori u kontrolnoj grupi A nemaju prirodnih hemaglutinin 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 PH bitno se razlikuje od opisanih grupa, ne samo za eritrocite oca, već i majke. U ovoj grupi serum mlađih S_0 sadržava hemaglutinine protiv očevih eritrocita već i prije kalemljenja mlađih sa njegovom

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

ERITROCITI MAJKE



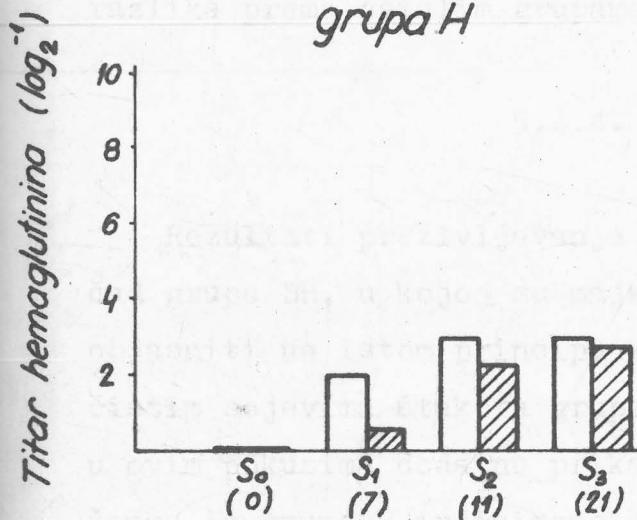
ERITROCITI OCA

□ ukupni hemaglutinini
▨ 7S hemaglutinini

grupa A

Sample	White Bar (ukupni hemaglutinini)	Hatched Bar (7S hemaglutinini)
S ₀	~0.1	~0.1
S ₁	~4.2	~1.6
S ₂	~6.5	~4.8
S ₃	~7.5	~7.0

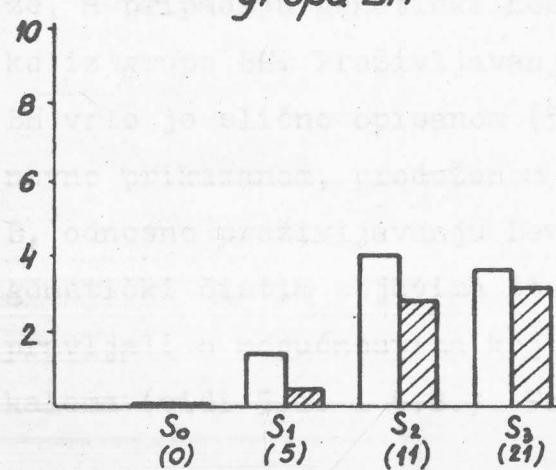
grupa H



grupa H

Sample	White Bar (ukupni hemaglutinini)	Hatched Bar (7S hemaglutinini)
S ₀ (0)	~0.1	~0.1
S ₁ (7)	~3.2	~1.4
S ₂ (11)	~5.2	~4.0
S ₃ (21)	~6.2	~5.2

grupa BH



grupa BH

Sample	White Bar (ukupni hemaglutinini)	Hatched Bar (7S hemaglutinini)
S ₀ (0)	~5.2	~5.2
S ₁ (5)	~3.2	~3.0
S ₂ (11)	~2.5	~2.5
S ₃ (21)	~4.8	~4.5

Dani nakon kalemnjenja

kožom. Titar hemaglutinina u S_0 iznosi oko 5, a obrada seruma sa merkaptoetanolom 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 merkaptoetanol (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 mладунčad 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 nesrođnoj populaciji ("Y"), kao i ženke iz grupe BH. Preživljavanje očevih kalema na mладунčadi 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 čemo je sada i šire razmotriti u svjetlu opisanih rezultata. Stoga čemo u diskusiji podrobno obraditi prijenos majčinih protutijela i aktivni humoralni odgovor mладунčadi, a rezultate preživljavanja očevih kalema uglavnom čemo 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 malene 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 mlađih pasivno prenesena iz organizma majke. Visoka razina hemaglutinina u serumu mlađih (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 dale 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 antiga 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 mладог 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 štakora 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 objasnjava 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 prije-laz 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_o , koji je izvađen na dan ušivanja cčevog 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 govorila bi 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 mладунчади. To bi bilo u skladu i sa razlikama u titru hemaglutinina između majke i mlađih, 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_o od mlađih (serum je vađen 25-30 dana nakon okota). S obzirom da protutijela u serumu S_o mlađih imaju relativno visoku razinu, to možda ukazuje da ih mладунче i sporo eliminira.

Nalaz protutijela prema očevim eritrocitima, u serumu mlađih, prije nego što su kalemljeni njegovom kožom (S_o), treba razmotriti u vezi s znatno dužim preživljavanjem očevih kalema u grupi BH (Tablica IX). S tog stajališta posebno je važan nalaz Kalissa (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_o) i preživljavanja očevog kalema ne postoji ($r = -0,20$; $p > 0,1$). 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 mладунčad 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 izvaden 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 mlađih 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 produkciu 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. Producija 7S hema-

glutinina pojačava se tek u kasnijem razdoblju, a tada naglo pada razina 19S hemaglutinina (Kren i sur. 1968). U serumu izvadenom 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 mладунčadi 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 mладунčadi 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 mладунčad 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 imaju efikasnost u tom smislu, mnogo manja (Pearlman 1967). Ako to primjenimo 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 s3 mладунčadi.

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

Već smo na više mesta ukazali na neke načine kojima bi se mogla ostvariti ova kompleksna promjena reaktivnosti mlađih 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 drugaćijem 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 mладунčад grupe BH (s_0), sadržavala su samo 7S hemaglutinine. Ova protutijela su bila prisutna u cirkulaciji mладих još i prije negoli su oni došli u kontakt sa očevim antigenima iz kožnog kalema. Nadalje, prisustvo hemaglutinins i u serumu 5-og dana, (s_1), 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 antigene ; 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 kalemlijenja. Sve navedene točke opširno smo razmotrili i objasnili u ovom tekstu.

U dosadašnjoj diskusiji isticali smo ulogu protutijela malene 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 prihvativom objašnjenju naših rezultata. U dalnjem 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 ^{dokazanim} da 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 mišu. 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). Iстicali 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_o), mladih iz grupe BH, našli samo 7S hemaglutinin, 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 najprihvativijim 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 (1969 a 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 oporavljavaju, 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, npr. vezanjem hemaglutinina za antigene kalema i otežavanjem prijenosa "oslobodjenih" 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 faciliatačkim protutijelima, koja su istovremeno prisutna u serumu, a u tome su im mogla pomoći ne samo hemaglutinacijska, već i druga protutijela hiperimunog serumu. .

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 postoji značajnije razlike u preživljavanju očevih kalema na mladunčad. Prema tome, na opisane učinke hijaluronidaza nije znatnije utjecala. To je

i razumljivo kada se podsjetimo da protutijela 7S tipa mogu slobodno, i bez pomoći hijaluronidaze, prolaziti preko fetalnih barijera u cirkulaciju mlađih. 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 mlađunčad, 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. Producenje života kalema bilo je skromnije izraženo, negoli u **grupi H**, a ni jedna životinja nije trajno prihvatala 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-L 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 majčinim stanicama vjerovatno ima i imunokompetentnih, što je od posebnog značaja. Imunokompetentne stanice se mogu i u domaćinu ^{pro}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 mlađih prema majčinim kalemima, što smo našli u grurama 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 potreban za indukciju bolesti kržljanja, iznosi 8×10^6 . 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 starica u sve fetuse, ipak ne bismo mogli očekivati jednakо preživljavanje majčinih kalema. Jasno je da to još više dolazi do izražaja kada se promatraju rezultati na mладунčadi iz više legala, iako su njihove majke identično tretirane.

Interesantno je, da ni jedno mладунче 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 stаница 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 ^{se} može lakše shvatiti veću učestalost visoko tolerantnih štakora, u grupama H i BH, a da pri tome ni jedno mладунче ne pokazuje znakove bolesti kržljanja. Moglo bi se misliti i da je broj prenesenih majčinih stаница, u datim odnosima u tkivnoj srodnosti, bio upravo dovoljan da se ^u neke mладунčadi 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 truđnoće, već 4-5 dana prije okota mlađih 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 mlađim grupama H, protiv onog dijela građe, koji je fetus naslijedio od oca. Ovaj snažni imunološki atak ne treba smatrati bezopasnim za reaktivne stanice, o čemu postoji brojni dokazi. Tako Boyse (1959), te Gorler i Boyse (1959b) smatraju da imunokompetentne stanice mogu pretrpjjeti 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 crnačenim miševima, koji su bili injicirani stanicama F_1 hibrida. Možemo pretpostaviti da su 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 mладунčadi grupe BH, a njihova reaktivnost na majčine kaleme skoro da potjeća na fenomen "sve ili ništa". Naime, u ovoj grupi nalazimo dvije skupine životinja: visoko tolerantne (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 mlađih grupe BH, moglo se je очekivati oštećenja mладунčadi bilo prenesenim humoralnim protutijelima ili stanicama. Takva oštećenja opažena su samo u mладунčadi iz 1 legla. Slično smo opažanje iznijeli i u opisu rezultata grupe B (vidi 5.2.), u kojoj je također mладунčad iz jednog legla uginula nekoliko dana nakon skrota. I mlađi 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 mlađih 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 mlađunčadi 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 mlađunčadi. Serum majke, čiji su mlađi uginuli, izazvao je, i u ovom pokusu, teška oštećenja mlađih i njihovu smrt unutar 4 dana po okotu. Iako je ⁱ serum druge ženke imao istu razinu hemaglutinina, njegov prijenos ni ovaj puta nije doveo do oštećenja mlađih. Kako ove majke nisu injicirane hijaluronidazom, to opisana oštećenja mlađih treba pripisati djelovanju humoralnih protutijela. Prema tome, i oštećenja mlađih u odgovarajućem leglu grupe BH vjerovatno je, također, izazvano humoralnim protutijelima. Tome u prilog govori i vrlo kratko vrijeme unutar kog je uginula sva mlađunčad. Opisana klinička slika mlađunčadi potiskeća na hemolitički sindrom, koji je relativno čest u kliničkoj praksi. Međutim, vrlo teško ^{ga} 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 prihvati u našim pokusima, jer su majke snažno senzibilizirane na očeva tkiva i posjeduju visoki titer 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 začuhuje 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 podleći 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 imenog seruma ili imuniziranih stanica domaćinovog soja, u svrhu spriječavanja 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 ⁱ serum majke, tada je 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 snažrog napada senzibiliziranih stanica majke, što je inače moglo imati i fatalne posljedice za fete.

Obzirom da smo majke ove mладунчади senzibilizirali očevim tkivima, to se je moglo prepostaviti da će ovako snažna senzibilizacija imati odraza i na tok same trudnoće. Tim više, što se i u kliničkoj praksi neki slučajevi višekratnih spontanih 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. Z A K L J U Č N I P R E G L E D

Kako je vidljivo, iz izloženih pokusa, htjeli smo ispitati kako stanična i humorala protutijela, koja se prenose iz organizma majke u mладунčad, utječu na njihovu reaktivnost prema alogenim tkivima. Pri tome smo pratili i stanični i humorali 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 visoko-srodnim 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 mладунčad.

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 mладунčad ($p < 0,001$). Ovo opažanje je na razini opažanja iznesenog pod a/, pa se i tumači istim mehanizmom.

d/ Producenje života majčinih kalema, presađenih na mlađe, može se postići injiciranjem gravidnih ženki hijaluronidazom ($p < 0,01$). Pri tome mnoga mlađunčad trajno prihvata majčine kaleme. Ovaj nalaz se tumači specifičnom stečenom tolerancijom, koja nastaje kao rezultat kimerizma u mlađunčadi. Spomenuti učinak je specifičan, jer mlađi 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 mlađunčad ($p < 0,001$). Isto se događa i sa Lewisovim splenocitima injiciranim u gravidne ženke genetički nesrodne populacije ("Y"), jer i njihova mlađunčad duže nosi Lewisove kaleme ($p < 0,05$).

B. HUMORALNA REAKTIVNOST MLADIH ŠTAKORA

a/ Hemaglutinacijska protutijela iz krvi majke prelaze u cirkulacijski sustav mlađih. Razina hemaglutinina u serumu rođenčadi niža je negoli u serumu njihovih majki. U serumu mlađih mogu se utvrditi samo protutijela malene molekularne težine (7S tipa). Fetalne membrane i sluznica crijeva djeluje po put "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 izvanim 11-og i 21-og dana, nakon kalemljenja, skoro sva hemaglutin-

nacijska aktivnost pripada protutijelima 7S tipa.

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

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

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

C. UČINAK PRENESENIH STANICA I STANIČNIH PROTUTIJELA

a/ Kako smo već istakli (pod A.d) prijenos majčinih stanic inducira u neke mlađunčadi 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 prihvata 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 spontanih 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 mладунче 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 mладих, 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 le-gala (grupa BH - 5.4.), u drugu gravidnu majku, izazvac je istu kliničku sliku sa fatalnim ishodom. Visoka razina hemaglutininina u serumu ove majke (titar 16) nije uzrok oštećenja mладих, jer mладунčad majke, koja je imala isto tako visoku razinu protuti-jela, 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. LOUTIT, 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, ^RJ. Natl. Canc. Inst., 24: 699
- BREYERE E.J. i M.K. BARETT, 1960b, ^RJ. 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 & Stratton, 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 Lon-
don, 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", vol.4, (izd. Dixon i Humphrey), Acad. Press, New York, 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. LOUTIT 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 Immunolo-
gy"(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. BRAWN, 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. LINSCOTT 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. MICHEL, 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
- KALISS N., 1956, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 42: 269
- KALISS N., 1957, Ann.New York Acad.Sci., 64: 977
- KALISS N., 1958, Cancer Res., 18: 992
- KALISS N., 1962, Ann.New York Acad.Sci., 101: 64
- KALISS N., 1966, Ann.New York Acad.Sci., 129: 155
- KALISS 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 & Stratton, 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 & Stratton, 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-matematički 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: 235
- 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
MATHE G., J.L. AMIEL, M. MATSUKURA i A.M. MERY, 1964, Brit.J.
Haemat., 10: 257
MATHE 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, ^u"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
- SCREN 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 Jaroškova), 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. MICKEY, 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 Jaroškova), 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 transplantacija", 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, Transplantation, 8: 618

VODA D., 1970, Magisterski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

VOS O., M.J. DeVRIES, J.C. COLLENTEUR i D.V. vanBekkum, 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

GAUGNA BIBLIOTEKA
RIJEKA