B 2741

MALIGNUS LYMPHOMÁK IMMUNMODULÁCIÓS BEAVATKOZÁSOKAT KÖVETŐ MEGJELENÉSE ÉS IMMUNOLÓGIAI JELLEMZÉSE

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Írta:

Baranyi Lajos

Szeged

1985

JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM
KÖZPONTI KÖNYVTÁRA
SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

oldal

1. Bevezetés 1

2. Anyag és módszer 5

2.1. Kísérleti állatok 5
2.1.1. Egértörzsek 5
2.1.2. Nyulak 6

2.2. Tápfolyadékok és kiegészítésükre használt anyagok, pufferek és egyéb anyagok 7

2.3. Sejtszuszpenziók készítése 8

2.4. A sejtszuszpenziók ultrahangos feltárása 9

2.5. Az alloantisavók előállítása 10

2.6. Xenogén antithymocyta savó (ATS) előállítása 11

2.7. Újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció 12

2.8. Farokbőr allotranszplantáció 12

2.9. Ellenanyag közvetítette komplement-dependens cytotoxicitási teszt 15

2.10. Poliklonális T és B sejt mitogének stimuláló hatásának vizsgálata 16

3. Eredmények 18

3.1. Malignus lymphomák újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukciót követő halmozott megjelenése 18

3.2. A lymphomák immunhisztokémiai vizsgálata és klasszifikációja 26

3.3. A transzplantációs immuntolerancia és a lymphomák előfordulásának összehasonlító vizsgálata 32

oldal

3.3.1. Lymphomák előfordulása és az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció eredményessége különböző egértörzs-kombinációkban 33

3.3.2. B10 → A transzplantációs tolerancia-indukción átesett lymphomás és nem lymphomás A egerek teszt allograft-jainak túlélési ideje 36

3.3.3. A transzplantációs immuntolerancia adoptív sejttranszferrel való átvihetősége és a malignus lymphomák megjelenése 36

3.4. A B10 → A tolerancia-indukciót követő lymphoma-megjelenés feltételei 43

3.5. A B10 → A tolerancia-keltésen átesett egerek immunológiai állapotának megváltozása 47

4. Diszkusszió 55

5. Az eredmények rövid összefoglalása 67

6. Köszönetnyilvánítás 71

7. Irodalom 72

1. BEVEZETÉS

Amikor a dolgozat alapjául szolgáló kísérletes munkákba kezdtünk, az a laboratóriumunkban hosszú ideje folyó transzplantációs kísérletek folytatása volt. A kísérleteknek a lymphomakutatás irányába történő kiterjesztését az indokolta, hogy egyre nagyobb jelentőségük van a humán gyakorlatban végzett sikeres szervátültetéseket követően halmozottan megjelenő malignus átalakulásoknak, közöttük a lymphomáknak. Az USA-ban és Nyugat-Európában végzett első felmérés során 6297 vesetranszplantált beteg adatait dolgozták fel. A Hoower és Fraumeni által 1973-ban közzétett adatok (1) szerint a férfiak 350-szer, a nők 700-szor gyakrabban betegedtek meg malignus lymphomában, mint az várható lett volna. Azóta számos újabb adat támasztja alá a fenti megfigyeléseket, bár valamivel kisebb előfordulási gyakoriságokról számolnak be (2, 3, 4, 5, 6). E lymphomáknak a transzplantáció körülményeivel, a transzplantációt követő kilökődési reakciókkal, az immunszuppresszív kezelésekkel, vagy a kialakuló specifikus toleranciával való kapcsolatának a közvetlen, betegeken való elemzése csak korlátozottan lehetséges. Ennek ellenére nagyon kevés állatkísérleten alapuló modellről számol be az irodalom (7). A beltenyésztett egértörzseken laboratóriumunkban végzett transzplantációs kísérletek éppen az egerek izogenitása miatt jól definiált transzplantációs modellnek tekinthetők. E kísérletek során (hasonlóan a klinikai tapasztalatokhoz)

malignus lymphomák halmozott megjelenésére figyeltünk fel. Úgy ítéltük meg, hogy e modell alkalmas lehet arra, hogy esetleges összefüggéseket keressünk a lymphomák megjelenése és a transzplantációk eredményessége között. E vizsgálatok annál is inkább indokoltak voltak, mert tisztázatlan a transzplantációkat követően megjelenő lymphomák etiológiája. Számos elképzelés alapja az, hogy a transzplantációt követő folyamatos antigéninger indítja el a lymphoid sejtek proliferációját, ami kedvez a malignus átalakulásoknak (8). Más elképzelések szerint a transzplantációkat követő masszív immunszuppresszív kezelés a felelős a lymphomák és egyéb malignomák megjelenéséért, mert csökken a "természetes immunológiai védekezőkészség" (immune surveillance) hatékonysága (9). Az általunk használt újszülöttkori tolerancia-indukciós modell ez utóbbi szempontból "tisztának" tekinthető, hiszen semmiféle immunszuppresszív kezelést nem alkalmazunk, így kizárhatók azok a feltételezések, amelyek az immunszuppresszív szerek (azathioprin, steroidok, chlorambucil, cyclophosphamid vagy újabban a cyclosporin A) direkt vagy indirekt tumorkeltő hatását tartják elsődlegesnek (10).

Szélesebb alapra helyezik a lymphoma-keletkezés problémakörét azok a megfigyelések, melyek szerint nemcsak a transzplantációkat követően jelentkeznek gyakrabban malignus lymphomák, hanem egyéb abnormális immunológiai állapotokban is, mint pl. a primer immundeficienciákban /ataxia teleangiectasia, Wiscott-Aldrich syndroma (5, 11)/,

az autoimmun megbetegedésekben és a posztirradiációs állapotokban (12), sőt az újabban hirhedtté vált AIDS során is (13).

Ma még nincs olyan átfogó elmélet, amely a lymphomák keletkezését egységes alapon tudná magyarázni, hiszen nemcsak a lymphomák keletkezése történik ennyire különböző esetekben, hanem maga a lymphoma kifejezés is egy igen heterogén betegségcsoportot takar. A klinikai és patológiai megfigyelések a nem Hodgkin-lymphomák esetén három, a lymphoma várható malignitását meghatározó fő csoportot különítettek el. Azok a lymphomák, amelyekben apró, érett lymphocyták alkotják a malignus klónt, aránylag jó prognózisúak. A közepesen malignus csoportba például a centrocytás, centroblastos lymphomák tartoznak, amelyek már éretlenebb lymphoid elemeket jelentenek. A nagyon malignus lymphomák csoportjába az igen éretlennek tartott lymphoblastos, immunoblastos lymphomákat sorolják (14). Ennél a felosztásnál, illetve az egyes osztályok alcsoportjainak meghatározásánál elsősorban hisztológiai és morfológiai adatokra támaszkodtak. Ez a jelenlegi klinikai igényeket többé-kevésbé kielégíti (14).

Számunkra sokkal fontosabb a generikus elv szerint való lymphoma osztályozás. Ennek az alapja az, hogy az egyes lymphomák a normális lymphocyta differenciálódás egy-egy jól definiált szintjének a tumoros transzformálódását képviselik. Ez azt is jelenti, hogy a transzformált sejtek eredeti, normális immunfunkciói, valamint az adott

érési fokon álló normális sejtekre jellemző antigének (markerek) megmaradnak (15). A lymphomák komplex, szövettani, morfológiai, valamint a megtartott funkciót és a sejtfelszíni markereket figyelembevevő osztályozásával a lymphomák egy olyan rendszeréhez jutunk, amely szinte tükrözi a normál lymphoid differenciáció egyes lépéseit (16, 17, 18). A malignus transzformálódás pedig úgy szerepel, mint a differenciálódás egy adott szinten történt blokkolódása (19). Az így elhatárolt humán lymphoma kategóriák szinte teljesen megfelelnek a háziállatokban (szarvasmarha, juh, kutya), valamint az egerekben megfigyelt lymphoma kategóriáknak (7, 20).

Ez a megállapítás is azt támasztja alá, hogy értékes adatokat nyerhetünk a malignus lymphomák keletkezéséről, tulajdonságairól kísérletes egérmodelleken. Az általunk kialakított kísérletes egérlymphoma-modelleken végzett vizsgálatainkkal - ismerve a rendszer okozta korlátokat is - ehhez kívántunk hozzájárulni.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Kísérleti állatok

2.1.1. Egértörzsek

Kísérleteinkben A, A/Ph, A.TH, A.TL, C57BL/10 ScSn (B10), CBA, C3H/Di, C3H.SW izogén egértörzseket használtunk. Az A, B10 és CBA egértörzseket a SZOTE Kísérletes Sebészeti Intézet állatházában tenyésztjük és tartjuk fenn, a többi egértörzsből a szükséges állatokat az MTA SzBK Központi Állatházából szereztük be. Az egerek a LATI (Gödöllő) által előállított konvencionális egértápot és csapvizet fogyasztanak ad libitum.

Az egértörzsek izogenitását a Silvers-féle körbegraftolási módszerrel (21) kétévente ellenőrizzük. Az A egértörzs két alvonala (A és A/Ph) a SZOTE Kísérletes Sebészeti Intézet állatházában (A), illetve az SzBK-ban fenntartott alvonal (A/Ph) a körbegraftolási teszt alapján izogén.

A kísérleteinkben felhasznált egértörzsek H-2 genotípusának (az egerek fő hisztokompatibilitási komplexének) főbb jellemzőit Klein összefoglalója alapján (22) az 1. táblázat tartalmazza.

A tolerancia-indukciókhoz lépsejtdonorként használt F_1 hibrid egereket - (CBAxA)F_1, (B10xCBA)F_1, valamint (B10xA)F_1 hibrideket - a SZOTE Kísérletes Sebészeti Intézet állatházában állítottuk elő.

1. táblázat. A kísérletekben használt egértörzsek és H-2 genotípusuk

Törzs	H-2 haplotípus	H-2 szubrégió allélek		
		K	I	D
A és A/Ph$^+$	a	k	k/d	d
A.BY$^+$	b	b	b	b
A.TH$^+$	t2(th)	s	s	d
A.TL$^+$	t1(tl)	s	k	d
B10	b	b	b	b
CBA	k	k	k	k
C3H/Di^o	k	k	k	k
C3H.SW^o	b	b	b	b

Az azonos (+, o) szimbólummal jelöltek ún. H-2 kongenikus egértörzsek, amelyek egymástól csak az ún. erős hisztokompatibilitási (H-2) antigénekben különböznek, gyenge hisztokompatibilitási antigénjeik egyformák.

2.1.2. Nyulak

Helyi tenyésztőtől beszerzett, 2-4 kg súlyú újzélandi fehér nyulakat vásároltunk és az állatokat felhasználás előtt legalább 10 napig megfigyelés alatt tartottuk. A nyulak a LATI által előállított nyúltápot és csapvizet

fogyasztottak ad libitum.

2.2. Tápfolyadékok és a kiegészítésükre használt anyagok, pufferek és egyéb anyagok

- Dulbecco-féle PBS (GIBCO, USA)
- Hanks'-féle BSS (GIBCO, USA)
- Eagle-féle MEM (GIBCO, USA) Hanks' alapú minimálisan szükséges tápfolyadék 0,35g/l $NaHCO_3$-tal kiegészítve
- RPMI 1640 (GIBCO, USA), 10 mmol HEPES-sel, 2 mmol L-Glutaminnal, 2 g/l $NaHCO_3$-tal, 100 mg/l streptomycinnel, 10^5NE penicillinnel és 10% fötális borjúsavóval (FCS) kiegészítve.

A fentiek por alakban kiszerelt médiumok, melyeket háromszor desztillált vízben oldunk fel. A tápfolyadék pH-ját 7,3-ra állítjuk be és és 0,2 μm pórusméretű Millipore membránszűrőn sterilre szűrjük. A már sterilre szűrt médiumot egészítjük ki az antibiotikumokkal és a steril, 56°C-on 30 percig dekomplementált FCS-sel. A kész táfolyadékokat 5°C-on tároljuk.

- Hemolizáló puffer (TRIS-NH_4Cl puffer), pH 7,2

  A) 20,6 g/l tris-(hidroxi-metil)-amino-metán

  B) 8,3 g/l NH_4Cl

  A fenti törzsoldatokból 10 ml A-t és 90 ml B-t kell összemérni, a pH-t sósavval 7,2-re beállítani és sterilre szűrni.

- Tengerimalac komplement, liofilezett (HUMAN)
  A felhasználás előtt az egyes poolok komplement aktivitását teszteltük.
- Tripánkék oldat, sejtvitalitás vizsgálatokhoz (trypan blue, Edward Gurr Ltd, Anglia): 0,14%-os törzsoldat háromszor desztillált vízben, 4 részhez 1 rész 4,25%-os NaCl oldat (NaCl, REANAL, alt) háromszor desztillált vízben. A hígított tripánkék oldat frissen készítendő.
- Türk-oldat leukocyta számoláshoz (BIOGAL)
- /Methyl ^{3}H/ Thymidine, 40 MBq/ml aktivitású (UVVVR, Csehszlovákia)
- Concanavalin A (Con A; PHARMACIA, Svédország): 0,5 mg/ml koncentrációjú törzsoldat PBS-ben, sterilre szűrve
- Bakteriális lipopoliszaccharid E. coliból (LPS; SIGMA): 0,5 mg/ml koncentrációjú törzsoldat PBS-ben, sterilre szűrve
- Pokeweed mitogén (PWM; SIGMA): 0,25 mg/ml koncentrációjú törzsoldat PBS-ben, sterilre szűrve.

2.3. Sejtszuszpenziók készítése

A donor állat elvéreztetése után aszeptikus körülmények közt kipreparáljuk a megfelelő szerveket vagy szöveteket: a thymust, a lépet, a nyirokcsomókat vagy a tumoros

szöveteket és pár csepp 10% FCS-tartalmú médiumban homogenizáljuk (ollóval apró darabokra vágjuk, hajlított üveglapáttal szétnyomkodjuk és további kb. 5 ml médium hozzáadása után Pasteur-pipettával tovább szuszpendáljuk. A szuszpenziót 4 rétegű gézen 15 ml-es centrifugacsőbe szűrjük, majd a gézt további 4-5 ml médiummal átmossuk. A szűrt szuszpenziót 350 g-vel 10 percig 25°C-on centrifugáljuk. Az üledéket 2x10 ml médiumban mossuk centrifugálással és végül 1-2 ml médiumban reszuszpendáljuk. Meghatározzuk a sejtkoncentrációt és a tripánkék festékkizárási teszt segítségével a vitalitást, majd beállítjuk a kívánt sejtkoncentrációt. A kísérletekhez csak olyan szuszpenziókat használtunk fel, amelyek kiinduló vitalitása meghaladta a 85%-ot. Az esetek túlnyomó többségében 90% feletti vitalitásúak voltak a szuszpenziók.

2.4. A sejtszuszpenziók ultrahangos feltárása

Az előkészített és 0°C-ra hűtött sejtszuszpenziókat az MSE PG-120 típusú ultrahangos dezintegrátorba helyeztük úgy, hogy a dezintegrátor fej része a szuszpenzió felszínéhez ért. Az ultrahangkezelést 3x1 percig, folyamatos hűtés mellett alkalmaztuk a legerősebb fokozatban. A dezintegrálás hatékonyságát mikroszkóppal ellenőriztük, meghatároztuk az épen maradt sejtek koncentrációját. Az ultrahangkezelést követően a sejtek túlnyomó része dezintegrálódott, legfeljebb minden milliomodik maradt épen.

Az ultrahanggal feltárt sejtszuszpenzióból felülúszót 7000 g-vel 20 percig 0^{o}C-on végzett centrifugálással nyertünk.

2.5. Az alloantisavók előállítása

A donorként használt felnőtt nőstény és hím egerekből a thymus, a lép és a nyirokcsomók kipreparálása és összegyűjtése után a már ismertetett módon sejtszuszpenziót készítettünk. A recipiens egereket $3x10^{7}$ sejttel intraperitoneálisan immunizáltuk. Az oltásokat egy hetes időközökben hatszor ismételtük, majd próbavéreztetést végeztünk és teszteltük a savók komplement-dependens cytotoxikus aktivitását. Amennyiben a savó nem ért el megfelelő titert, úgy további négy ismétlő oltás következett. A megfelelő cytotoxikus titer elérése után az egereket elvéreztettük, a vérüket gyűjtöttük és 2 órán át szobahőn állni hagytuk, majd egy éjszakán át 5^{o}C-on tartottuk. Az alvadékról leszívott savót először 620 g-vel 10 percig, majd 970 g-vel szintén 10 percig centrifugáltuk. A tiszta savókat Wassermann-vízfürdőben 56^{o}C-on, 30 percig dekomplementáltuk. A kész dekomplementált savókat 1-2 ml-es mennyiségekre osztottuk szét és -20^{o}C-on tároljuk.

Az alábbi alloantisavókat készítettük:

- anti-H-2^{a} savók előállításához B10, valamint CBA egereket immunizáltunk A egerek lép-, thymus- és nyirokcsomósejtjeivel,

JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM KÖZPONTI KÖNYVTÁRA SZEGED

- anti-H-2^b savók előállításához A és B10.D2 egereket immunizáltunk B10 egerek lép-, thymus- és nyirokcsomósejtjeivel,
- anti-H-2^k savók előállításához A és B10 egereket immunizáltunk CBA, C3H.SW egereket pedig C3H/Di egerek lép-, thymus- és nyirokcsomósejtjeivel,
- anti-Ia savó készítéséhez A.TL törzsű egerek lép-, thymus- és nyirokcsomósejtjeivel A.TH egereket immunizáltunk,
- anti-Thy 1.2. savó előállításához CBA egerek thymocytáival immunizáltunk AKR egereket. Mivel az AKR egerek 70-90%-ában féléves koruk után spontán lymphoma keletkezik, recipiensként csak fiatal, 2-3 hónapos egereket használtunk.

2.6. Xenogén antithymocyta savó (ATS) előállítása

A kísérleteinkben használt xenogén antithymocyta savókat Levey és Medawar (23) módszerét Végh szerint módosítva állítottuk elő (24). Thymocyta donorként 3-6 hetes CBA egereket használtunk. A thymusok kipreparálása és összegyűjtése után a már ismertetett módon sejtszuszpenziót készítettünk. Ezzel a módszerrel egerenként 1-2x10^8 thymocytát sikerült nyerni. A nyulakat 3x10^7 thymocyta/testsúlykilogramm dózissal immunizáltuk intravénásan. Az iv immunizálást 14 nap múlva megismételtük. A második oltás utáni 7. napon a nyulakat az a. carotis átvágásával elvéreztettük. Az összegyűjtött vért az allogén savók

készítésénél ismertetett módon dolgoztuk fel és tároltuk.

2.7. Újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció

Hím és nőstény F_1 hibrid egerek lépéből a már ismertetett módon sejtszuszpenziót készítünk. A sejtkoncentrációt $4x10^8$ sejt/ml-re állítjuk be. Recipiensként valamely parentális törzs újszülött egereit használjuk (legkésőbb 24 órával a születésük után). Az újszülötteket intravénásan (vena facialis anterior) $2x10^7$ F_1 lépsejttel oltjuk. Az oltás helyére papírvattát szorítunk mindaddig, amíg a vérzés meg nem szűnik. A toleranciakeltésen átesett egereken úgy teszteljük a tolerancia-indukció sikerességét, hogy az egerek kb. 2 hónapos korukban farokbőr allotranszplantátumot kapnak annak az egértörzsnek az egyedeitől, amelynek alloantigénjeivel szemben a toleranciakeltést végeztük. Sikeres tolerancia-indukció esetén az allograftok megnyúlt túlélési időt mutattak, vagy permanensen megmaradtak.

2.8. Farokbőr allotranszplantáció

Az alkalmazott bőrallotranszplantációs módszer Billingham és Medawar technikáján alapul (25). Recipiensként 1,5-2 hónapos egerek szolgáltak. Az aktív szőrnövekedési ciklusban lévő állatok nem alkalmasak a transzplantációra. Az állatokat 0,77%-os pentobarbitállal (Nembutal^R) ip oltva narkotizáltuk. A dózis az egértörzs érzékenységétől

függően 50-77 mg/kg. Az altatott állatokat gumigyűrűvel műtőpadra rögzítettük és elektromos hajnyírógéppel lenyírtuk a szőrt a hátukról. A műtéti területet 70%-os alkohollal, majd jódoldattal dezinficiáltuk. Az így előkészített állatok steril fülkébe kerültek. Steril, hajlított szemészeti ollóval négyzet vagy téglalap alakú 1-1,5 cm^2 területű graftágyat preparáltunk a hátbőrbe, gondosan ügyelve arra, hogy a bőrkimetszések során a panniculus carnosus a benne futó erekkel épen maradjon.

A cervikális diszlokációval megölt donor egér farkát alkoholos majd jódos lemosással dezinficiáljuk. A farok tövénél és a farok végétől kb. 1 cm-re egy-egy körkörös metszést ejtünk, majd egy hosszanti metszéssel végig vágjuk a bőrt. Erős anatómiás csipesszel lerántjuk a felpreparált farokbőrt és Petri-csészébe helyezett, steril fiziológiás sóoldattal megnedvesített szűrőpapírkorongra terítjük. A farokbőrcsíkot 0,7-0,8 cm^2-es darabokra szabdaljuk. A frissen előkészített bőrdarabokat a kicsivel nagyobb alapterületű graftágyakba helyezzük.

A műtét után a recipiensek törzsét paraffin-viasz-lanolin 40-45^oC hőmérsékletű olvadékába mártott kalikópólyába burkoltuk. A keverék összetétele: 2 rész szilárd paraffin, 3 rész méhviasz, 4 rész lanolin, 4 rész folyékony paraffin. Az így készített keverék 40^oC-on folyékony, a bőr hőmérsékletén viszont megdermed. Használatára azért van szükség, mert védi a transzplantátumot a kiszáradástól. A kalikó fölé gipszpólyát helyezünk, így a mechanikai

sérülések lehetőségét a minimálisra csökkentjük. Hogy az egereket a narkotizálás okozta lehüléstől megóvjuk, ébredésig infravörös lámpával enyhén melegítjük őket.

A védőkötést a 7-8. napon távolítjuk el. A transzplantátumot és környékét hajlított szemészeti csipesszel óvatosan megtisztogatjuk a pörktől és a kötés alatt vékony hártya formájában felhalmozódott, elhalt felületes hámrétegtől, majd bőrpuhító krémmel kenjük be. A védőkötés eltávolítása után naponta megszemléljük a transzplantátumot viselő állatokat és feljegyezzük a transzplantátum állapotában észlelt változásokat. A kilökődés időpontjának azt a napot tekintjük, amikor megszemléléssel és tapintással élő bőrrészt már nem találunk. Az átültetett bőr elhalt, vöröses-barna színűvé, száraz, kemény tapintatúvá válik.

A fent leírt, legtöbbször 1-2, de legfeljebb 4-7 nap alatt lejátszódó akut típusú rejekcióval szemben valamivel nagyobb gondot okoz az immunszupprimált állatokon észlelt, ún. krónikus típusú graftkilökődés végpontjának megítélése. Ez utóbbi esetben ugyanis a tömeges nekrózis helyett apró, tűszúrásnyi-színes gombostűfejnyi nekrotikus gócok jelentkeznek. Ezek piciny heg hátramaradásával gyógyulhatnak is. Lassú, folyamatos szőrhullás jelentkezik, a bőr hámlik, a farokbőr jellegzetes szerkezete lassanként eltűnik - végül a transzplantátum helyén sima, fénylő, zsugorodó hegszövet marad hátra. A rejekció befejeződéséig 1-2 hónap is eltelhet. Kilökődési időpontnak azt a napot tekintjük, amikor a transzplantátum helyén már csak hegszövetet lehet látni.

2.9. Ellenanyag közvetítette komplement-dependens cytotoxicitási teszt

A vizsgálatokat Haughton és McGhee kétlépéses eljárását (26) kis mértékben módosítva és mikrotitráló lemezre adaptálva végeztük.

A mikrotitráló lemezen két párhuzamos savóhígítási sort készítünk a vizsgálni kívánt savóból FCS-mentes Eagle-féle MEM-ben. Minden lyukba 25 µl megfelelő hígítású savó kerül, kivéve a sorban a legutolsó lyukat. Ebben csak 25 µl MEM van. A hígítási sor minden elemébe 25 µl $5x10^6$ sejt/ml koncentrációjú targetsejtszuszpenziót mérünk, és a mikrotitráló lemezt lefedve termosztátban 37°C-on 30 percig inkubáljuk. Az inkubációs idő leteltével minden lyukba 150 µl 5% FCS tartalmú médiumot mérünk, majd a lemezt szobahőmérsékleten 300 g-vel 10 percig centrifugáljuk. A lecentrifugált lemez lyukaiból óvatosan leszívjuk az előzőleg bemért 150 µl mosófolyadékot. A liofilezett tengerimalac komplementből FCS-mentes MEM-ben elkészítjük a megfelelő hígítást és a felső savóhígítási sorba lyukanként 50-50 µl-t mérünk belőle, ez a tesztsor. Az alsó sorba 50 µl 5% FCS-t tartalmazó MEM-et mérünk lyukanként. Ez a kontroll sor. A felső sor végén a komplementet igen, de savót nem tartalmazó lyuk a komplementes kontroll, míg az alsó sor végén a sem savót, sem komplementet nem tartalmazó médiumos kontroll van. A lemezt óvatosan rázogatva felszuszpendáljuk a targetsejteket és ismét 37°C-on

inkubáljuk 45 percig. A cytotoxikus aktivitást festék-kizárásos módszerrel értékeljük. A $0^{o}C$-ra hűtött lemezen egy-egy lyukba 50 µl tripánkék oldatot mérünk, majd 2-3 perc elteltével meghatározzuk a festődött sejtek arányát. Csak a sérült vagy elpusztult sejtek veszik fel a festéket. Az értékelést mikroszkóp segítségével 320-szoros nagyítással, Bürker-kamrában 100 sejt leszámolásával végezzük.

Az ismertetett cytotoxicitási értékeket legalább kettő, általában három, egymástól független vizsgálat alapján határoztuk meg. Ha egy kísérlet során a fentiekben említett kontrollok értéke eltért a normától (15%-nál több festődő, elpusztult sejt), a vizsgálatot értékelhetetlennek tekintettük.

2.10. Poliklonális T és B sejt mitogének stimuláló hatásának vizsgálata

A tesztelendő egerek lépéből 10% FCS-tartalmú, azaz komplett RPMI 1640 médiumban $2,5x10^{6}$ sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziókból LINBRO gyártmányú, szövettenyésztési minőségű, mikrotitráló lemezre lyukanként 100-100 µl-t mértünk, majd a komplett RPMI 1640 médiumban hígított mitogénoldat megfelelő hígításából további 100 µl-t adtunk az egyes mikrokultúrákhoz. Az egyes mitogének optimális stimuláló effektusú koncentrációját előkísérletekben határoztuk meg: Con A esetében ez 2,5-5 µg/ml, PWM-ből 2,5 µg/ml, LPS-ből 25-30 µg/ml volt.

A kultúrákat 5% széndioxiddal dúsított levegőjű, 100% relatív páratartalmú termosztátban 72 órán át inkubáltuk. A sejtek mitotikus aktivitását triciummal jelölt timidinnek a sejtekbe való beépülésével jellemeztük: az inkubálási idő letelte előtt 8 órával 1 μCi triciált timidint adtunk minden mikrokultúrához. A sejteket a mikrotitráló lemezről házi készítésű harveszterrel Whatman GF/C filterre vittük és lyukanként 10-10 ml fiziológiás sóoldattal mostuk, hogy a sejtekbe be nem épült, izotóppal jelölt timidint eltávolítsuk. A filteren lévő sejteket 110°C-on szárítószekrényben fixáltuk és víztelenítettük, majd az egyes mikrokultúrák sejtjeit hordozó szűrőpapírkorongokat Wheaton gyártmányú szcintillációs üvegküvettákba helyeztük és 4-4 ml szcintillációs koktélt mértünk rájuk (a szcintillációs koktél 0,5 g/l 1,4 di(2-(5-fenil)-oxazoil)benzol (POPOP) és 5 g/l 2,5 difenil-oxazol (PPO) toluolos oldata). A minták aktivitását Beckman gyártmányú, LS-100C típusú szcintillációs spektrofotométerrel mértük. A minták aktivitását a mért cpm (beütés/perc) értékekkel jellemeztük.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Malignus lymphomák újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukciót követő halmozott megjelenése

Szemiallogén (F_1) hibrid egerek lépsejtjeivel újszülöttkori transzplantációs toleranciát indukáltunk A, B10 és CBA egerekben. A törzskombinációkat és az egyes törzskombinációk jelölési módját a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. A transzplantációs tolerancia-indukció törzskombinációi, jelölésük, és a fő hisztokompatibilitási komplexbeli különbségek

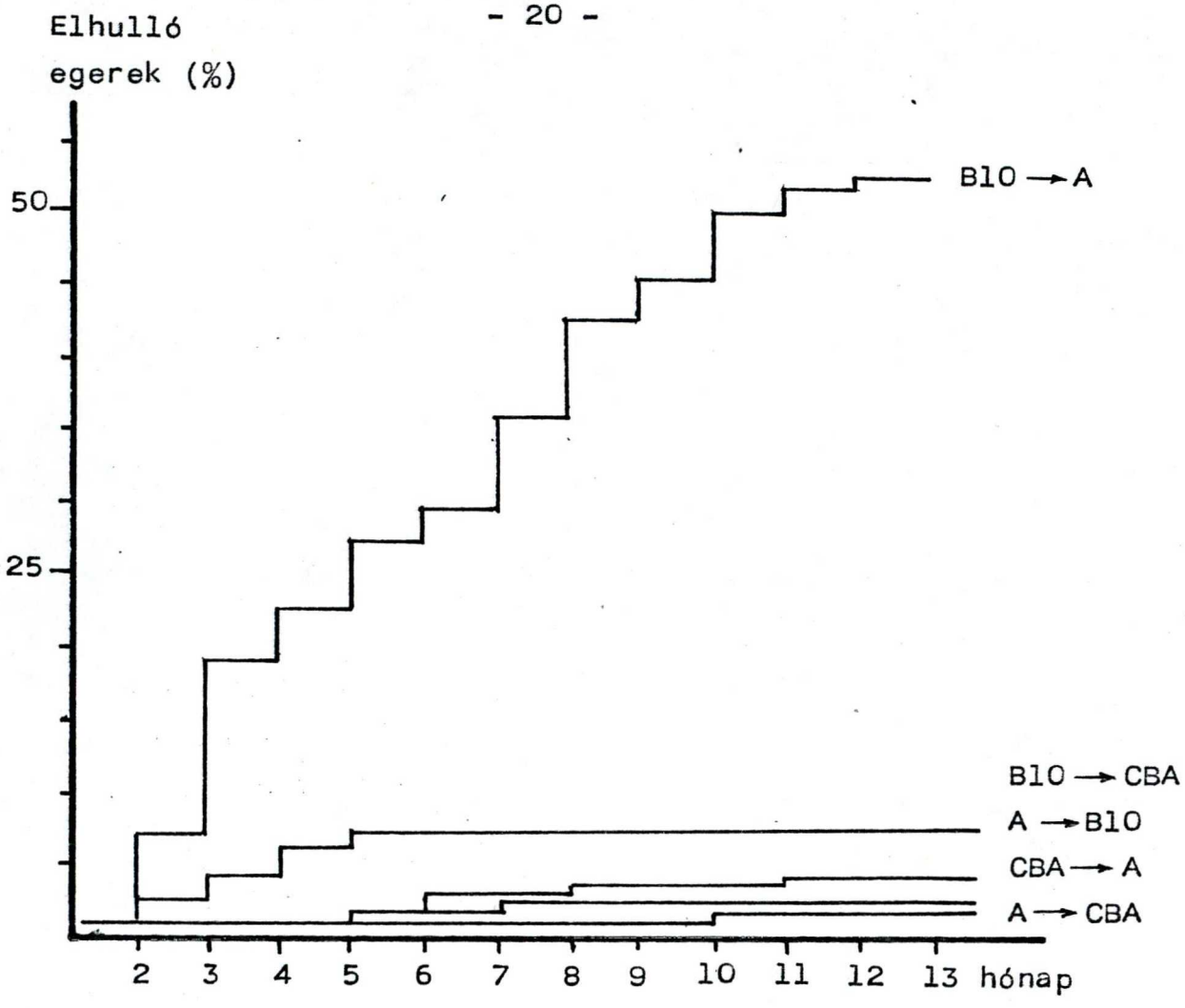
Lépsejtdonor törzs	Recipiens törzs	Törzskombináció jelölése	A tolerogén H-2 antigének
$(CBAxA)F_1$	A	CBA → A	részleges $H\text{-}2^k$ ($H\text{-}2D^k$, $H\text{-}2I^k$)
$(CBAxA)F_1$	CBA	A → CBA	részleges $H\text{-}2^a$ ($H\text{-}2D^d$, $H\text{-}2I^d$)
$(B10xCBA)F_1$	B10	CBA → B10	teljes $H\text{-}2^k$
$(B10xCBA)F_1$	CBA	B10 → CBA	teljes $H\text{-}2^b$
$(B10xA)F_1$	A	B10 → A	teljes $H\text{-}2^b$
$(B10xA)F_1$	B10	A → B10	teljes $H\text{-}2^a$

A tolerancia-indukciót követően az egerek hátára kb. két hónapos korukban a megfelelő (tolerogén) hisztokompatibilitási antigéneket viselő törzsű egerek farokbőrét ültettük, így e "tesztgraftok" túlélési idejét megfigyelve következtethettünk a tolerancia-indukció sikerességére.

A tolerancia-indukció eredményességének tesztelése során több mint 300 napos korukig naponta figyeltük a transzplantált egereket. Ennek során észleltük, hogy egyes egerek fokozatosan leromlottak, miközben lépük tapinthatóvá vált, erősen megnagyobbodott, majd ezek az egerek elhullottak.

Feltűnően nagyarányú elhullást figyeltünk meg a B10→A törzskombinációban, amelyben az egereknek több mint a fele nem élte meg az egyéves kort. E törzskombinációban az elhullások a tolerancia-indukciót követő második hónaptól jelentkeztek, és kb. egyenletes ütemben halmozódtak egyéves korig, amikortól az elhullások száma csökken, azaz az elhullásokat leíró görbe ellaposodik (1. ábra).

A B10→CBA törzskombinációban is megfigyeltünk hasonló tünetek fellépését követő elhullásokat, azonban ezek gyakorisága jóval kisebb volt, alig haladta meg a 7%-ot. A kisebb gyakoriság mellett ezek az elhullások csak aránylag rövid ideig jelentkeztek: az első elhullásokat itt is a tolerancia-indukciót követő második hónap körül figyeltük meg, de az 5. hónap után már nem hullottak el újabb egerek. Az összes többi törzskombinációban elhullásokat



1. ábra. Az elhullások alakulása a különböző tolerancia-indukciós törzskombinációkban

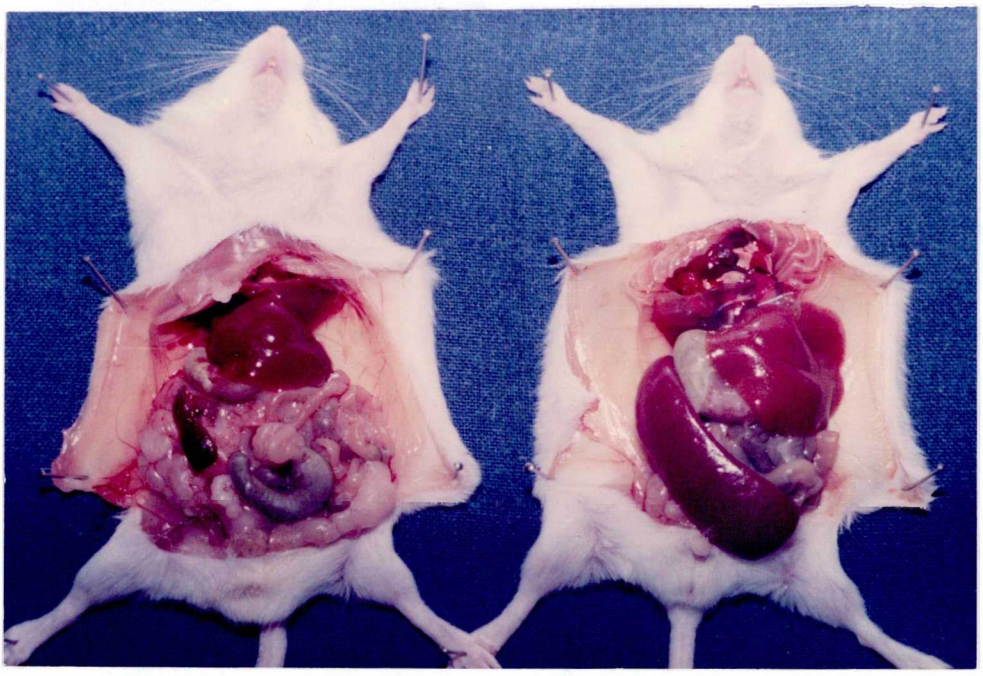
A boncolási leletek szerint az elhullások oka generalizálódó nyirokrendszeri daganat, lymphoma volt.

csak az idősebb egerek között és legfeljebb néhány százalékos gyakorisággal észleltünk.

Az elhullott vagy a megfigyelési idő (a tesztgraftolás után legalább 240 nap) elteltével kiselejtezett egereket felboncoltuk. Ennek során az elhullott állatokban kifejezett hepato-splenomegaliát figyeltünk meg (2. ábra). A beteg állatok lépének a súlya 800-2500 mg között volt, szemben a normálisnak tartott 60-130 mg-os értékkel. A beteg állatok lépe nagy, szürkésfehér gócokkal infiltrált, mállékony volt. Májuk gyakran erősen megnagyobbodott, benne - különösen a B10 → CBA törzskombinációban - fehéres gócokat lehetett megfigyelni. Esetenként generalizált, igen nagymérvű nyirokcsomó-megnagyobbodásokat is találtunk: a hónalji és inguinális nyirokcsomók lencsényi, a mesenterialis nyirokcsomók akár babnyi nagyságúak is voltak. Jellemző volt a Peyer-plakkok megnagyobbodása. A thymus néhány kivételtől eltekintve normális méretű volt.

Esetenként a perifériás vérben a leukocytaszám drasztikus emelkedését észleltük: a normális 6000-10 000 leukocyta/mm^3 helyett 150-500 000/mm^3-t találtunk. A fenti boncolási leletek alapján úgy véljük, hogy az elhullások oka generalizált nyirokrendszeri daganat, lymphoma volt. Ezt a diagnózist a Dr. Németh Péterrel (POTE Kórbonctani Intézet) kollaborációban végzett szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok is megerősítették (lásd a 3.2. fejezetben).

A tolerancia-indukciót követően a fenti tünetek mellett



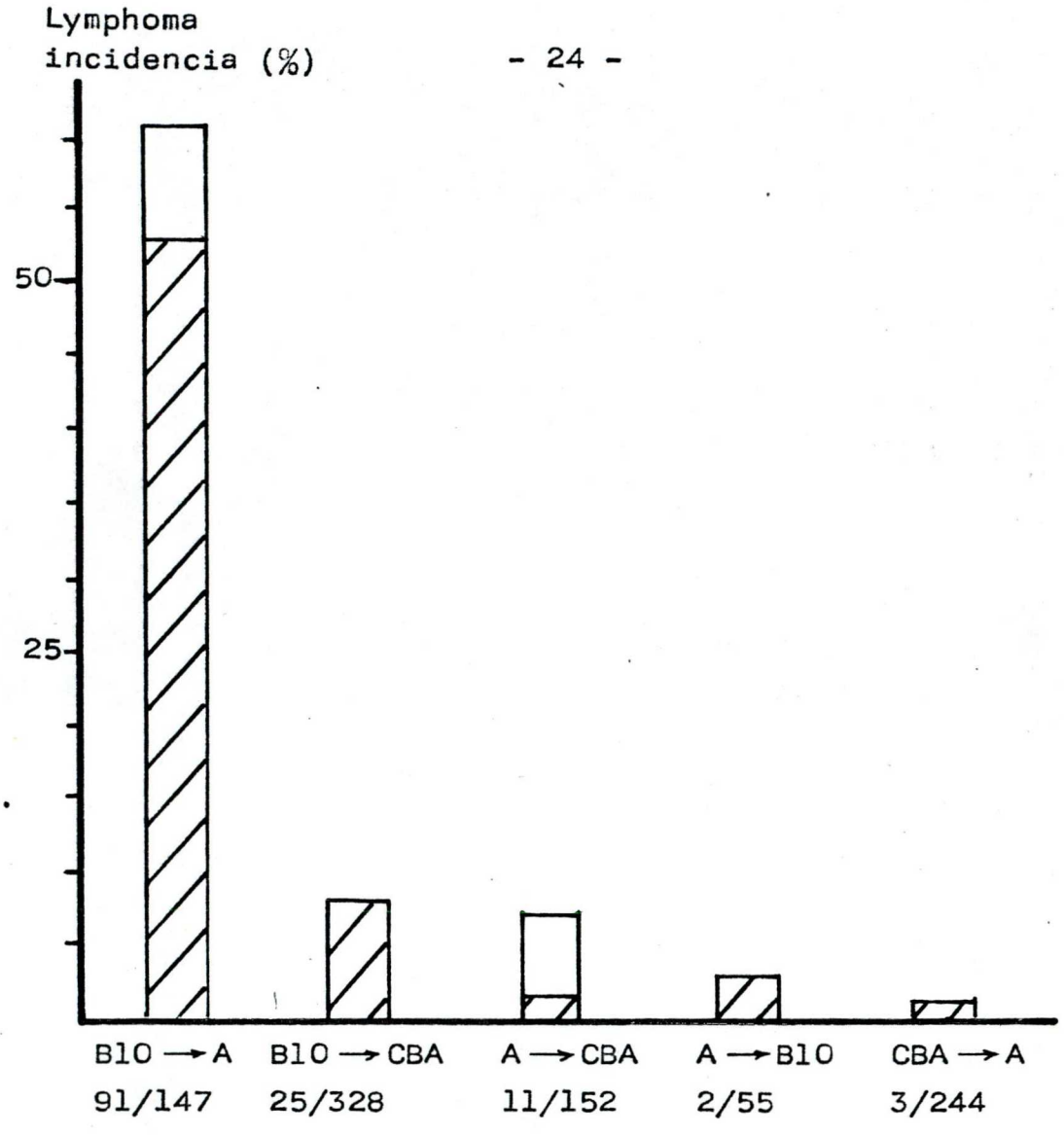
2. ábra. B10→A törzskombinációban megfigyelt lymphomás hepato-splenomegalia

A kép bal oldalán a kezeletlen, a jobb oldalán egy B10→A tolerancia-indukción átesett és lymphomássá vált 4 hónapos A egér látható.

elhullott, valamint a megfigyelési idő elteltével felboncolt és lymphomásnak bizonyult állatok adatainak figyelembevételével megkíséreltük meghatározni az egyes törzskombinációkban jelentkező lymphomák gyakoriságát (3. ábra). Megállapítottuk, hogy a B10 → A törzskombinációban igen magas, 61,9%-os a lymphomára utaló elváltozások incidenciája. A B10 → CBA törzskombinációban az egerek 7,6%-ánál találtunk lymphomát, mégpedig úgy, hogy az összes lymphomás állat elhullott, a tolerancia-indukció utáni 5. hónapnál idősebb egerekben már nem mutatkozott lymphomás elváltozás.

Hasonló lymphoma-gyakoriságot (7,2%) állapítottunk meg az A → CBA törzskombinációban is, azonban e csoportban kevesebb egér hullott el a megfigyelési idő alatt, mivel a lymphomák aránylag későn, az idősebb, legalább 8-12 hónapos egerekben manifesztálódtak. Az A → B10 és a CBA → A törzskombinációkban is találtunk lymphomás egereket, mégpedig 3,6, illetve 1,2%-os arányban. E lymphomák is aránylag későn jelentkeztek, hasonlóan az A → CBA törzskombinációban megfigyeltekhez.

A normál, kezeletlen egerekre vonatkozó adataink szerint a B10 törzsünkben eddig még lymphomás egeret nem találtunk. Ez a megbetegedés A és CBA egerekben is ritka jelenség, legfeljebb ezrelékes nagyságrendben fordult elő az idős egerekben. A lymphomáknak a tolerancia-indukcióhoz lépsejtdonorként használt F_1 egerekben való előfordulására vonatkozó adatainkat a 3. táblázat tartalmazza. Ebből



3. ábra. Az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukción átesett egerek lymphoma incidenciája a különböző törzskombinációkban

A százalékosan kifejezett lymphoma-incidenciák: B10 → A: 61,9%, B10 → CBA:7,6%, A → CBA: 7,2%, A → B10: 3,6% és a CBA → A: 1,2% volt.

látható, hogy a (BlOxA)F_1 és a (BlOxCBA)F_1 hibrid egerek között lymphomását a felboncolt 298, illetve 385 közül egyet sem találtunk. A (CBAxA)F_1 törzskombinációban a fiatal, 100-200 napos egerekben szintén nem találtunk lymphomára utaló elváltozást, azonban a 200, illetve 300 napnál idősebb csoportokban már egy-két esetben előfordult lymphoma. Ezek közül egyet izoláltunk is, és L/III néven (CBAxA)F_1 hibrid egerekben sorozatos átoltással tartjuk fenn.

3. táblázat. A lymphomák előfordulása a különböző törzsű F_1 hibrid egerekben

F_1 hibrid törzs	Állatok kora (napok)	Lymphoma-gyakoriság	Összesen
(BlOxA)F_1	100-200	0/92	
	201-300	0/67	
	301-	0/139	0/298
(BlOxCBA)F_1	100-200	0/153	
	201-300	0/211	
	301-	0/21	0/385
(CBAxA)F_1	100-200	0/50	
	201-300	1/173	
	301-	2/146	3/369

A lymphomákon kívül az idős hím CBA egerekben spontán

májtumorokat (hepatomákat) találtunk, ami a CBA törzs egyik jellemző sajátossága (27). Ez nem jár kifejezett lépmegnagyobbodással, a nyirokcsomók, Peyer-plakkok szintén normálisak maradnak. Az idős (CBAxA)F_1 hím egerek (300 napnál idősebb) között 5 egér máján hepatomás elváltozásokat figyeltünk meg.

Kísérleti eredményeink szerint a normál A, B10 és CBA, valamint a lépsejtdonor F_1 egereken megfigyeltekhez képest minden újszülöttkori tolerancia-indukciós törzskombinációban a lymphoma gyakorisága jóval magasabb volt. E tekintetben az egyes kombinációk között azonban lényeges eltérés mutatkozott, ami még ismeretlen immungenetikai tényezők fontosságára hívja fel a figyelmet.

3.2. A lymphomák immunhisztokémiai vizsgálata és klasszifikációja

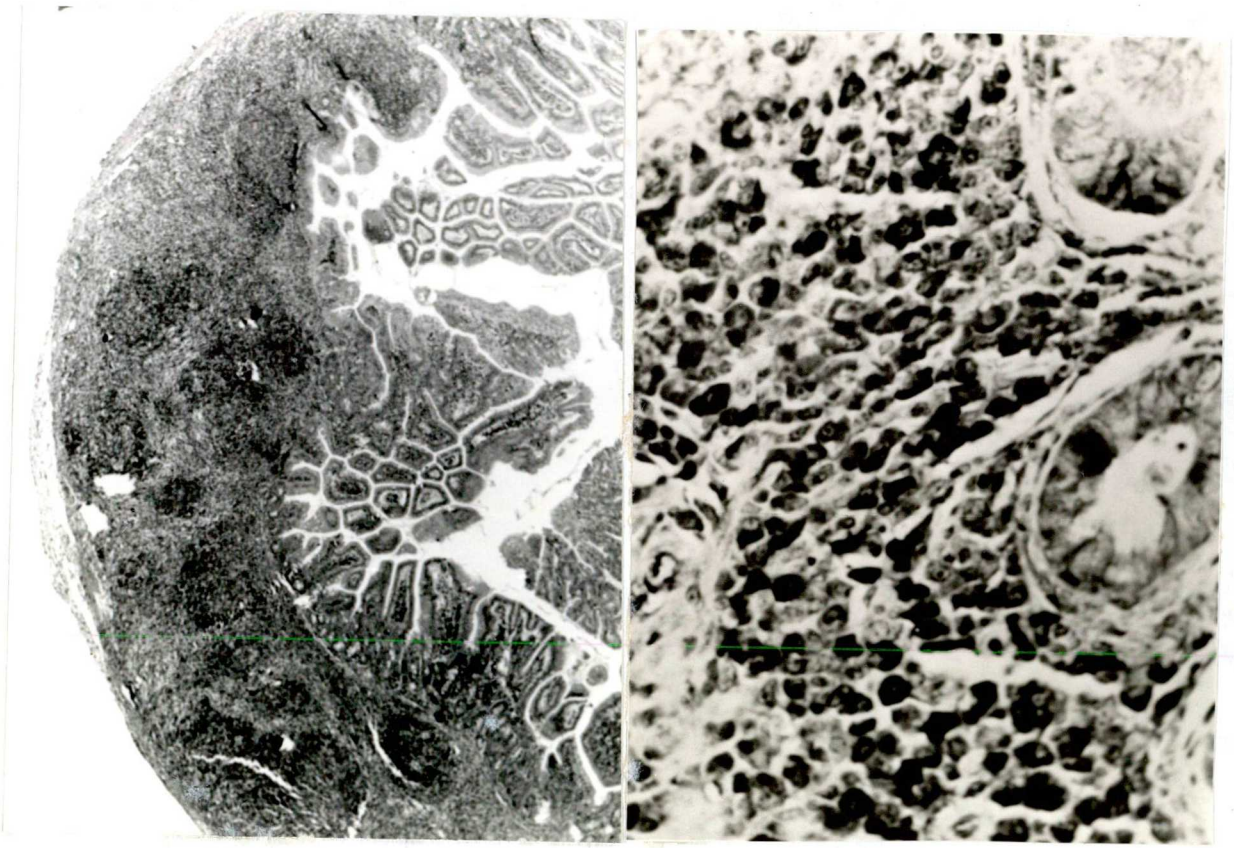
A tolerancia-indukciót követően megfigyelt makroszkópikus elváltozások regisztrálása mellett az egerek egy részéből kórszövettani vizsgálatok is történtek. E vizsgálatokat Dr. Németh Péterrel (POTE Kórbonctani Intézet) kollaborációban végeztük.

Az A → CBA toleranciakeltést követően 16 esetben sikerült a malignus lymphoma diagnózisát egyértelműen megállapítani. 7 esetben az egerek szérumából paraprotein volt kimutatható agaróz gélelektroforézissel. A 7 közül 4 esetben immunelektroforézissel vizsgálva a paraprotein

IgG, 1 esetben IgM volt. 8 esetben csontvelőkenet is készült. A csontvelőben éretlen, lymphoid karakterű infiltrátumok voltak kimutathatók, megtartott erythro- és myelopoiesis mellett. A nyirokszervek szövettani feldolgozása során feltűnő volt a Peyer-plakkok involváltsága. Amíg a lépek változatos mértékben voltak infiltrálva, addig a Peyer-plakkok minden lymphomás esetben egyértelmű tumoros átalakulást mutattak (4. ábra). Lymphomás Peyer-plakkokban és nyirokcsomókban immunperoxidáz technikával változatos immunglobulin-termelés volt kimutatható: intracytoplazmatikusan IgG és IgM volt jelen 8 esetben (5. ábra). Az A → CBA törzskombinációban feldolgozott 16 lymphoma esetén a kieli klasszifikáció alapján az alábbi diagnózis szerinti megoszlást találtuk:

4. táblázat. Az A → CBA törzskombinációban szövettanilag feldolgozott lymphomák megoszlása a kieli klasszifikáció szerint

Szövettani diagnózis	Esetszám
lymphoplasmocytás immunocytoma	7
polymorph immunocytoma	5
immunoblastoma	1
centrocytoma	1
nem klasszifikálható	2
összesen	16



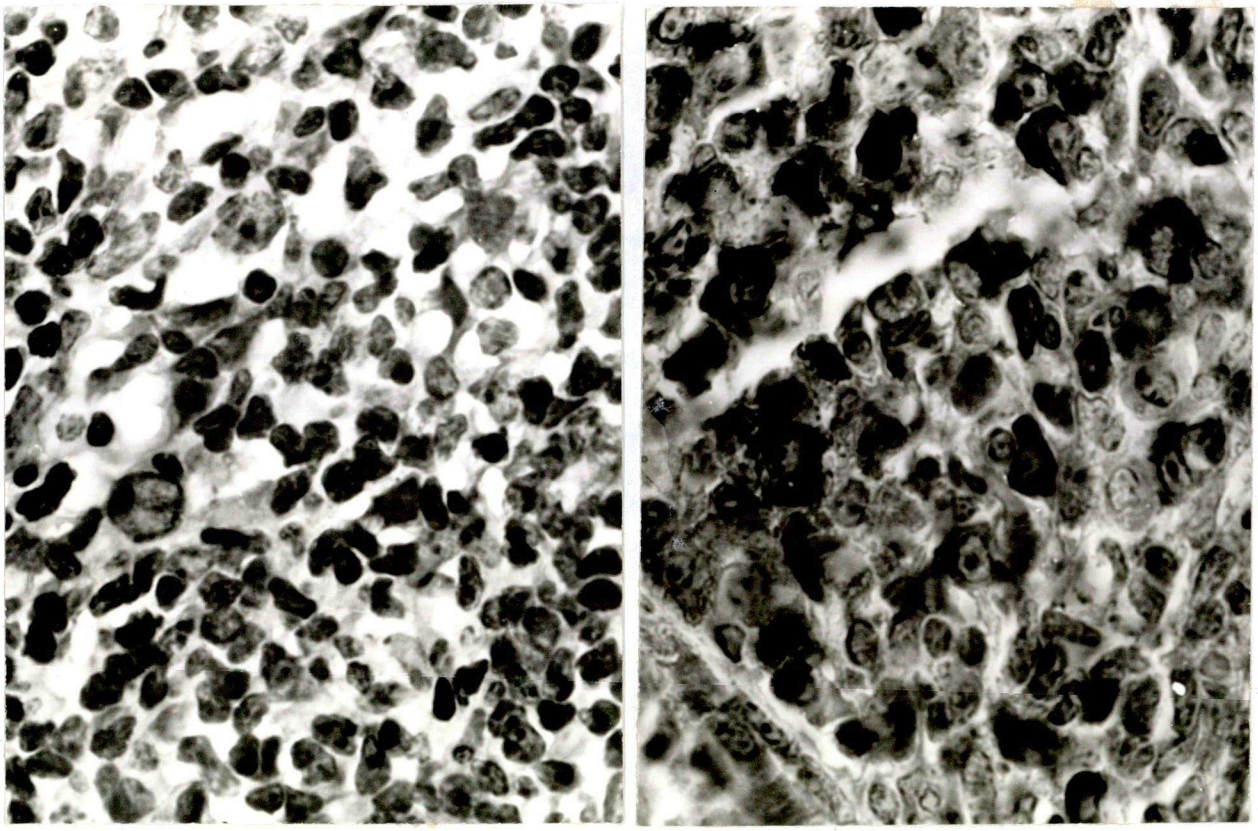
a. b.

4. ábra. A → CBA tolerancia-indukció kapcsán észlelt malignus lymphomás elváltozás a Peyer-plakkokban

a.) Az átnézeti képen a bélfal minden rétegét infiltráló nyirokszövet látszik (haematoxylin-eosin, 150x).

b.) Nagyobb nagyítás mellett megfigyelhető, hogy a mucosa interstitiumát is malignus lymphomás infiltrátum foglalja el (haematoxylin-eosin, 600x).

JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM SZEGED KÖZPONTI KÖNYVTÁRA



a. b.

5. ábra. Lymphomás nyirokcsomó A → CBA tolerancia-indukción átesett egérből

a.) A Peyer-plakkokban látottakhoz hasonló cytológiai megjelenésű, elsősorban plasmocytoid sejtekből, lymphocytákból, centrocytákból álló infiltrátum figyelhető meg (Giemsa, 1000x).

b.) Immunperoxidáz technikával a sejtek egy részéből IgM termelés mutatható ki (1000x).

A B10 → A toleranciakeltés során szövettanilag eddig megvizsgált és lymphomásnak bizonyult 4 eset a kieli klasszifikáció alapján polymorph immunocytoma volt.

További 10 lymphomás esetet vizsgáltunk meg komplement-dependens cytotoxicitási tesztben. Meghatároztuk az egyedi lymphomás lépekből készült sejtszuszpenziók anti-Thy 1.2. és anti-Ia savóval reagáló sejtjeinek arányát, továbbá igyekeztünk eldönteni e lymphomák donor (F_1) vagy recipiens eredetét. Ha a nagy tömegben jelenlévő lymphomás sejtek donor, azaz (B10xA)F_1 eredetűek, akkor az A törzsre jellemző alloantigének mellett a B10 törzsre jellemző alloantigéneknek is rajta kell lenniük a sejtek felszínén, hiszen a hibrid sejtekben mind a két törzsre jellemző fő hisztokompatibilitási komplex jelen van és expresszálódik (5. táblázat).

Az anti-Thy 1.2. és az anti-Ia pozitiv sejtek arányát normál állatok lépsejtszuszpenziójában 30-35, illetve 55-60 %-nak találtuk. A Thy 1.2. pozitív sejtek a T-sejtekkel azonosak, míg az Ia antigéneket hordozó sejtek túlnyomó része a B-sejteknek felel meg. Ez utóbbi marker más szubpopulációkban is szerepel sejtfelszíni antigénként. A toleranciakeltésen átesett és lymphomássá vált egerek lépe amellett, hogy erősen megnagyobbodott, megbomlott T- és Ia-pozitiv (B) sejtarányt mutatott. A T-sejtek aránya - a 2. és a 8. egér kivételével - csökkent a lépsejtszuszpenziókban, sőt a 3. és 6. egér lépében éppen csak kimutatható volt a jelenlétük. Az Ia-pozitív sejtek aránya

5. táblázat. A BlO → A tolerancia-indukción átesett és lymphomássá vált egerek lépsejtjeinek alloantisavókkal szembeni érzékenysége komplement-dependens cytotoxicitási tesztben

Target	Cytotoxikus effektus (%)			
	anti-H-2^a	anti-H-2^b	anti-Thy1.2.	anti-Ia^k
Normál A lépsejtek	97	0	33	57
Normál (BlOxA)F_1 lépsejtek	96	97	32	53
BlO → A tolerancia-indukción átesett egerek				
1.	98	0	27	73
2.	96	0	34	52
3.	97	0	4	17
4.	96	0	17	29
5.	98	0	16	21
6.			5	33
7.			28	60
8.			35	23
9.			16	74
10.			19	56

Az alloantisavók bemért hígítása 1:5, a komplement hígítása pedig 1:8 volt. Minden mintából 2-3 párhuzamost értékeltünk és az átlaguk alapján határoztuk meg a cytotoxikus effektust.

két esetben jelentősen magasabb volt a normálisnál, három esetben nagyjából változatlannak bizonyult, a többi öt egér lépében viszont csökkent. Ez utóbbiakban - egy kivétellel - a T-sejtek aránya is csökkent volt.

Az anti-H-2 savókkal végzett tesztek eredményei szerint a lymphomás egerek lépsejtjeim csak A eredetű ($H\text{-}2^a$) sejtfelszíni antigének voltak kimutathatók, ami arra utal, hogy az e tolerancia-indukciós rendszerben keletkezett lymphomák nem donor (F_1), hanem recipiens eredetűek.

Összefoglalva a 3.2. fejezetben ismertetett eredményeket, elmondhatjuk, hogy a malignus lymphomák túlnyomó részt B-sejtes, az immunglobulin-szintézis irányába elkötelezett, részben aktív immunglobulin-szekréciót mutató szubtípusúak voltak. Minden esetben feltűnt a Peyer-plakkok involváltsága. A korai esetek alapján feltételezhető, hogy ez a lymphomák kiindulási helye. Ezt látszik alátámasztani az is, hogy az A → CBA rendszerben megvizsgált, de még csak reaktív hyperplasiának ítélt 13 esetben is follikuláris, tehát B-sejtes hyperplasia volt kimutatható a Peyer-plakkokban. A keletkezett lymphomák - legalábbis a B10 → A rendszerben - recipiens eredetűnek bizonyultak.

3.3. A transzplantációs immuntolerancia és a lymphomák előfordulásának összehasonlító vizsgálata

A 3.1. pontban ismertetett megfigyeléseink egyértelműen bizonyítják, hogy az újszülöttkori transzplantációs

tolerancia-indukción átesett egereinkben a normál, kezeletlen egérpopulációkhoz mérten sokszorosan magasabb a malignus lymphomák előfordulási aránya. Nagyon fontosnak tartottuk annak a kérdésnek az eldöntését, vajon van-e valamilyen lényegi összefüggés az idegen hisztokompatibilitási antigénekkel szemben kialakuló immuntolerancia és a halmozottan megjelenő, az egerek elhullásához vezető lymphomák kialakulása között. Három kísérletsorozat áll rendelkezésünkre, hogy a két jelenség közötti esetleges mélyebb kapcsolatokat ki tudjuk mutatni.

3.3.1. Lymphomák előfordulása és az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció eredményessége különböző egértörzs-kombinációkban

A laboratóriumunkban végzett kísérletek szerint újszülöttkori transzplantációs tolerancia sikeresen indukálható nemcsak részleges, hanem teljes H-2 komplexbeli különbség esetén is, azonban meglehetősen nagy különbségek figyelhetők meg az egyes törzskombinációk között (6. táblázat).

Toleranciát legeredményesebben a részlegesen H-2 inkompatibilis A → CBA törzskombinációban lehet elérni. Itt $2x10^7$ (CBAxA)F_1 lépsejt újszülött CBA egérbe oltásával a tesztelt állatok 95%-án permanens grafttúlélés volt megfigyelhető. A reciprok törzskombinációban (CBA → A) viszont szignifikánsan alacsonyabb, csak 52,6%-os volt a permanensen toleráns egerek részaránya, de emellett 43%-nyi volt a

6. táblázat. Az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció eredményessége a különböző egértörzs-kombinációkban

Törzs-kombináció	Tesztelt egerek száma	Permanensen toleráns		Részlegesen toleráns			Toleránssá nem vált		
		állat-szám	%	állat-szám	%	graft-túlélés (nap)*	állat-szám	%	graft-túlélés (nap)*
1. A → CBA	853	814	95,4	28	3,3	82,5	11	1,3	14,0
2. B10 → CBA	199	75	37,7	102	51,3	122,0	22	11,1	14,0
3. CBA → A	194	102	52,6	85	43,8	141,0	7	3,6	18,0
4. B10 → A	83	-	-	68	81,9	56,0	15	18,1	13,0
5. A → B10	45	-	-	31	68,9	16,0	14	31,1	12,0
6. CBA → B10	21	-	-	13	61,9	17,0	8	38,1	11,0

*a graftok túlélési idejének mediánja

hosszú átlagos grafttúlélésű (141 nap) részlegesen toleráns egér. E két törzskombinációban a lymphomák 7,2 illetve 1,2%-os gyakorisággal fordultak elő, ami nem különbözik számottevően az A → B10 törzskombinációban megfigyelt 3,2%-tól. Ez utóbbiban viszont permanens tolerancia ki sem alakult, a részlegesen toleránsnak bizonyult egerek is aránylag rövid idő alatt (átlagosan 16 nap) kilökték a graftjukat. Szembetűnő a B10 törzsű egerek rezisztenciája a toleranciakeltéssel szemben, mivel a CBA → B10 törzskombinációban is hasonlóan gyenge a tolerancia-indukció sikeressége.

A B10 → CBA törzskombinációban az egerek 37,7%-a permanensen toleránssá vált az újszülöttkori tolerancia-indukciót követően és meglehetősen magas volt a részlegesen toleráns egerek aránya is (51%, 122 napos átlagos grafttúléléssel), de a lymphomák gyakorisága nem tért el az A → CBA törzskombinációban megfigyeltektől (7,6%).

Igen magas arányban fordultak elő lymphomák a B10 → A törzskombinációban (62%), ahol permanensen toleráns egér ugyan nem fordult elő, de a 80%-nyi részlegesen toleránsnak bizonyult egér tesztgraftja lényegesen tovább élt, mint az A → B10 kombinációban.

Összegezve a fenti eredményeket, azt mondhatjuk, hogy nem találtunk összefüggést a különböző törzskombinációkban végzett újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció eredményessége - vagy éppen eredménytelensége - és a lymphomák előfordulásának gyakorisága között.

3.3.2. A B10 → A transzplantációs tolerancia-indukción átesett, lymphomás és nem lymphomás A egerek teszt allograftjának túlélési ideje

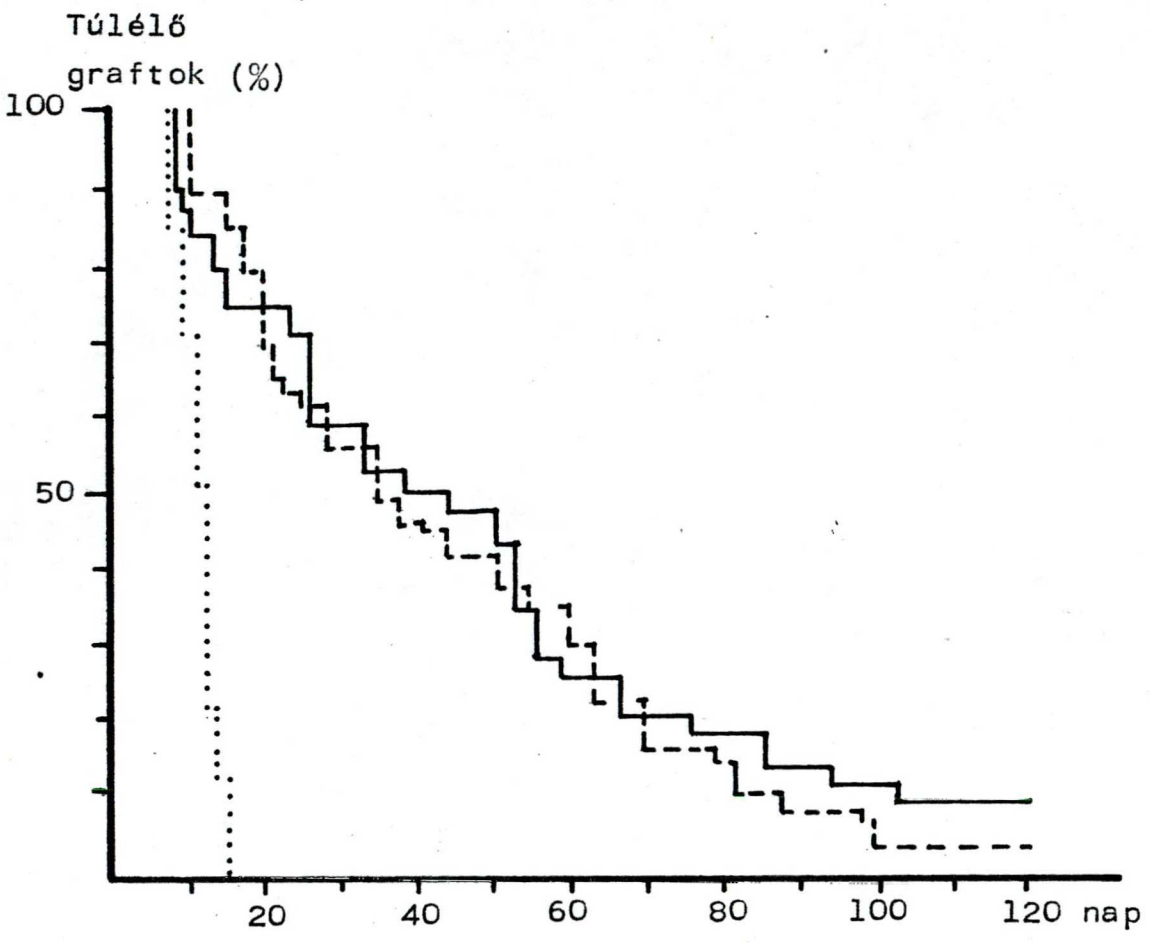
Mivel a B10 → A törzskombinációban igen magas a lymphomás egerek részaránya, lehetőségünk teremtődött arra, hogy összehasonlítsuk a tolerancia-indukción átesett, B10 farokbőrrel allograftolt, majd a későbbiekben lymphomásnak bizonyult egerek tesztgraftjainak túlélési idejét a lymphomamentes egerek grafttúlélési idejével (6. ábra).

Kísérleti adataink szerint a lymphomás, illetve a lymphomamentes egerek teszt allograftjainak átlagos túlélési ideje, a graftkilökődések időbeli lezajlása, a toleránssá nem vált és a részlegesen toleráns egércsoportok közötti arányok nem tértek el számottevően. A lymphomás és a lymphomamentes egércsoportok grafttúlélési görbéje csaknem parallel fut egymással.

E megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a B10 → A tolerancia-indukciós rendszerben nincs szoros összefüggés a transzplantációs immuntolerancia kialakulása (vagy a graftrejekció) és a malignus lymphomák megjelenése között.

3.3.3. A transzplantációs immuntolerancia adoptív sejttranszferrel való átvihetősége és a malignus lymphomák megjelenése

Az A → CBA tolerancia-indukciót követően a kezelt egerek 95%-a permanens grafttúlélésűvé válik. Ha a



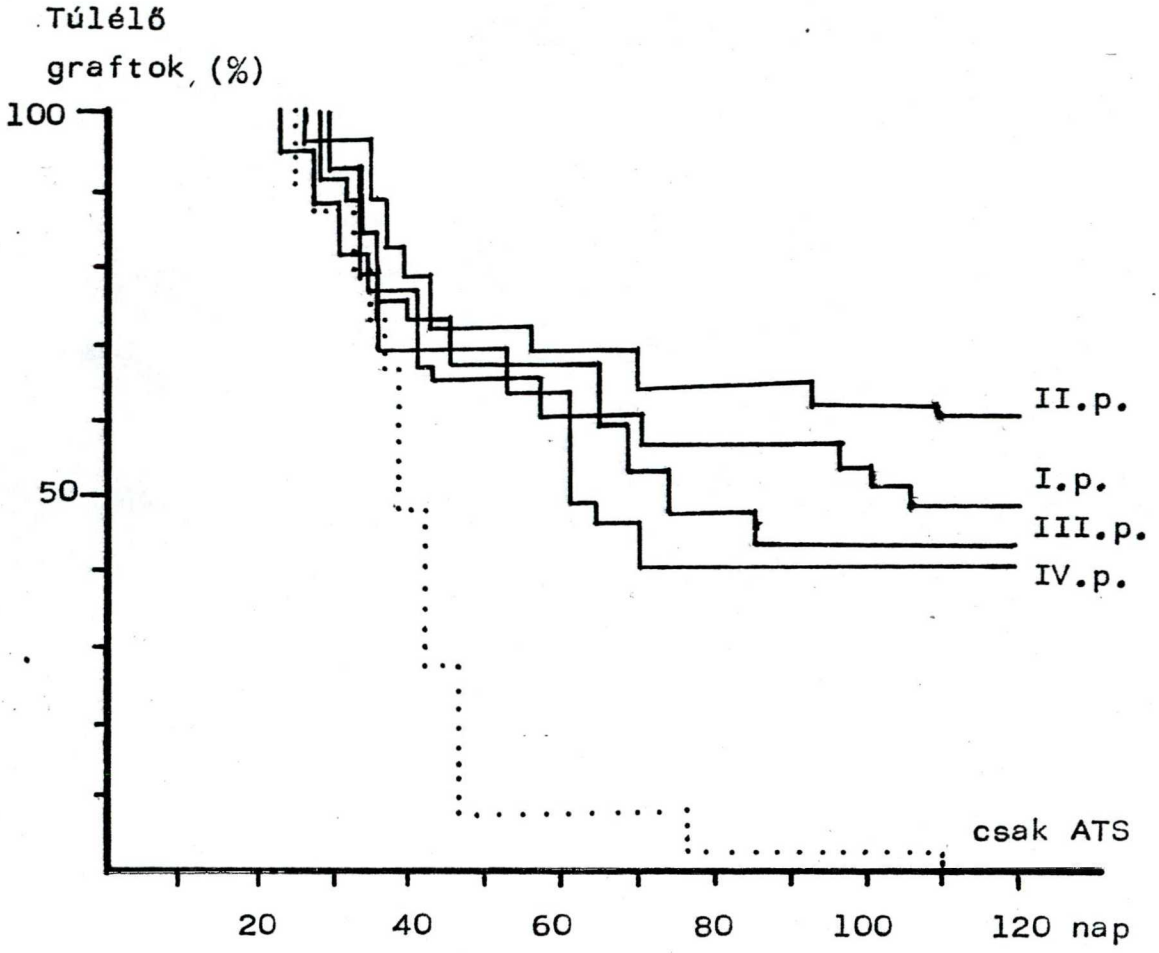
6. ábra. Grafttúlélési idő a B10→A tolerancia-indukción átesett és lymphomásnak bizonyult, illetve lymphomamentes A egerekben

A folyamatos vonal a lymphomamentes, a szaggatott a lymphomás egerek grafttúlélési idejét mutatja. A pontozott vonal a B10-es graftok normál A egereken megfigyelt túlélését jelöli.

permanensen toleráns egerek lépsejtjeiből 50-50 milliót A farokbőrrel allograftolt, a graftolást követő 2. és 5. napon jó immunszuppresszív hatású antithymocyta savóval (ATS) kezelt, felnőtt szingén egerekbe oltottunk a graftolás utáni 12. napon, az immuntolerancia sikeresen átvihetőnek bizonyult: a recipiens egerek kb. 40%-ának graftja nem lökődött ki. Az újszülöttkori toleranciakeltésen átesett egerek lépsejtjeinek allograftolt, ATS-kezelt, felnőtt, szingén egerekbe való átoltásával (a toleráns lépsejtek I. passzázsával) kialakított felnőttkori tolerancia is továbbvihető volt újabb, ATS-sel immunszupprimált, felnőtt szingén egerekbe. Ezt nevezzük a tolerancia II. passzázsának. Hasonló módon a II. passzázsból nyert lépsejtek újabb immunszupprimált, felnőtt, szingén egerekbe történő oltásával eredményes volt a III., majd a IV. passzázs is, és az egerek legalább 40%-a ismételten permanensen toleránssá vált (7. ábra), tehát a tolerancia-átvitel eredményessége nem csökkent a passzázsok során.

A sejttranszferek további folytatásának azonban gátat vetett az, hogy a passzázsok során - egyre nagyobb számban, és egyre malignusabb formában - lymphomák jelentek meg az adoptív lépsejttranszferben részesült egerekben.

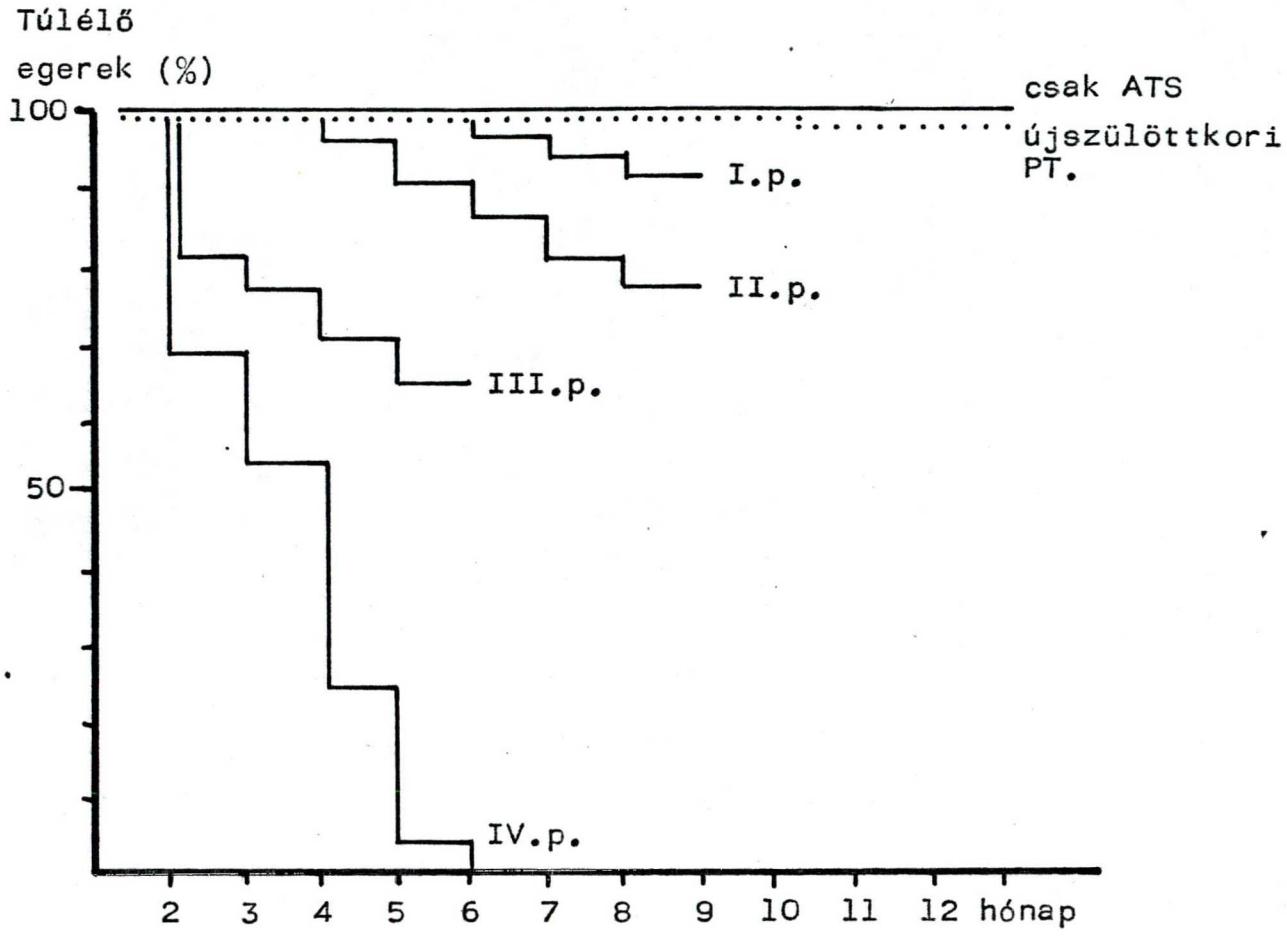
A 8. ábrán látható, hogy nyolc hónapnyi megfigyelési idő elteltével sem hullott el egyetlen egér sem az A $\longrightarrow$ CBA tolerancia-indukciót követően. Ugyanígy nem találtunk lymphoma okozta elhullást az allograftolt, ATS-sel immunszupprimált egerek közt sem. Azonban a tolerancia-indukción



7. ábra. A grafttúlélések alakulása az A → CBA újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukción átesett és permanensen toleránssá vált egerek lépsejtjeinek I., II., III. és IV. passzázsát követően

A recipiensek A farokbőrrel allograftolt, ATS-sel immunszupprimált, felnőtt, szingén (CBA) egerek voltak.
A pontozott vonallal jelölt csoport sejt-transzfert nem kapott, allograftolt és ATS-sel immunszupprimált CBA egerek grafttúlélését ábrázolja.

JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM KÖZPONTI KÖNYVTÁRA SZEGED

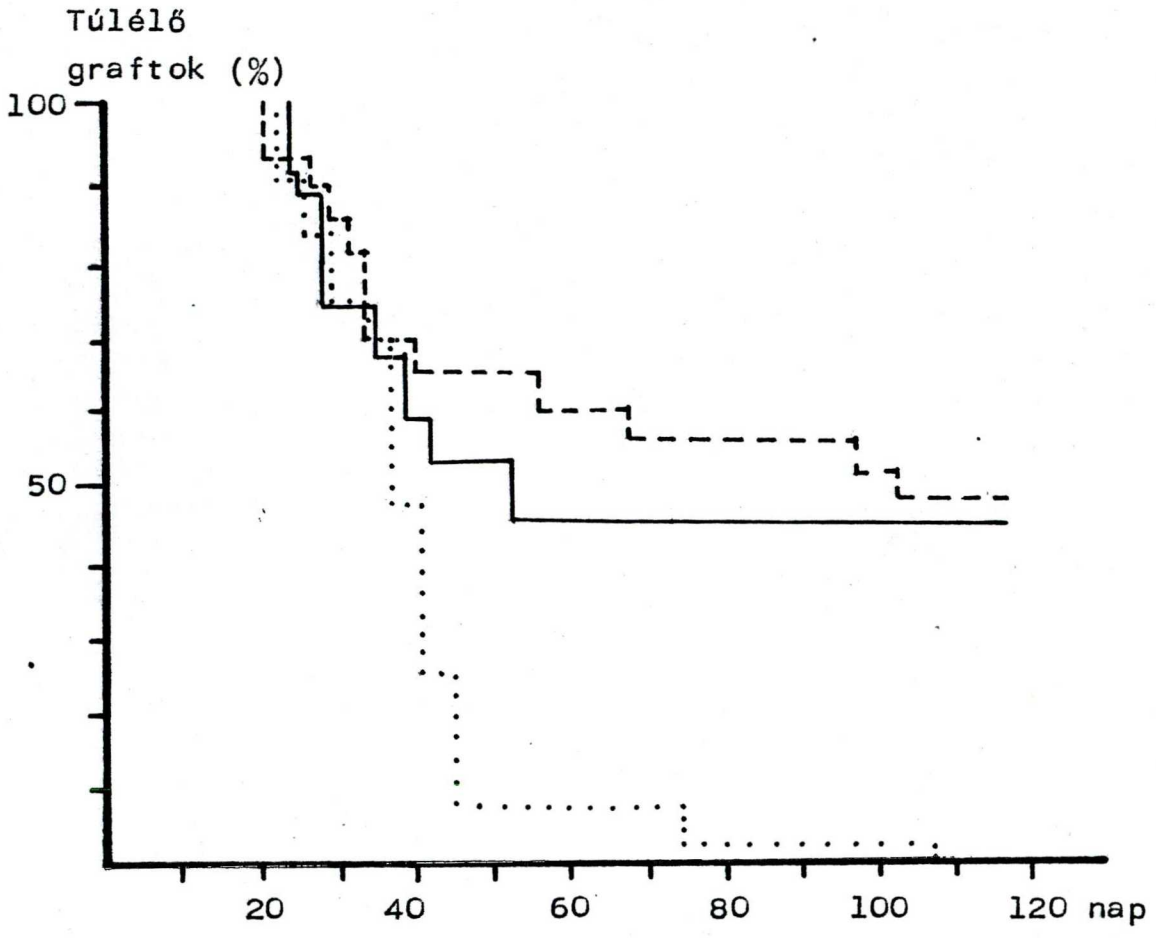


8. ábra. Lymphomák halmozódása és a lymphomás egerek túlélési idejének csökkenése az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukción átesett és permanensen toleránssá vált egerek lépsejtjeinek I., II., III. és IV. passzázsát követően

átesett, makroszkópikusan normálisnak ítélt lépű egerek lépsejtjeinek I. passzázsát követően a recipiensek majd 10 százaléka 9 hónapon belül lymphomában elpusztult. Annak ellenére, hogy a donorként használt egerek lépeit maximális gondossággal ellenőríztük, és csak a normális morfológiájúakból készült szuszpenziókat oltottuk tovább, a második passzázsban az egerek 25, a harmadik passzázsban pedig több mint 35%-a pusztult el lymphoma következtében. A negyedik passzázst már nem követhette újabb, mert az összes egér megbetegedett és elhullott. Nemcsak a lymphomák száma növekedett az egyes passzázsok során, hanem jelentős mértékben csökkent a beteg egerek túlélési ideje is, azaz a lymphomák malignitása erőteljesen fokozódott (8. ábra).

Hasonlóan a korábbiakban a B10 → A tolerancia-indukciós rendszerben már elvégzett analízishez az adoptív sejttranszfert követően is összehasonlítottuk a lymphomássá vált, valamint a lymphomamentesnek bizonyult egerek graftjainak túlélését.

A 9. ábrán az első passzázst követő grafttúléléseket tüntettük fel. Jól látható, hogy a sejttranszferben is részesült egerek átlagos grafttúlélése lényegesen meghaladja a csak ATS-kezelt, A farokbőrrel allotranszplantált egereken kapott értékeket. E kísérletben - hasonlóan a B10 → A tolerancia-indukciós rendszerben tapasztaltakhoz - a lymphomássá vált és a lymphomamentes egércsoportok sem az átlagos grafttúlélési idejükben, sem a graftok kilökődési



9. ábra. A lymphomássá vált és lymphomamentes egerek grafttúlélésének alakulása az A → CBA toleranciakeltésen átesett és permanensen toleránssá vált egerek lépsejtjeinek első passzázsát követően

A lépsejttranszfer recipiensei A farokbőrrel allograftolt, ATS-sel immunszupprimált, felnőtt, szingén (CBA) egerek voltak.
(——— lymphomamentes, - - - - - lymphomássá vált egerek, ····· a sejttranszferben nem részesült, csak ATS-sel kezelt egerek grafttúlélési ideje.)

ütemében nem tértek el számottevően egymástól.

Összegezve a 3.3.1., a 3.3.2. és a 3.3.3. pontok alatt ismertetett kísérleti eredményeket, kimondhatjuk, hogy a különböző törzskombinációkban, a különböző immunmodulációs beavatkozások során (újszülöttkori tolerancia-indukció, adoptív sejttranszfer) kialakított transzplantációs immuntolerancia eredményessége és a malignus lymphomák halmozott megjelenése közt nincs direkt összefüggés.

Ki szeretném emelni e megállapításunk jelentőségét, mivel eszerint különböző faktorok felelősek az immuntolerancia és a malignus lymphomák kialakulásáért, tehát elvileg lehetőségünk van arra, hogy a kérdés részletes analízise után oly módon alakítsunk ki transzplantációs immuntoleranciát, hogy azt ne kövesse a malignus lymphomák halmozott megjelenése.

3.4. A B10 → A tolerancia-indukciót követő lymphoma-megjelenés feltételei

Mivel a B10 → A törzskombinációban az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukciót követően extrémen magas lymphoma-gyakoriságot figyeltünk meg, alkalmasnak tartjuk e kísérleti rendszert a lymphoma-keletkezés egyes tényezőinek a vizsgálatára.

A 3.2. pontban ismertetett eredményeink arra utalnak, hogy nem a már malignusan transzformálódott $(B10xA)F_1$

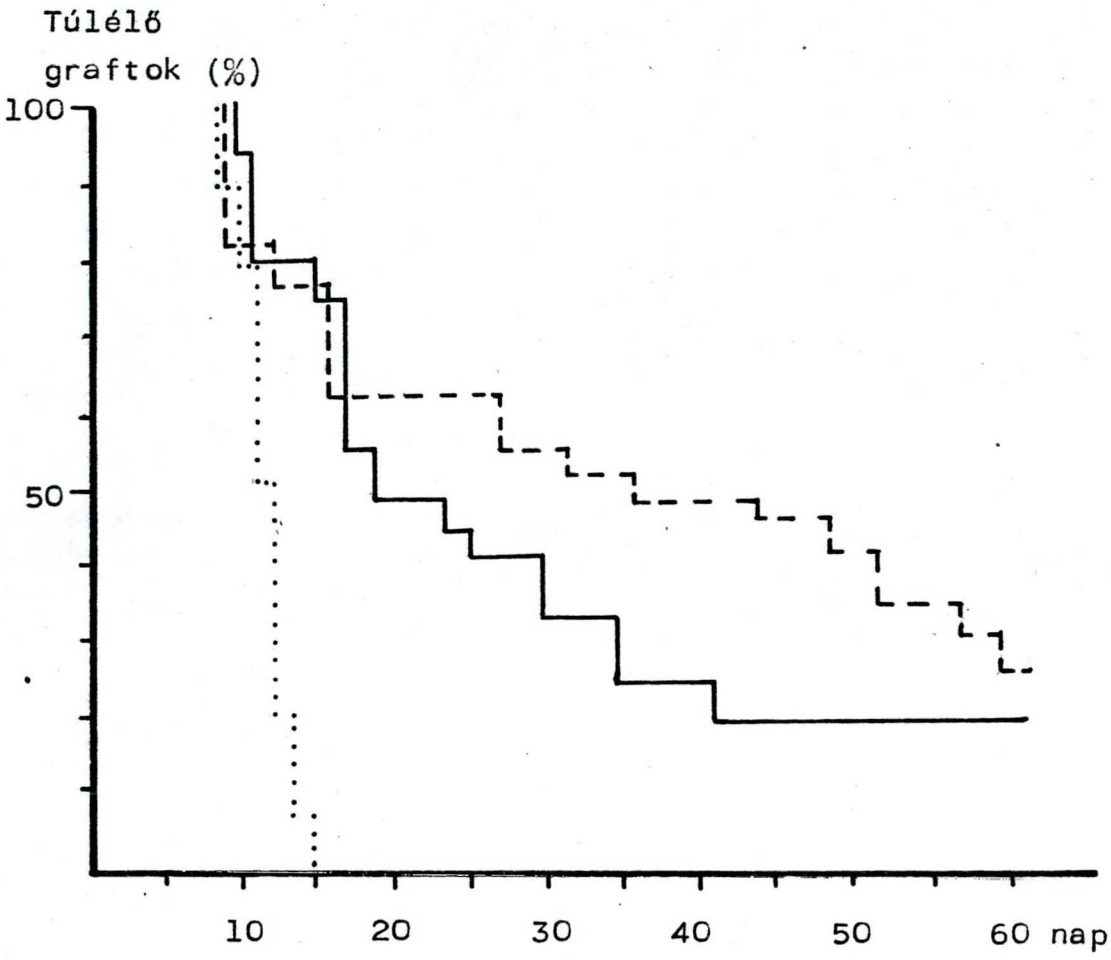
sejtek átvitele felelős a lymphomák gyakori megjelenéséért. A lymphomáknak a sejttranszfert követően a felnövekvő A egerekben kell kialakulniuk, hiszen a megvizsgált lymphomákat recipiens eredetűnek találtuk.

Halmozott lymphoma-megjelenést okozhat az is, ha az újszülöttkorban onkogén vírusfertőzésre érzékeny egerekbe az inokulummal egérleukémia vírusokat viszünk át. E lehetőség ellenőrzésére a következő kísérletet végeztük. Elkészítettük a szokásos $4x10^8$ lépsejt/ml töménységű szemiallogén lépsejtszuszpenziót, azonban az oltás előtt ultrahanggal elroncsoltuk a sejteket, majd 7000 g-vel lecentrifugáltuk, és csak a $2x10^7$ sejttel ekvivalens térfogatú (0,05 ml) felülúszót oltottuk be az újszülött egerekbe intravénásan. Ha a kiindulási, intakt sejtszuszpenzió az in vivo transzformálásra képes vírust tartalmaz, akkor annak a felülúszóban is jelen kell lennie.

Négy alkalommal, összesen 42 újszülött A egeret oltottunk (B10xA)F_1 sejtek ultrahanggal végzett feltárása után nyert felülúszóval, ezekből 16-ot sikerült felnevelni, a többi az oltás napján, vagy közvetlenül az oltást követő néhány napon belül elhullott. A 2 hónapos kort elért egereket a szokásos módon B10 farokbőrrel meggraftoltuk. Az egerek tesztgraftjai nem éltek hosszabb ideig, mint azt a normál, kezeletlen A egereken megfigyeltük, a 9-10. napon valamennyi tesztgraft kilökődött. Az egereket 10 hónapig figyeltük meg: ez alatt az idő alatt egyetlen lymphoma okozta elhullás sem történt. (Az intakt lépsejtekkel

végzett toleranciakeltésen átesett egércsoportokban ez idő alatt a mortalitás elérte az 50%-ot!) Mivel a (BlOxA)F_1 sejtek ultrahanggal feltárt szuszpenziójának felülúszóját újszülött A egerekbe oltva nem lehetett lymphoma-keletkezést provokálni, arra következtettünk, hogy a Bl0 → A tolerancia-indukciót követően megjelenő lymphoproliferatív elváltozásokat nem lehet egyszerűen az újszülöttkori onkogén vírusokra érzékeny egerek direkt vírusfertőzésére visszavezetni.

E kísérlet eredménye a tolerancia-indukciókor átvitt ép, funkcionáló (BlOxA)F_1 hibrid sejtek fontosságára hívta fel a figyelmet. Megkíséreltük a lymphomák keletkezését a lépsejtszuszpenzió egy adott szubpopulációjához rendelni. Ezért anti-Thy 1.2. savó + komplementkezeléssel elöltük a Thy 1.2. markert hordozó, funkcionáló T-sejteket a toleranciakeltéshez használt lépsejtszuszpenzióban, majd a szokásos $2x10^7$ sejtet oltottuk az újszülöttekbe. A beoltott 37 egérből 26-ot sikerült felnevelni, majd a szokásos időben Bl0 farokbőrt ültettünk a hátukra. A grafttúléléseket megfigyelve megállapítottuk, hogy a tolerancia-indukció sikeres volt: a tesztgraftok túlélési ideje lényegesen hosszabb volt, mint a normál állatokon megfigyelt, de egy kissé rövidebbnek bizonyult, mint a komplett szuszpenzióval végzett tolerancia-indukció esetén (10. ábra). A lymphomák megjelenése azonban teljesen elmaradt: a 9 hónapos megfigyelési idő alatt egyetlenegy egér sem hullott el lymphomás tünetek között. Ezek alapján feltételezzük, hogy



10. ábra. A B10 tesztgraftok túlélési ideje anti-Thy 1.2. savó + komplement kezelt (B10xA)F_1 lépsejt-szuszpenzióval végzett tolerancia-indukción átesett A egereken

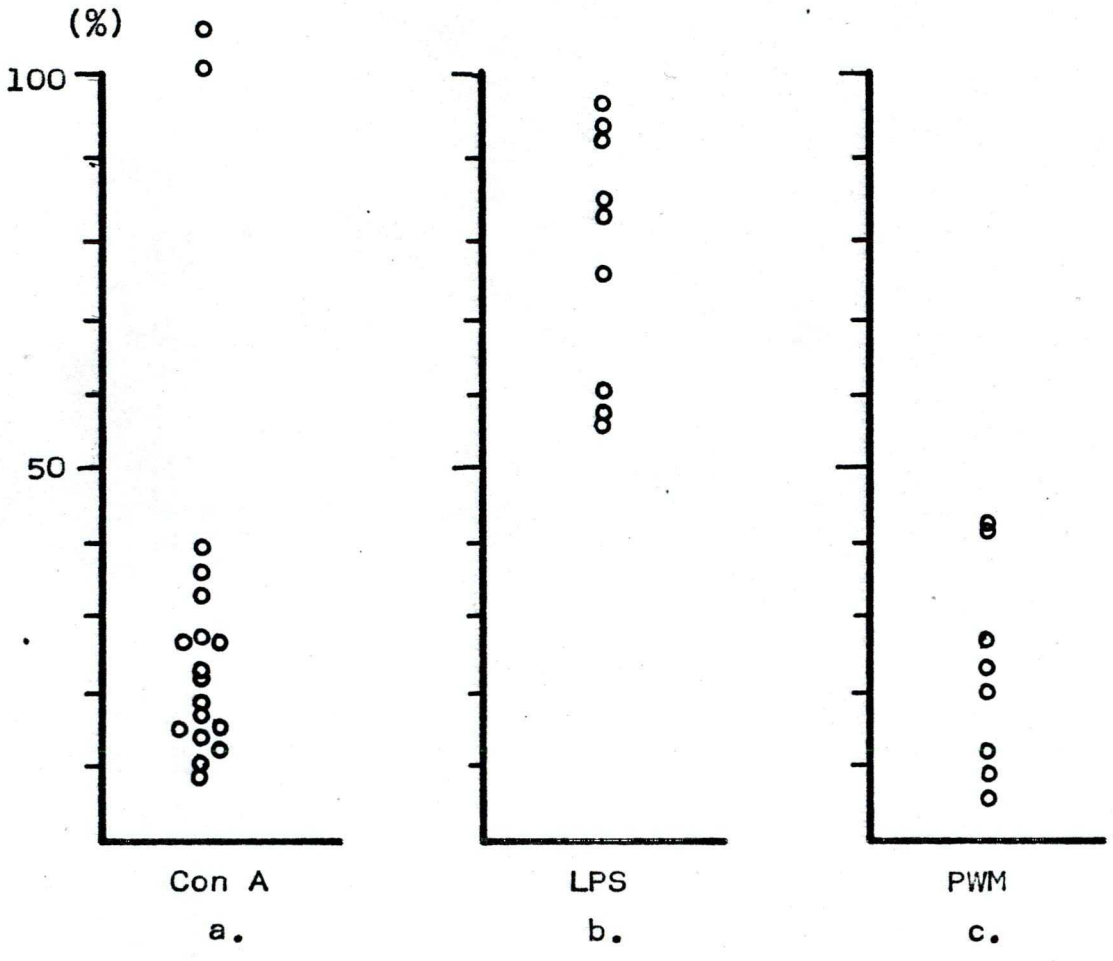
A folyamatos vonal a kezeletlen lépsejt-szuszpenzióval, míg a szaggatott vonal az anti-Thy 1.2. savó + komplement kezelt lépsejt-szuszpenzióval végzett toleranciakeltésen átesett egerek grafttúlélését mutatja. A pontozott vonallal a normál A egereken megfigyelt grafttúlélési görbét jelöltük.

a B10 → A tolerancia-indukciót követő halmozott lymphoma-megjelenés egyik fontos oki tényezője a tolerancia-indukció során az újszülött A egerekbe oltott, funkcionáló (B10xA)F_1, Thy 1.2. alloantigén-pozitiv lépsejtpopuláció (T-sejtek).

3.5. A B10 → A toleranciakeltésen átesett egerek immunológiai állapotának megváltozása

A B10 → A újszülöttkori tolerancia-indukciót követő 2. hónaptól folyamatosan hullanak el az egerek a recipiens eredetű, generalizálódó nyirokrendszeri daganatok következtében (3.2., 3.3. fejezet). Az egerekben egyhónapos korukban még semmilyen makroszkópos elváltozást nem találtunk, normálisan fejlődtek, nyirokszerveik sem tértek el az azonos korú, kezeletlen egerekétől. Azonban funkcionális szempontból jelentős eltérést sikerült kimutatnunk a toleranciakeltésen átesett és a kezeletlen egerek között.

A tolerancia-indukción átesett, négyhetes egerek lépéből egyedi sejtszuszpenziókat készítettünk és ezeket poliklonális T- és B-sejt mitogénekkel stimuláltuk. A triciált timidin inkorporációját a mintában mért cpm értékkel jellemezve, a kapott cpm értékeket az azonos korú, de kezeletlen (általában azonos alomból származó) egerek sejtszuszpenzióiban talált, stimulációs értékekkel hasonlítottuk össze. A 11. ábrán a kezelt egerek lépsejtszuszpenzióiban mért timidin inkorporációt a kontrollok százalékában fejeztük ki.



11. ábra. Poliklonális T és B sejt mitogének hatása 4 hetes, B10 → A tolerancia-indukción átesett egerek lépsejtjeire

Az ábrán a kezelt egerek lépsejtjeinek timidin inkorporációját tüntettük fel az azonos korú, normál kontroll egerek sejtszuszpenzióiban mért cpm értékek százalékában kifejezve.
Mitogének: a. 2,5 µg/ml Con A
b. 25 µg/ml LPS
c. 2,5 µg/ml PWM.

A T-sejt mitogénként ismert Con A az esetek zömében csak nagyon kis mértékben volt képes stimulálni az újszülöttkori tolerancia-indukción átesett egerek lépsejtjeit. A megvizsgált 18 egér közül 16 esetében átlagosan a kontrollnak csupán húsz százalékát érte el. Két esetben a stimulációs válasz nem tért el a kontrolltól (11/a ábra).

A B-sejt mitogénként ismert LPS a 9 B10→A toleranciakeltésen átesett egér lépsejtszuszpenziójából ötben csak 10-20%-nyival, egy esetben 30, további háromban pedig 43-48%-kal kisebb stimuláló hatást fejtett ki, mint a kontroll kultúrákban. Az LPS mitogén effektusa tehát a Con A-val kapott eredményekhez viszonyítva csak kis mértékben csökkent (11/b ábra).

A PWM hatását vizsgálva ismét a Con A-val végzett kísérletekben tapasztaltakhoz hasonló jelenséget figyeltünk meg: a toleranciakeltésen átesett egerek lépsejtjeinek timidin inkorporációja legtöbbször nem haladta meg a kontrollok 5-20%-át; egy esetben 26, - további kettőben pedig 42-45 %-ot ért el. Ez azt mutatja, hogy a T- és a B-sejteket is stimuláló PWM ugyancsak erősen csökkent hatékonysággal indukálja a toleranciakeltésen átesett egerek lépsejtjeinek DNS-szintézisét, illetve proliferációját (11/c ábra).

Mind a Con A-val, mind a PWM-mel végzett stimulációs kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a B10→A tolerancia-indukción átesett egerek lépsejtszuszpenziójának a T-sejt mitogénekre adott válasza erősen csökkent, vagy

esetenként csaknem teljesen hiányzik. Ennek egyik oka lehetne az is, hogy maguk a T-sejtek csak kis számban vannak jelen e lépsejtszuszpenziókban, vagy hiányoznak belőlük. A kérdés eldöntésére anti-Thy 1.2. és anti-Ia savóval komplement-dependens cytotoxicitási tesztben megvizsgáltuk a toleranciakeltésen átesett egerek lépsejtszuszpenzióinak T-sejt és Ia-pozitiv sejt tartalmát. Azt találtuk, hogy a mitogén tesztben (Con A, PWM) "némának" bizonyuló lépsejtszuszpenziókban a Thy 1.2.-pozitív (T) sejtek aránya nem tér el számottevően az azonos korú, kezeletlen egerek szuszpenziójában megfigyelt értéktől (7. táblázat), legfeljebb csak néhány százalékkal kevesebb Thy 1.2.-pozitív sejtet találunk, de ez a cytotoxicitási teszt érzékenységét ismerve nem szignifikáns különbség. Ennek alapján feltételezzük, hogy a T-sejt mitogénekkel szemben tapasztalt érzéketlenség funkcionális eredetű és nem a T-sejtek hiánya okozza.

A 7. táblázaton tüntettük fel az anti-H-2^a és az anti-H-2^b savókkal végzett cytotoxicitási tesztek eredményeit is. Minden megvizsgált 4 hetes egér lépsejtszuszpenziója gyakorlatilag 100%-ban reagált az anti-H-2^a savóval. A (B10xA)F_1 sejtek jelenlétére utaló B10-re jellemző sejtfelszíni antigének a 10 megvizsgált egér közül négyben egyértelműen kimutathatók voltak. További három egérben a cytotoxicitás a kimutathatóság határértéke körül volt, három esetben pedig nem találtunk pozitivitásra utaló cytotoxicitást. Ezek alapján a B10 → A tolerancia-indukciót

7. táblázat. B10 → A toleranciakeltésen átesett 4 hetes egerek lépsejtjeinek érzékenysége alloantisavókkal szemben a komplement-dependens cytotoxicitási tesztben

Target		Cytotoxikus effektus (%)			
		anti-H-2^a	anti-H-2^b	anti-Thy1.2.	anti-Ia^k
Normál A lépsejtek		95-100	0	30-35	55-60
Normál (B10xA)F_1 lépsejtek		95-100	95-100	30-35	55-60
Toleranciaindukción átesett	1.	100	3	32	63
	2.	97	0	29	49
	3.	100	2	34	57
	4.	97	20	28	53
	5.	100	0	33	55
	6.	100	0	29	55
	7.	93	43	34	51
	8.		13	27	53
	9.		4	29	47
	10.		11	32	52
	11.			33	57
	12.			32	53
	13.			29	55

Alloantisavók: anti-H-2^a = B10 anti-A; anti-H-2^b = A anti-B10; anti-Thy 1.2. = AKR anti-CBA; anti-Ia^k = ATH anti ATL.
Hígításuk 1:5, a komplementhígítás 1:8 volt.

követően az egerek kb. egyharmadában egy hónapos korban még jelentős a lymphoid chimerismus. A (B10xA)F_1 sejtek esetenkénti magas arányban való jelenléte (43%, 20%) arra utal, hogy az F_1 eredetű sejtek nemcsak életben maradnak az újszülöttkori toleranciakeltésen átesett egerekben, hanem szaporodnak is.

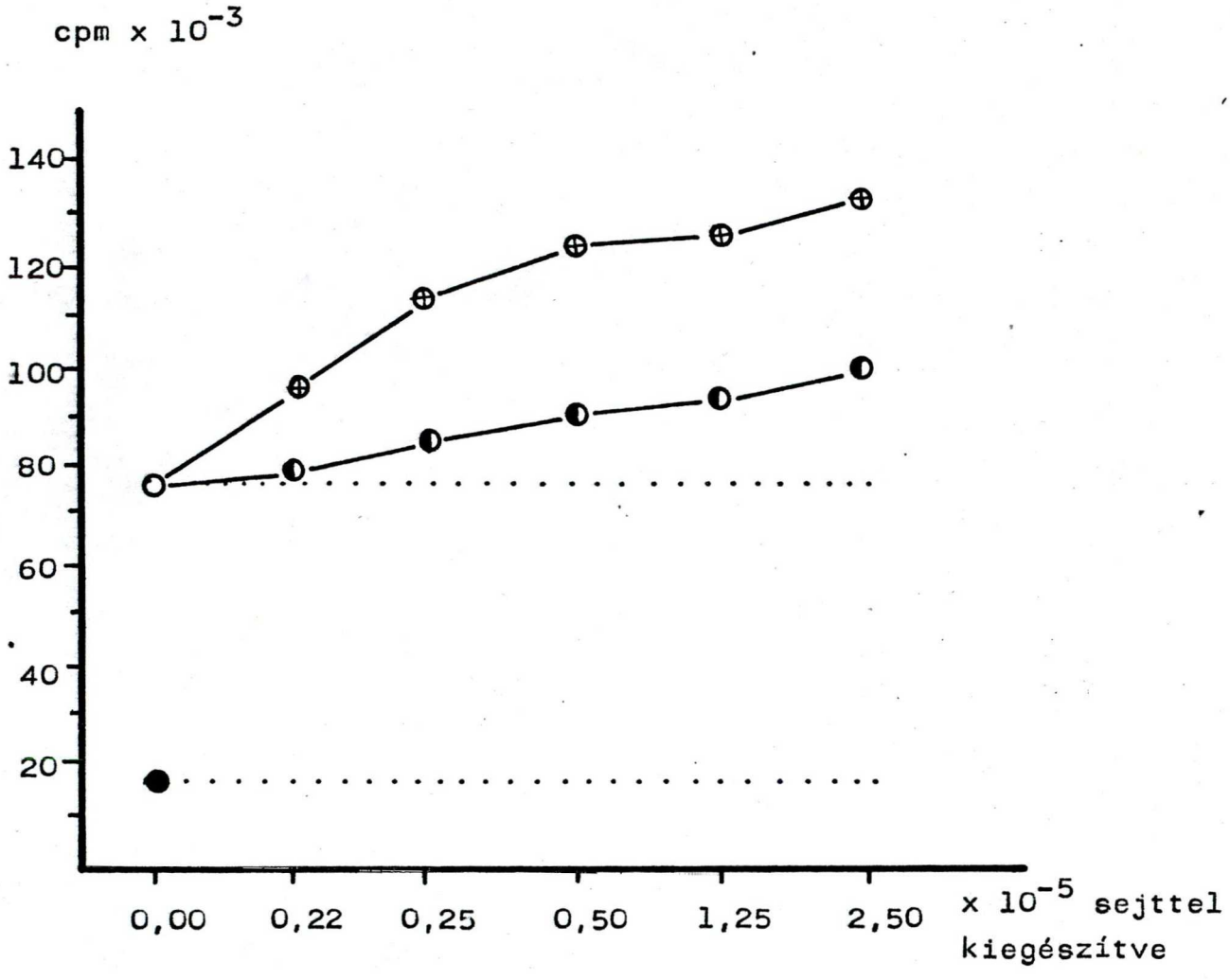
Visszatérve arra a megállapításunkra, miszerint a T-sejt mitogénekkel szembeni válaszképtelenség funkcionális eredetűnek tűnik, továbblépésként azt próbáltuk tisztázni, hogy vajon aktiv szuppresszor sejtek által fenntartott jelenséggel állunk-e szemben, vagy valamilyen egyéb folyamat gátolja a mitogén indukálta proliferációs választ.

Ha a gátlást szuppresszor sejtek tartják fenn, akkor ezek hatásának az ún. szuppresszor tesztben kimutathatónak kell lennie, tehát ha a feltételezett szuppresszor aktivitással bíró sejteket a kultúrákhoz adjuk, gátolniuk kell a normál sejtek mitogénekkel szembeni válaszát is. Előzetes eredményeink szerint a Con A-val normál A egér lépsejteken kiváltott stimulációs válasz újszülöttkori toleranciakeltésen átesett egerek lépsejtjeivel történő együtt inkubálással nem volt gátolható.

A kisérlet során $2,5x10^5$ normál lépsejthez ugyanannyi, toleranciakeltésen átesett egérből származó lépsejtet kevertünk, majd 2,5 µg/ml koncentrációjú Con A-val stimuláltuk a sejtszuszpenziókat. A három napig tartó inkubálás után a szokásos módon 1 µCi timidinnel jelöltük a kultúrákat. Kontrollként olyan kultúrákat indítottunk, amelyek

csak normál sejteket tartalmaztak: $2,5x10^5$, illetve $5x10^5$ sejtet lyukanként, továbbá olyat, amelyben csak $2,5x10^5$ toleranciakeltésen átesett egérből származó sejt volt. A toleranciakeltésen átesett egerek lépsejtjeiből készült szuszpenzióból hígítási sort is készítettünk és változó keverési arányban adtuk hozzá a $2,5x10^5$ normál sejtet tartalmazó kultúrákhoz. Az eredményeket a 12.ábrán tüntettük fel.

Ebből látható, hogy a toleranciakeltésen átesett egerekből származó sejtek nem gátolták a normál kultúrák aktivitását. Megállapítható az is, hogy a normál sejtek sem függesztették fel a tolerancia-indukción átesett egerekből származó lépsejtek Con A-val szembeni válaszképtelenségét, hiszen a tesztkultúrák timidin inkorporációs értékei messze alatta maradtak az ugyanolyan sejtszámot tartalmazó normál sejtes kultúrák értékeinek. A mért cpm a toleranciakeltésen átesett és a normál kultúrák cpm értékeinek az összegével volt egyenlő, azaz a két sejtféleség tesztkultúrákban nem hatott egymásra.



12. ábra. B10 → A toleranciakeltésen átesett 4 hetes egerek lépsejtjeinek hatása normál A lépsejt-szuszpenzió Con A-val indukált T-sejt proliferációjára

Toleranciakeltésen átesett egérből származó, különböző számú lépsejtet adtunk $2,5x10^5$ normál A lépsejthez (◐) és 72 órás inkubálást követően mértük a timidin inkorporációt.
Kontrollok: $2,5x10^5$ normál A lépsejt (○), $2,5x10^5$ tolerancia-indukción átesett egérből származó sejt (●), és a tesztkultúrákkal azonos számú, de normál sejttel kiegészített lépsejt-kultúrák (⊕). A Con A koncentráció 2,5 µg/ml volt.

4. DISZKUSSZIÓ

A tolerancia-indukciót követően megjelenő lymphomák eredete. Az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció élő, osztódóképes F_1 hibrid sejtek újszülött egerekbe való oltásával történik. Igen kézenfekvő volt a gyanú, hogy a tolerancia-indukciót követően azért jelentek meg halmozottan a lymphomák, mert az újszülött egerekbe már eleve malignusan transzformált sejteket oltottunk. Ennek a lehetősége a spontán lymphomák ritkasága folytán a B10 → A törzskombinációban szinte kizárt, hiszen a (B10xA)F_1, de a (B10xCBA)F_1 hibridek között sem találtunk lymphomában megbetegedett egeret. (CBAxA)F_1 hibridekben ugyan kis gyakorisággal manifesztálódott a lymphoma, de ebben az esetben is erősen csökkentette a lymphoma-átvitel lehetőségét az, hogy csak a makroszkóposan normális lépű F_1 egereket használtuk fel lépsejtdonorként.

További direkt bizonyítékaink is vannak a lymphomák F_1 hibrid eredetével szemben. Az F_1 hibrid egerek sejtjeinek felszínén mind a két szülői törzsre jellemző fő hisztokompatibilitási antigének manifesztálódnak (28) és ez általában lymphomás sejtek esetében sem változik meg. Ezt a (CBAxA)F_1 hibrid egérből izolált lymphoma (L/III. jelű, lásd 3.1. fejezetben) esetében igazoltuk is. Ez a lymphomavonal komplement-dependens cytotoxicitási tesztben egyaránt reagált anti-H-2^k és anti-H-2^a savóval. A CBA → A tolerancia-indukciót követően megjelent, majd izolált

L/XXXIII. jelű lymphománk azonban csak anti-H-2^a, az A →CBA tolerancia-indukció után izolált L/1-4 Asc. és L/VI. lymphomavonalaink kizárólag anti-H-2^k savókkal reagáltak (itt nem ismertetett adatok). A 3.2. fejezetben ismertettük a B10 →A tolerancia-indukciót követően megjelent lymphomák fő hisztokompatibilitási antigénjeire vonatkozó tesztek eredményeit. Ebben az esetben is csak a recipiensre jellemző (H-2^a) antigének jelenléte volt kimutatható, ami azt bizonyítja, hogy az újszülöttkori tolerancia-indukciót követően megjelenő lymphomák nem donor, hanem recipiens eredetűek. Azt a megfigyeléseinkből, valamint az irodalmi adatokból is tudjuk, hogy az A, B10 és CBA egértörzsekben a spontán lymphomák ritkán fordulnak elő (27), ellentétben a BALB/c vagy AKR egerekkel, amelyekben gyakoriak a B-sejtes kis lymphocytás (BALB/c), illetve a T-sejtes lymphoblastos lymphomák (AKR) (27, 29).

Gyanúnk a következőkben az onkogén hatású egérvírusokra, az RNS-tartalmú, ún. retrovírusokra terelődött (8. táblázat), arra, hogy esetleg a lépsejtszuszpenziókkal nagy számban viszünk át leukémia vírusokat, amelyek az újszülött egerekben nagyon erős lymphoma- és leukémiakeltő hatásúak (30, 31).

Mivel a B10 →A törzskombinációban nagyon korán kezdődő lymphoma okozta elhullásokat figyeltünk meg (3.1. fejezet, 1.ábra), e rendszerben próbáltuk tisztázni az esetlegés vírusfertőzés szerepét. Ultrahanggal elroncsolt donor (B10xA)F_1 lépsejtek felülúszóját oltottuk újszülött A egerekbe. A kísérleti eredményeink szerint azonban a

8. táblázat. Lymphomakeltő egér retrovírusok Mak szerint (32)

Vírus	Az általa indukált malignoma
Abelson-leukaemia-vírus	pre-B-sejtes leukaemia, B-immunoblastos lymphoma
Friend-leukaemia-vírus	erythroleukaemia, T-sejtes lymphomák
Gross-leukaemia-vírus	T-sejtes leukaemia, lymphoma
Harvey-sarcoma-vírus	erythroblastosis, fibrosarcoma
Kirsten-sarcoma-vírus	erythroblastosis, fibrosarcoma, lymphoma
Moloney-leukaemia-vírus	T-sejtes leukaemia, thymoma
Myeloproliferatív sarcomavírus	erythroblastosis, myeloproliferativ syndroma, lymphoma

lymphoma-keletkezés elmaradt. Egy másik kísérletünkben az anti-Thy 1.2. savóval + komplementtel kezelt (B10xA)F_1 lépsejtszuszpenzió újszülöttekbe való oltását követően is elmaradt a lymphoma-keletkezés, tehát még a sejtekkel esetleg

átvitt vírusok sem voltak alkalmasak egymagukban lymphoma-indukcióra (3.4. fejezet).

A transzplantációs tolerancia-indukció és a lymphomák halmozott megjelenése. A szemiallogén lépsejtekkel végzett újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció legszembetűnőbb következménye az alloantigénekkel szembeni, specifikus válaszképtelenség (33). Ennek magyarázata a klasszikus Burnet-féle teória (34) szerint az, hogy eliminálódnak az alloreaktív lymphocyta klónok. Azonban a transzplantációs tolerancia mechanizmusát vizsgáló kutatások során olyan adatok merültek fel, amelyek egy aktív szuppresszor T-sejtes mechanizmus jelenlétére utalnak (35, 36, 37). A szuppresszor sejtek jelenléte, illetve generálhatósága, és ezáltal esetleg specifikus immuntolerancia kialakíthatósága mind elméleti, mind gyakorlati szempontból igen jelentős kérdés. A tolerancia indukálhatósága igazi megoldást adhatna a szervátültetésekben érdekelt klinikusok számára, akik a műtéti technikák kidolgozása és tökéletesítése után elsősorban a transzplantátumok rejekciója ellen küzdenek. E téren - a szuppresszor sejtes mechanizmusok szerepének felismerése mellett - más ígéretes eredmények is kialakulóban vannak. Feltételezik például, hogy a T-sejtek által termelt interleukin-2 (IL-2) hiánya igen fontos szerepet játszik a tolerancia kialakításában. Az újszülött egerekben, amelyek egyébként IL-2 deficiensek és könnyen indukálható bennük tolerancia, külső IL-2 bevitelre már elveszítik a tolerancia-indukcióra való

készségüket, azaz egy antigéninger IL-2 deficiens állapotban specifikus válaszképtelenséget idézhet elő (38, 39).

Éppen a specifikus transzplantációs tolerancia előidézhetőségének nagy jelentősége miatt igen fontosnak tartottuk annak a kérdésnek a részletes vizsgálatát, hogy van-e valamilyen összefüggés az újszülöttkori, valamint a szuppresszor sejtek átvitelével keltett, felnőttkori tolerancia kialakulása és e beavatkozásokat követően megfigyelt halmozott lymphoma-megjelenés között.

A 3.3.1., 3.3.2., és a 3.3.3. pontok alatt ismertetett kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a transzplantációs tolerancia létrejötte és a lymphomák halmozott megjelenése két, egymástól független folyamat. Mind az előbbit (40), mind az utóbbit befolyásolják immungenetikai tényezők, de ezek szintén nem azonosak. Vizsgálataink a legkevésbé sem mutatnak arra, hogy malignus lymphomák gyakrabban fordulnának elő azokban az egértörzs-kombinációkban, vagy egy adott kombináción belül azokban az egerekben, amelyekben a transzplantátumok hosszabb ideig élnek, vagyis amelyekben a transzplantációs tolerancia-indukció sikeresebb volt. Ebből azt a megnyugtató következtetést vonhatjuk le, hogy elvileg lehetséges transzplantációs toleranciát indukálni anélkül, hogy megnövelnénk a lymphomák kialakulásának kockázatát. A transzplantációs tolerancia-indukció eredményessége és a megnövekedő lymphoma-gyakoriság közötti esetleges összefüggésre vonatkozó publikáció tudomásunk szerint még nem jelent meg.

Az F_1 hibrid sejtek szerepe a lymphomák kialakulásában. Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a B10 ⟶ A újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukciót követően az egerek egy része (a megvizsgált 10 közül 4 biztosan) - legalábbis 4 hetes korban - chimerának bizonyult (3.4. fejezet). Hasonló megfigyelésekről számolt be Hard (41) $(T_6T_6 \times RFM)F_1$ hibrid lépsejtek RFM egerekbe való oltása után, Simpson pedig a $(C57BL/6 \times BALB/c)F_1$ ⟶ BALB/c törzskombinációban (42). Az újszülöttkori tolerancia-indukciót követően kialakuló lymphoid chimerismust patkányokban is megfigyelték, sőt úgy találták, hogy a toleráns állatokban a szuppresszo T-sejtek az F_1 sejtekkel azonosak (43). A felsorolt adatok tanúsága szerint a tolerancia-indukció kapcsán az újszülöttekbe oltott élő hibrid lymphoid sejtek tovább éltek, szaporodtak és funkcionáltak az új környezetükben is. Éppen ezért fontosnak tartjuk azokat a kísérleti eredményeinket, amelyek szerint az anti-Thy 1.2. savóval + komplementtel kezelt $(B10 \times A)F_1$ lépsejtszuszpenziót újszülött A egerekbe oltva a transzplantációs immuntolerancia kialakult, de a lymphomák megjelenése teljesen elmaradt (3.4. fejezet).

Az újszülöttkori transzplantációs tolerancia létrejöttéhez tehát nem szükséges, hogy a szemiallogén lépsejtinokulum élő T-sejteket tartalmazzon, ugyanakkor úgy látszik, hogy a lymphomák kialakulásában az F_1 eredetű T-sejtek igen fontos szerepet töltenek be. Ez az eredmény újabb, most már közvetlen kísérletes bizonyítékot

szolgáltatott azon feltevésünkre, miszerint a lymphomák keletkezése független a specifikus transzplantációs immuntoleranciától, igazolva, hogy gyakorlatilag is lehet toleranciát kelteni anélkül, hogy lymphomák keletkezését idéznénk elő.

Ami a Thy 1.2. markert illeti, valószínűnek tartják, hogy ennek a molekulának elsődleges funkciója nem immunológiai, hanem általában a szorosabb sejt-sejt közötti inter-, akciókban vesz részt. Az immunregulációs és a sejtmediálta effektor mechanizmusokban részt vevő T-sejtek számára ez ugyancsak fontos lehet (44). A Thy 1.2. pozitív T-lymphocyták eliminálásával eleve kizártuk az F_1 hibrid donor T-sejtek és a recipiens A egér sejtjei közötti interakciók lehetőségét. A következőkben a lehetséges kölcsönhatásokat próbáljuk áttekinteni.

A krónikus graft-versus-host reakciót (GVHR) követően fokozott gyakorisággal jelennek meg malignus lymphomák. E lymphomákat a parentális törzs (donor) $\longrightarrow$ F_1 hibrid (recipiens) kombinációban donor, azaz parentális törzsből származónak találták, ami mintegy igazolni látszott azt az elképzelést, hogy a krónikus antigéninger hatására lymphomák fejlődnek ki (15, 45).

A transzplantációs immunológia szabályai szerint a beltenyésztett egerekben a szemiallogén F_1 sejtek vagy toleranciát indukálnak, vagy kilökődnek, de graft-versus-host reakciót (GVHR) elvileg nem okozhatnak. Egy esetben fordulhatna elő GVHR-szerű reakció, ha az F_1 sejtek olyan antigént

ismernének fel a parentális törzsű egérben, amely nem expresszálódik az F_1 sejteken (46).

Esetünkben nem valószínű, hogy ilyen speciális, F_1 sejtek által okozott erős GVH reakció jelentkezett volna. A megbetegedett egerekben sem boncoláskor, sem a szövettani vizsgálatokkor nem figyeltünk fel gyulladásos reakciókra, a nagy lépű egerekben nem voltak kimutathatók F_1 eredetű lymphocyták. A GVH reakciót intenzív sejtszaporodás kíséri, azonban a mitogénekkel végzett stimulációs kísérletek során nem tapasztaltunk erős mitotikus (illetve DNS-szintetizáló) aktivitást azokban a négy hetes egerekből származó lépsejt-kultúrákban, amelyeket stimulálatlan kontrollként inkubáltunk. E kultúrák inkorporációt jelző cpm értékei nem tértek el számottevően a megfelelő korú szingén egerek lépsejt-kultúráiban mért cpm értékektől.

Több beszámoló jelent meg arról, hogy a szemiallogén F_1 lépsejtek újszülött egerekbe oltását követően ún. host-versus-graft (HVG) szindróma léphet fel (42, 47, 48). Az akut HVG szindróma során az egerekben súlyos immunkomplex betegség alakul ki, emiatt a vesékben glomerulonephropathia, a májban pedig infarktusok fejlődnek ki, amelyek milliméternyi, vagy akár egész májlebeny kiterjedésűek is lehetnek. Erőteljes depléció észlelhető a lép és a nyirokcsomók T-dependens áreáiban, ezzel párhuzamosan polymorphonuclearis és eosinophil leukocyták fokozott beáramlása figyelhető meg. A B-sejtes zónákban, a nyirokcsomók és a lép folliculusaiban azonban - ellentétben a T-sejtes zónákban megfigyelt

sorvadással - erőteljes hyperplasia fejlődik ki, a centrum germinativumban a szokásos 24 napos kor helyett már 7 napos korban érett plazmasejtek jelennek meg. A betegségben az egerek egy része gyorsan elhullik (49). Az akut HVG szindrómát túlélő egerekben később igen gyakran recipiens eredetű B-sejtes lymphomák fejlődnek ki. A premalignus és malignus elváltozások a Peyer-plakkokban, nyirokcsomókban és a lépben jelennek meg, a thymus viszont soha nem érintett.

Igen figyelemre méltó a számunkra az is, hogy a HVG szindróma "beindulásához" érett, F_1 eredetű lépből vagy nyirokcsomóból származó T-sejtek bevitelére van szükség. Ha éretlen, a thymusból származó sejtszuszpenzióval oltották az újszülött egereket, mind a HVG szindróma tünetei, mind a lymphoma-keletkezés elmaradt (47).

Az általunk vizsgált B10→A tolerancia-indukciós rendszerben nem tapasztaltuk az akut HVG szindróma jeleit, ezek a néhány korai (7-21 nap közötti) elhullás esetén sem mutatkoztak. A lymphomák azonban a mi esetünkben is B-sejt eredetűeknek bizonyultak, és a lymphoma-indukciót is F_1 eredetű T-sejt dependensnek találtuk.

Az újszülöttkori tolerancia-indukció során átvitt élő, érett T-sejtek egy része az eredeti gazdában immunregulációs feladatokat töltött be (50). Ha idős egerek lépsejtjeit oltották fiatal, legfeljebb néhány napos szingén egerekbe, akkor azokban súlyos immunregulációs zavarokat lehetett provokálni: gátolttá vált a lépsejtek Con A-val szembeni válaszképessége, és a Rous-sarcoma vírussal való fertőzést

követően ötszörösére nőtt a primer sárcomák incidenciája (51). Ismeretesek olyan adatok, amelyek szerint az egértörzsek "természetes" állapotukban C típusú onkogén vírusokkal fertőzöttek, de ez általában nem jár semmiféle következménnyel, mert az onkogenezis bizonyos genetikai kontroll alatt áll (52). A toleranciakeltés során átvitt F_1 eredetű T-sejtek azonban - esetleges immunregulációs zavarokat provokálva - hozzájárulhatnak e vírusok aktiválódásához, amely azután lymphomák indukciójához vezethet. Annál inkább figyelembe kell venni ezt a lehetőséget, mert a lymphomák halmozott megjelenésével járó immunreakciók során (krónikus GVHR, HVG szindróma, graftkilökődési reakciók, cyclosporinnal végzett immunszuppresszió) az onkogén egérleukémia vírusok aktivációjáról számoltak be (42, 47, 53, 54).

Azok az immunregulációs folyamatok, amelyeknek a felborulása az onkogén leukémia vírusok aktiválódásához vezet, szinte teljesen ismeretlenek. Legtöbben az intenzív sejtproliferációval hozzák kapcsolatba, de azt, hogy ez oki tényező-e vagy csak következmény, igen nehéz megítélni, hiszen ismertek olyan adatok is, melyek szerint maguk az onkogén vírusok szintén képesek erőteljes sejtosztódást kiváltani (55), antivirális kezelés (acyclovir) hatására pedig esetenként ezek a hiperpláziás folyamatok visszafordíthatók (56).

Az aktiválódott vírusok létrehozhatnak erős immunszuppressziót is úgy, hogy vagy elpusztítják az effektor

lymphocytákat, vagy pedig modulálják az immunrendszert: specifikus és nem specifikus szuppresszor sejteket generálnak (57).

A B10→A tolerancia-indukciót követően a T-sejt mitogénként ismert Con A-val szemben gátolt válaszképességet találtunk, azonban nem specifikus szuppresszor sejtek jelenlétét az eddigiekben nem sikerült kimutatnunk (3.4. fejezet). Emellett az anti-Thy 1.2. ellenanyaggal végzett komplement-dependens cytotoxicitási tesztben igazoltuk, hogy a T-sejtek normális vagy alig csökkent mennyiségben voltak jelen a tolerancia-indukción átesett egerek lépében. A fentiek figyelembevételével a T-sejt mitogénnel szembeni erősen csökkent reakcióképesség úgy magyarázható a legegyszerűbben, hogy számottevően megváltozott a lépben lévő T-sejtek szubpopulációs szinten való megoszlása. Nishimura és mtsai (58) Percoll sűrűséggrádiens centrifugálással három olyan T-sejt szubpopulációt különítettek el, melyek különböztek az IL-2 és a Con A által kiváltható proliferációs aktivitásukban. Feltételezték, hogy az általuk F_3-nak nevezett frakciót az a szubpopuláció alkotja, amely a thymusban rövid életű, még ott elpusztuló, éretlen T-sejtekből áll. Ezek a sejtek normális körülmények között nem hagyják el a thymust, sem Con A, sem IL-2, sem Con A + IL-2 hatásrá nem proliferálnak. További vizsgálatokra van szükség, hogy megállapítsuk, hogy valóban ilyen éretlen T-sejtek jelentek-e meg a B10→A tolerancia-indukción átesett négyhetes egerek lépében.

Kísérleteink folytatásában fontos célnak tekintjük megvizsgálni, hogy milyen immunregulációs zavarok felelősek a lymphomák halmozott megjelenéséért. Az újszülöttkori tolerancia-indukciós rendszert, különösen a B10→A törzskombinációban, alkalmasnak tartjuk e vizsgálatok elvégzésére.

5. AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

Szemiallogén (F_1) hibrid lépsejtekkel újszülöttkori transzplantációs toleranciát indukáltunk A, B10 és CBA törzsű egerekben. A tolerancia-indukciót követően lymphoma okozta halmozott elhullásra figyeltünk fel, különösen a B10→A törzskombinációban, ahol az egerek több mint 50%-a meg sem érte az egyéves kort. A toleranciakeltésen átesett egerek boncolási adatait összegyűjtve megkíséreltük meghatározni az egyes törzskombinációkra jellemző lymphoma-incidenciákat. Eszerint a B10→A kombinációban 62, a B10→CBA-ban 7,6, az A→CBA-ban 7,2, az A→B10-ben 3,6 és a CBA→A-ban 1,2%-os a lymphomák gyakorisága.

Adataink szerint a keletkezett lymphomák (legalábbis a B10→A rendszerben) nem F_1, hanem recipiens eredetűek. A szövettanilag is megvizsgált lymphomák kivétel nélkül az immunglobulin-szintézis irányába már elkötelezett, vagy már immunglobulint szekretáló B-sejtes típusúnak bizonyultak. A szekretált immunglobulinok az IgG vagy az IgM alosztályba tartoztak.

Megállapítottuk, hogy az újszülöttkori transzplantációs tolerancia-indukció eredményessége és a malignus lymphomák halmozott megjelenése nem függ szorosan össze. Ezt a következtetést a következő kísérleti eredmények alapján vontuk le.

1.) Nem találtunk összefüggést az egyes törzskombinációkban megfigyelt lymphoma incidenciák és az adott törzskombinációra jellemző, a transzplantációs tolerancia-indukció

eredményességét jelző tesztgraft túlélési idők között.

2.) A nagy lymphoma-gyakoriságú B10 → A törzskombinációban nem volt különbség a tolerancia-indukción átesett és lymphomássá vált, valamint a tolerancia-indukción ugyancsak átesett, de lymphomássá nem vált egerek tesztgraftjainak túlélési idejében. A tesztgraftok mindkét csoportban azonos ütemben és azonos arányban lökődtek ki.

3.) Az A → CBA törzskombinációban a tolerancia-indukción átesett és a tesztgraftjukat permanensen viselő egerek lépsejtjeit tovább oltva normál, ATS-sel immunszupprimált, felnőtt, szingén egerekbe ún. felnőttkori tolerancia alakul ki. A felnőttkori tolerancia sorozatosan továbbvihetőnek bizonyult, ha a lépsejteket ismételten normál, ATS-sel immunszupprimált egerekbe oltottuk. Igy az egerek kb. 40%-a mindig permanens grafttúlélésűvé vált. Eközben azonban, annak ellenére, hogy sejtdonorként csak makroszkóposan normális lépű egereket használtunk, egyre halmozottabban jelentkeztek malignus lymphomák. Az újszülöttkori toleráns egerekből történt I. passzázsban 10, az ún. felnőttkori tolerancia ismételt továbbvitelét követően 25, 35, majd 100%-ra emelkedett az egerek lymphoma okozta elhullása. Eközben a lymphomás egerek túlélési ideje is erőteljesen csökkent, azaz egyre malignusabb lymphomák jelentek meg. A lymphomássá vált és a lymphomamentes egércsoportok ebben a kísérleti rendszerben sem tértek el számottevően egymástól sem az átlagos grafttúlélési idejükben, sem pedig a toleránssá vált egerek részarányában.

A B10 → A törzskombinációban a lymphomák halmozott megjelenéséért közvetlenül nem az F_1 lépsejtszuszpenzióval esetleg átvitt onkogén vírusok által az e vírusokra érzékeny újszülött egerekben előidézett fertőzés a felelős. Kimutattuk, hogy a tolerancia-indukcióhoz használt F_1 lépsejtszuszpenzióban lévő, élő, aktív, Thy 1.2. antigént hordozó (T-)sejteknek az újszülött egerekbe való jutása feltétele az e törzskombinációban megfigyelt halmozott lymphoma-megjelenésnek. Thy 1.2. antigénnel szemben termelt alloantisavóval + komplementtel történő kezeléssel elpusztítva az inokulum T-sejtjeit, elmaradt a lymphomák halmozott jelentkezése, azonban a transzplantációs toleranciakeltés eredményesnek bizonyult: a specifikus tesztgraftok lényegesen hosszabb ideig éltek, mint az a normál A egerekben megfigyelhető volt.

Jellegzetes immunológiai elváltozásokat figyeltünk meg a B10 → A tolerancia-indukción átesett 4 hetes egereken. Annak ellenére, hogy lépükben a normális, kezeletlen egerekhez hasonló arányban vannak jelen a T-sejtek, a T-sejt mitogénnek tartott Con A csak nagyon gyenge mitogénválaszt tud kiváltani. Kísérleteinkben a B10 → A toleranciakeltésen átesett egerek lépsejtszuszpenziója általában csak a normál kontroll 5-25%-ának megfelelő timidin-inkorporációt mutatott Con A hatására. Előkísérleteinkben nem sikerült szuppresszor hatású sejtek jelenlétét kimutatni, amelyek gátolták volna a mitogén effektust, így feltételezzük, hogy a lép T-sejt összetétele szubpopulációs szinten változott meg.

A B-sejt mitogénként ismert bakteriális LPS mitogén aktivitása nem csökkent számottevően.

Kísérleteink eredményeképpen véleményünk szerint egy igen hasznos lymphoma-indukciós modellt sikerült találnunk, ami lymphomák keletkezésének és az immunregulációs zavaroknak a mélyebb összefüggéseire, valamint a praelymphomatosus állapotok kísérletes vizsgálatára adhat lehetőséget.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Végh Pálnak a bizalmat, hogy a Kísérletes Sebészeti Intézet Immunológiai Laboratóriumában dolgozhattam, és azt a nagyon sok szakmai és emberi segítséget, ami nélkül hamvában holt lett volna minden igyekezetem. Köszönöm Dr. Jánossy Tamásnak a türelmét, amivel egy zöldfülű zaklatásait elviselte és azt a sok-sok hasznos tanácsot, ismeretet, amit tőle kaptam. Köszönöm továbbá az asszisztensnőknek, mindegyikőjüknek, a nélkülözhetetlen segítségüket és a jókedvüket, amivel hasznosabbá és kellemesebbé tették a hétköznapok hosszú sorát.

Végül tisztelegni szeretnék Petri Gábor professzor úr példát állító emléke előtt.

7. IRODALOM

1. Hoover, R., Fraumeni, J.F., Jr.: Risk of cancer in renal-transplant recipients. Lancet 2: 55 (1973).

2. Sheil, A.G.R.: Cancer in renal allograft recipients in Australia and New Zealand. Transplant. Proc. 9: 1133 (1977).

3. Penn, I.: Lymphomas complicating organ transplantation. Transplant. Proc. 15: 2790 (1983).

4. Matas, A.J., Simmons, R.L., Kjellstrand, C.M., Buselmeier, T.J., Najarian, J.S.: Increased incidence of malignancy during chronic renal failure. Lancet 1: 883 (1975).

5. Louie, S., Schwartz, R.S.: Immunodeficiency and the pathogenesis of lymphoma and leukemia. Seminars in Hematol. 15: 117 (1978).

6. Blohmé, I., Brynger, H.: Malignant disease in renal transplant patients. Transplantation 39: 23 (1985).

7. Pattengale, P.K., Taylor, C.R.: Experimental models of lymphoproliferative disease. The mouse as a model for human non-Hodgkin's lymphomas and related leukemias. Am. J. Path. 113: 237 (1983).

8. Reznik-Scüller, H., Kmoch, N., Mohr, U.: Carcinogeneic effects of skin transplantation and Immuno-suppression. Z. Krebsforsch. 87: 275 (1976).

9. Burnet, F.M.: The concept of immunological surveillance. Prog. Exp. Tumor Res. 13: 1 (1970).

10. Daynes, R.A., Harris, C.C., Connor, R.J., Echwald, E.J.: Skin cancer development in mice exposed chronically to immunosuppressive agents. J. Natl. Canc. Inst. 62: 1075 (1979).

11. Kersey, J.H., Spector, B.D., Good, R.A.: Primary immunodeficiency diseases and cancer: the immunodeficiency-cancer registry. Int. J. Cancer 12: 333 (1973).

12. Banks, P.M., Witrak, G.A., Conn, D.L.: Lymphoid neoplasia following connective tissue disease. Mayo Clin. Proc. 54: 104 (1975).

13. Penn, I.: Kaposi's sarcoma in immunosuppressed patients. J. Clin. Lab. Immunol. 12: 1 (1983).

14. Krüger, G.R.F.: Concepts of lymphoma classification. J. Dermatol. Surg. Oncol. 10: 247 (1984).

15. Abbas, A.K.: Immunologic regulation of lymphoid tumor cells: Model systems for lymphocyte function. Adv. Immunol. 32: 301 (1982).

16. Aisenberg, A.C.: Cell lineage in lymphoproliferative disease. Am. J. Med. 74: 679 (1983).

17. Aftab, A., Smith, A.H.: Surface markers, antigenes and receptors on murine T and B cells. Part I. Crit. Rev. Immunol. 3: 331 (1982).

18. Aftab, A., Smith, A.H.: Surface markers, antigenes and receptors on murine T and B cells. Part II. Crit. Rev. Immunol. 4: 19 (1982).

19. Lapis K., Jenei A.: A sejtosztódás szabályozása. Akadémiai Kiadó, Budapest 1981.

20. Németh P.: Kandidátusi értekezés (kéziratban) 1985.

21. Silvers, W.K.: Definition and maintenance of inbred strains. In: Transplantation of Tissues and Cells, p. 133. (Ed. by R.E. Billingham and W.K. Silvers). The Wistar Institute Press, Philadelphia 1961.

22. Klein, J., Figueroa, F., David, C.S.: H-2 haplotypes, genes and antigens: Second lysting. II. The H-2 complex. Immunogenetics 17: 553 (1983).

23. Levey, R.H., Medawar, P.B.: Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 1130 (1966).

24. Végh P.: Antilymphocyta savók előállítása és alkalmazása a transzplantációs immunreaktivitás befolyásolására. Kandidátusi értekezés, Szeged 1981.

25. Billingham, R.E., Medawar, P.B.: The technique of free skin grafting in mammals. Brit. J. Exp. Biol. 28: 385 (1951).

26. Haughton, G., McGhee, M.P.: Cytolysis of mouse lymph node cells by alloantibody: A comparison of guinea-pig and rabbit complements. Immunology 16: 447 (1969).

27. Staats, J.: Standardized nomenclature for inbred strains of mice: Eight listing. Cancer Res. 45: 945 (1985).

28. Klein, J.: Biology of Mouse Histocompatibility-2 Complex. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1975.

29. Salvin, S., Strober, S.: Spontaneous murine B-cell leukemia. Nature 272: 624 (1978).

30. Hays, E.F., Margaretten, N., Swanson, S.K.: Spontaneous leukemia viruses: lymphoma-genic ecotropic viruses of AKR mice. J. Natl. Canc. Inst. 69: 1077 (1982).

31. Duesberg, P.H.: Activated proto-onc genes sufficient or necessary for cancer. Science 228: 669 (1985).

32. Mak, T.W., Bernstein, A.: Modulation of the haemopoietic system by murine retroviruses. Clin. Haematol. 13: 447 (1984).

33. Beverley, P.C.L., Brent, L., Brooks, C., Medawar, P.B., Simpson, E.: In vitro reactivity of lymphoid cells from tolerant mice. Transplant. Proc. 5: 679 (1973).

34. Burnet, F.M.: The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Cambridge University Press, Cambridge 1959.

35. Silvers, W.K.: The influence of removing lymphoid tissue on the persistence of tolerance of skin allografts in mice. J. Immunol. 113: 804 (1974).

36. Végh, P., Erdős, É., Jánossy, T., Petri, G.: Studies on the mechanism of transplantation tolerance. I. Do suppressor cells play a role in the induction and maintenance of neonatal transplantation tolerance? Cell. Immunol. 55: 265 (1980).

37. Jánossy, T., Végh, P., Tábith, K., Erdős, É., Petri, G.: Suppressor cells in mouse allograft tolerance. Transplant. Proc. 15: 859 (1983).

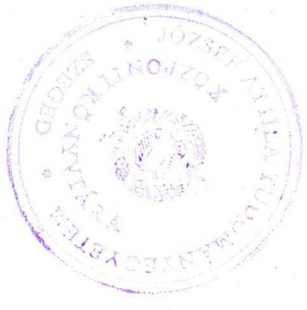
38. Malkovsky, M., Medawar, P.B.: Is immunological tolerance (non-responsiveness) a consequence of interleukin 2 deficit during the recognition of antigen? Immunology Today 5: 340 (1984).

39. Malkovsky, M., Medawar, P.B., Thacher, D.R., Toy, J., Hunt, R.: Acquired immunological tolerance of foreign cells in impaired by recombinant interleukin 2 or vitamin A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 536 (1985).

40. Jánossy, T., Erdős, É., Végh, P.: Induction of neonatal transplantation tolerance in mice: the role of H-2 complex and cell dose. Ann. Immunol. hung. 24: 255 (1984).

41. Hard, R.C. Jr., Cross, S.S., Brede, G., Montour, I.L., Carter, W.H.: Cytogenetic studies of RFM mice which are susceptible to host versus graft syndrome following perinatal inoculations of $(T_6xRFM)F_1$ spleen cells, and of T_6T_6 mice which are not. Clin. Immunol. Immunopathol. 20: 427 (1981).

42. Simpson, E., O'Hopp, S., Harrison, M., Mosier, D., Melief, K., Cantor, H.: Immunological disease induced by injecting F_1 lymphoid cells into certain parental strains. Immunology 27: 989 (1974).



43. Stephenson, P., Dorsch, S., Roser, B., Godden, U., Herbert, J.: The identity of suppressor cells in neonatal tolerance. Transplant. Proc. 15: 850 (1983).

44. Zaleski, M.B., Dubiski, S., Niles, E.G., Cunningham,R.K.: The murine thymus antigen-Thy-1. In: Immunogenetics, p. 434, (Ed. by M.B. Zaleski, S. Dubiski, E.G. Niles, R.K. Cunningham), Pitman Publishing Inc., Boston-London-Melbourne-Toronto 1983.

45. Cornelius, E.A.: Development of tumors as a result of graft-versus-host reaction. Exp. Hemat. 1: 135 (1973).

46. Ramseier, H., Lindenmann, J.: F_1 hybrid animals reactivity against recognition structures of parental strain cells. Path. et Microbiol. 34: 379 (1969).

47. Hard, R.C., Cross, S.S.: Pathology, immunology and virology of the host versus graft syndrome. Surv. immunol. Res. 2: 1 (1983).

48. Billingham, R.E., Brent, L., Medawar, P.B.: Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice. Phil. Trans. roy. Soc. London 242: 439 (1958).

49. Hard, R.C.Jr.: Hyperimmunoglobulinaemia, T-cell deficiency and plasmacytosis in RFM mice with host versus graft disease induced by the perinatal inoculations of $(T_6 \times RFM)F_1$ spleen cells. Clin. Exp. Immunol. 22: 330 (1975).

50. Green, D.R., Flood, P.M., Gershon, R.K.: Immunoregulatory T-cell pathways. Ann. Rev. Immunol. 1: 439 (1983).

51. Raybourne, R., Arnold, L.W., Haughton, G.: Perturbation of early development of the immune system by normal adult lymphoid cells. J. Immunol. 127: 1142 (1981).

52. Scudlarek, J., Radikowski, G., Cornamska, A., Dux, K., Bartosewitz, W.: Leukemias in BN/a and BN/b mice after prolonged treatment with ALG. Int. J. Canc. 18: 829 (1976).

53. Demetris, A.J., Nalesnik, A.M., Kunz, H.W., Gill, T.J.,III, Shinozuka, H.: Sequential analyses of the development of lymphoproliferative disorders in rats receiving cyclosporine. Transplantation 38: 239 (1984).

54. Hirsch, M.S., Black, P.H., Tracy, G.S., Leibowitz, S., Schwartz, R.S.: Leukemia virus activation in chronic allogeneic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67: 1914 (1970).

55. Frizzera, G., Hanto, D.W., Gajl-Peczalska, K.J., Rosai, J., McKenna, R.W., Sibley, R.K., Holahan, K.P., Lindquist, L.L.: Polymorphic diffuse B-cell hyperplasias and lymphomas in renal transplant recipients. Cancer Res. 41: 4262 (1981).

56. Hanto, D.W., Frizzera, G., Gajl-Peczalska, K.J., Balfour, H.H.,Jr., Simmons, R.L., Najarian, J.S.: Acyclovir therapy of Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative diseases. Transplant. Proc. 17: 89 (1985).

57. Lee, R.E.: How viruses suppress immunity? Can. Med. Assoc. J. 131: 1437 (1984).

58. Nishimura, T., Kozutsumi, H., Hashimoto, Y.: Different response of mouse thymocyte subpopulations to interleukin 2 and Concanavalin A. Thymus 6: 235 (1984).