

TUMORRAL SZEMBENI REZISZTENCIA KELTÉSE ÉS A REZISZTENCIA
ÖSSZEFÜGGÉSE A KÉSŐI TÍPUSÚ TÚLÉRZÉKENYSÉGGEL

EGYETEMI DOKTORI DOLGOZAT

Írta
Gyuris Tibor

Szeged

1985



TARTALOMJEGYZÉK

oldal

1. BEVEZETÉS	1
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
2.1. Kísérleti állatok	7
2.1.1. Egerek	7
2.1.2. Nyulak	7
2.2. Tápfolyadékok és egyéb anyagok	7
2.3. Az antithymocýta savó (ATS) készítése	9
2.4. Az A/Ph MC.S1. tumor indukciója és fenntartása	9
2.5. A tumorsejtszuspenzió készítése	10
2.6. A tumorsejtek ultrahangos feltárása	10
2.7. A tumorsejtek mitomycin C-vel való kezelése	11
2.8. A tumornövekedés regisztrálása	12
2.9. A lokális késői típusú túlérzékenységi (DTH) reakció mérése lábmegvastagodási teszttel	13
3. EREDMÉNYEK	15
3.1. Az A/Ph MC.S1. tumor immunogenitása	15
3.1.1. A tumorsejtek előkészítése az immunizáláshoz .	15
3.1.2. A tumorról szembeni rezisztencia előkezelt tumorsejtszuspenziókkal immunizált egereken	18
3.1.3. A feltárt tumorsejtekkel keltett rezisztencia tartóssága	21
3.1.4. A feltárt tumorsejtekkel keltett rezisztencia függése az immunizálás helyétől	23
3.1.5. A feltárt tumorsejtek immunterápiás hatása tumoros egerekben	25
3.2. Az A/Ph MC.S1. tumorról szembeni lokális DTH reakció	28
3.2.1. A regresszor állatok lokális DTH reaktivitása,	28
3.2.1.1. A lokális DTH reakció dinamikája	28
3.2.1.2. A lokális DTH reakció tartóssága regresszor egereken	31
3.2.1.3. A lokális DTH reakció fokozhatósága regresszor egereken	34

3.2.2. A tumoros állatok lokális DTH reaktivitása	34
3.2.2.1. A lokális DTH reakció nagysága a tumoroltás utáni különböző időpontokban ..	34
3.2.2.2. A lokális DTH reakció prediktív értéke a tumoros állatokon	37
3.3. Az A/Ph MC.S1. tumorról szembeni szisztémás DTH reakció	39
3.3.1. A szisztémás túlérzékenységi reakció jelensége és kiválthatóságának körülményei .	39
3.3.2. A szisztémás és lokális DTH reakció összefüggése valamint antithymocytasavóval (ATS) való befolyásolhatóságuk	44
4. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	48
4.1. Osztódásukban gátolt és feltárt tumor-sejtek immunogenitása	48
4.2. A tumorról szembeni rezisztencia és a lokális DTH reakció összefüggése	52
4.3. A szisztémás és lokális DTH reakció összefüggése	57
5. ÖSSZEFOGLALÁS	60
6. IRODALOMJEGYZÉK	62

1. BEVEZETÉS

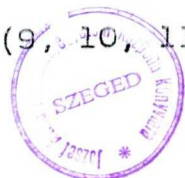
A daganatos megbetegedéseket már igen korán megpróbálták "immunológiai" módszerekkel gyógyítani. Jenner felfedezését követően, aki pusztán tapasztalati alapon készítette a himlő ellen hatásos vakcinát, hasonlóan az immunrendszer és az immunológiai törvényszerűségek ismerete nélkül már a múlt században megkísérelték a daganatos betegeket tumorkivonatokkal végzett immunizálással megmenteni (1). Néhány esetben a siker teljes volt, a betegek meggyógyultak, sok esetben azonban éppen ellenkező hatást értek el, a daganatok növekedése meggyorsult. E kudarcok okának kiderítéséhez hiányoztak az ismeretek, így a tumorról szembeni "immunizálás" ötlete egy időre feledésbe merült.

Századunk elején, amikor kezdték feltárni az immunológia alapvető törvényszerűségeit, a daganatos betegségek immunológiai vonatkozásai is az érdeklődés előterébe kerültek. Megfigyelték ugyanis, hogy ha az egyik állat tumorát a másik állatba átoltották, az abban megfogant daganat sokszor átmeneti növekedés után visszafejlődött. Ha a recipienst előzetesen immunizálták a tumorról szemben, a daganat gyorsabban löködött ki. A kísérleteket azonban random tenyésztett állatokon végezték, nem voltak izogén állattörzsek, nem tudták, hogy léteznek hisztokompatibilitási antigének, és nem ismerték a transzplantációs immunitás legelemibb törvényszerűségeit sem (2). Nemsokára kiderült, hogy a normál szövet ugyanígy kilökődik, így a daganatok visszafejlődésekor az immunválasz sokkal inkább az

ezeken is meglévő transzplantációs antigének ellen irányul és nem pedig a tumorantigének ellen. Ez megint csalódást okozott, és a "tumorimmunológia" egy időre ismét mellőzötté vált.

A tumorimmunológia a tumorspecifikus transzplantációs antigének létezésének kísérletes bizonyítását (3) és az immunológiai surveillance hipotézisének kidolgozását követően foglalta el véglegesen a helyét a modern tudományok között. Ehrlich volt az, aki ennek az elméletnek a magvát elültette (4), majd az ötvenes években Thomas gondolt arra, hogy a bonyolult hisztokompatibilitási antigénrendszer és azok a reakciók, amelyek ellene irányulnak, azért léteznek, hogy megvédjék a szervezetet a daganatok ellen (5). Burnet pontosította és kiterjesztette ezeket az elképzeléseket (6). Eszerint a szervezetben az állandóan keletkező malignusan transzformált sejtek antigenitása eltér azokétól a normális sejtektől, amelyekből származtak, és a gazda immunrendszere, amely a thymus-dependens limfociták révén folyamatosan ellenőrzi a szervezetet, az újonnan létrejött, idegen antigenitású daganatsejteket elpusztítja. Ez a hipotézis a daganatkutatás új távlatait nyitotta meg.

Elmondhatjuk azonban, hogy az immunológiai surveillance elmélet létrejöttét követően a tumorimmunológiához fűzött túlzott lelkesedés napjainkra már elült, nem sikerült ugyanis a daganatok keletkezésének, gyógyításának alapvető problémáit immunológiai úton megoldani. Ugyanakkor az e területen végzett intenzív kutatások eredményeként nyilvánvalóvá vált, hogy a legkülönbözőbb állati (3, 7, 8), és emberi tumorok (9, 10, 11)



antigenitással rendelkeznek, amelyek a tumorra szemben, sőt a tumor védelmében (12, 13, 14) működő immunválaszok széles skáláját képesek indukálni. Ha ma már bizonyosra is vehető, hogy a Burnet teória eredeti formájában nem tekinthető általános érvényűnek, még mindig fennáll annak a lehetősége, hogy más, nem a T-sejtek közreműködésén alapuló surveillance mechanizmus működik (15).

A daganatos betegségek rendkívüli heterogenitása miatt sok minden tisztázatlan még ezen a téren. Ez adta az indítékot arra, hogy Intézetünk, amelynek jól megalapozott transzplantációs immunológiai hagyományai vannak, bekapcsolódjon a tumor-immunológiai kutatásokba. A dolgozatomban tárgyalt munkáinknak az volt a fő célkitűzése, hogy állatkísérletes körülmények között a tumorok immunogenitását, a velük szemben fellépő immunológiai reakciókat és azok összefüggéseit próbáljuk pontosabban megismerni, valamint ezen ismeretek birtokában a tumor-ellenes immunválaszt megkíséreljük befolyásolni, fokozni. Ehhez jól kidolgozott modellekre van szükség. Vizsgálatainkat izogén egértörzsek segítségével kialakított szingén tumor-gazda rendszerben végezzük, amelynek lényege, hogy a tumor és a gazdaszervezet közötti antigénkülönbség a tumorantigénekre korlátozódik, és így legalábbis immunológiai szempontból alkalmasak a humán daganatok modellezésére is. Ezenkívül előnyük, hogy nagyszámú, könnyen reprodukálható vizsgálatot tesznek lehetővé. A dolgozatomban összefoglalt eredmények egy ilyen, metil-kolantrénnel A törzsű egérben indukált és in vivo, ascites formában fenntartott szingén egérsarcomán (A/Ph MC.S1.) alapuló

tumortranszplantációs rendszerben végzett kísérletekre épülnek.

Az A/Ph MC.S1. fibrosarcoma vonalat a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Immungenetikai Munkacsoportjában hozták létre és főbb immunbiológiai tulajdonságait Intézetünk Immunológiai Munkacsoportjával együtt tanulmányozták (16, 17, 18). Megállapították, hogy élő tumorsejtek oltását követően, alacsony sejtdózisok alkalmazásakor az állatok egy részén nem ered meg a tumor (tumornegatív állatok), s még viszonylag magas sejtdózisok bevitele esetén is a tumorossá vált állatok jelentős részén a tumor átmeneti növekedés után regrediál (regresszor állatok). A tumornegatív és a regresszor egereken a tumor újraoltásakor igen erős tumorrall szembeni rezisztencia mutatható ki, ami arra utal, hogy ennek a tumornak - a kémiai indukált tumorok többségéhez hasonlóan - van tumorhoz asszociált transzplantációs antigénje (TATA), és ez meglehetősen erősnek tűnik (18).

Nem tisztázták azonban, hogy e tumor TATA-jának erős immunogenitása az ép, élő, osztódóképes tumorsejtek beviteléhez kötött-e vagy sem. Osztódásukban gátolt tumorsejtek (19) és szubcelluláris tumorsejtszármazékok (20, 21) rezisztenciakeltő képességére találhatunk ugyan adatokat az irodalomban, de összehasonlító, elemző vizsgálatok nem történtek, különösen olyan tekintetben nem, hogy ezek immunogenitása hogyan viszonyul az élő tumorsejtekéhez. Megoszlanak a vélemények az ilyen preparátumok immunterápiás hatását illetően is (22, 23). E kérdéseknek mind elméleti, mind gyakorlati jelentőségét figyelembe véve, kísérleteink egy részében ezekre kerestük a választ. Ebből a

célból osztódásukban gátolt tumorsejtekkel, illetve ultrahanggal feltárt tumorsejtszuszpenzióval kíséreltük meg immunizálni az állatokat, továbbá adatokat próbáltunk nyerni az így kialakítható immunitás jellegéről. Külön figyelmet fordítottunk arra, hogy a progresszív tumornövekedést feltárt tumorsejtekkel vissza lehet-e fordítani, azaz a tumoros állatok sorsát immunterápia révén tudjuk-e befolyásolni.

Zákány és mtsai (18) az A/Ph MC.S1. tumorra szembeni rezisztencia mechanizmusára vonatkozó vizsgálataik során megállapították, hogy abban elsősorban celluláris immuntényezők játszanak szerepet. Megfigyelték, hogy a regresszor egerekből származó limfoid sejtek erős tumornövekedést gátló hatásúak és ez a T-limfocitákhoz kötött. A regresszor egerek újraoltását követően a tumorban már igen korán jelentős mértékű makrofág-infiltrációt észleltek. A makrofágokra nézve toxikusnak tartott carrageenan-kezeléssel a tumornövekedést fokozni lehetett. A regresszor egerek nyirokcsomósejtjei a daganatsejtek jelenlétében a makrofágok migrációját gátló faktort termeltek, és az ilyen állatokban lokális késői típusú túlérzékenységi (a szakirodalomban elfogadott rövidítése: DTH) reakciót lehetett kiváltani. Ezen eredmények alapján felvetődik, hogy az A/Ph MC.S1. tumorra szembeni rezisztenciában egy limfokintermelő T-sejtpopuláció által közvetített, makrofágfüggő immunválasz, a DTH reakció játszhat szerepet.

A DTH jelenlétét kimutatták a fertőző betegségekkel szembeni védettségben (24), és mint effektor mechanizmus szerepelhet az allograftrejekcióban (25), valamint a tumorokkal szembeni

rezisztenciában is. A tumorantigénekkal szemben kiváltható DTH reakciót patkányokban (26), tengerimalacokban (27) és egerekben (28, 29) már a 60-as évek végén leírták, s nem sokkal később daganatos betegeken kapott hasonló eredményekről is beszámoltak (30). E korai vizsgálatok, valamint a különböző szerzők által kapott további eredmények (31, 32) alapján azonban nem alakult ki egységes elképzelés arra vonatkozóan, hogy van-e összefüggés a tumorról szembeni rezisztencia és a DTH között. A saját kísérleti rendszerünkben tapasztaltak (miszerint a regresszor egereken kiváltható a DTH reakció), valamint az egymásnak ellentmondó irodalmi adatok ösztönöztek bennünket arra, hogy ezzel kapcsolatban további vizsgálatokat végezzünk. Ezentúl arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a tumorantigénnel szembeni DTH reakció kiváltható-e a tumoros állatokon is. Fokozottan figyeltünk arra, hogy a DTH reakció nagysága kapcsolatba hozható-e a tumoros állatok további sorsával, azaz a DTH reaktivitás meghatározása révén meg tudjuk-e előre "jósolni" a daganatos betegség kimenetelét.

Kísérleteink során szisztémás túlérzékenységi reakciót is megfigyeltünk az A/Ph MC.S1. tumorról szemben. Ez a sok esetben elhullásokhoz is vezető reakció az egerek hiperimmunizálása során alakult ki. Ezt a jelenséget időbeli fellépése és lefolyása, valamint antithymocyta savóval való gátolhatósága alapján DTH reakciónak tartjuk. Tumorantigénekkal szembeni szisztémás DTH reakcióról tudomásunk szerint eddig még nem számoltak be az irodalomban.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Kísérleti állatok

2.1.1. Egerek

Kísérleteinket az Intézetünkben tenyésztett izogén A, CBA, valamint az MTA SZBK Központi Állatházából beszerzett A/Ph egértörzseken végeztük. Az egerek a LATI (Gödöllő) által előállított konvencionális egértápot és csapvizet fogyasztanak ad libitum. Az egértörzsek izogenitását a Silvers-féle körbegráftolási módszerrel (33) két évente ellenőrizzük. Az A egértörzs két alvonala (A és A/Ph) a körbegráftolási teszt alapján izogén.

2.1.2. Nyulak

Egy helyi tenyészetből beszerzett 2-4 kg-os újjélandi fehér nyulakat használtunk. Az állatokat a felhasználás előtt saját állatházunkban legalább 10 napig megfigyelés alatt tartottuk és a LATI által forgalomba hozott nyúltáppal és csapvízzel (ad libitum) tápláltuk.

2.2. Tápfolyadékok és egyéb anyagok

Eagle-féle MEM (Hanks' alapú minimálisan szükséges tápfolyadék;
GIBCO, USA; 0,35 g/l NaHCO_3 -tal kiegészítve)
RPMI 1640 (szövettenyésztő tápfolyadék; GIBCO, USA; 10 mmol
HEPES-sel /GIBCO, USA/, 2 g/l NaHCO_3 -tal,

2×10^{-5} mmol 2-merkaptóetanollal (Sigma, USA),
100 NE/ml penicillinnel, 100 ug/ml streptomycin-
nel és 10% főtális borjúsavóval /FCS, HUMAN,
56°C-on 30 percig dekomplementálva/ kiegészítve)

A fentiek por alakban kiszerelt médiumok, amelyeket háromszor
desztillált vízben oldunk fel. A tápfolyadék pH-ját 7,3-ra
állítjuk be, és 0,2 um pórusátmérőjű Millipore membránszűrőn
sterilre szűrjük. A kész tápfolyadékot hűtőszekrényben tároljuk.

Komplement (HUMAN, liofilezett tengerimalac komplement)

Mitomycin C (Sigma, USA)

^3H -timidin (^3H -metil-timidin, UVVVR, Csehszlovákia)

Whatman GF/C filterpapír

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)

NaCl (Reanal, a.lt.)

A tripánkékből 0,14%-os, a NaCl-ből 4,25%-os törzsoldatot
készítünk háromszor desztillált vízben, és ezek-
ből a felhasználás előtt 4:1 arányú keveréket
készítünk.

Türk-oldat (BIOGAL)

Mertiolát (Etilmerkuri-tioszalicilsav Na-sója, SERVA, NSZK;
1%-os törzsoldat fiziológiás sóoldatban)

1 N NaOH (Flow Laboratories, Anglia)

1 N HCl (Flow Laboratories, Anglia)

2.3. Az antithymocyta savó (ATS) készítése

Az ATS-t nyulakban termeltük CBA thymussejtekkel történt immunizálásokkal Levey és Medawar (34) Végh által módosított módszere alapján (35). A nyulakat 3×10^7 CBA thymussejttel oltottuk iv testsúlykilogramonként két alkalommal, két hét különbséggel. A második immunizálás után egy héttel a nyulakat elvéreztettük, vérüket összegyűjtöttük és hagytuk megalvadni. Az alvadékot 1-2 óra múlva leválasztottuk a cső faláról, majd egy éjszakán át hűtőszekrényben állni hagytuk. Az így nyert savót először 620g-vel, majd 970g-vel 10-10 percig centrifugáltuk. A tiszta savót 56°C -on 30 percig dekomplementáltuk, majd konzerválás céljából 1%-os mertiolát törzsoldatból 1 térfogat-százaléknyi mennyiséget adtunk hozzá és -20°C -on tároltuk. Az így készült ATS immunszuppresszív hatása erős volt, $2 \times 0,5$ ml dózisban sc alkalmazva a bőr allograftok túlélési idejét H-2 antigénekben eltérő donor-recipiens törzskombinációkban ($A \rightarrow CBA$, $CBA \rightarrow A$) több mint kétszeresére fokozta.

2.4. Az A/Ph MC.S1. tumor indukciója és fenntartása

A tumorindukciót az MTA SZBK Genetikai Intézetének Immun-genetikai Munkacsoportja végezte el 1976-ban A/Ph nőstény egerekbe 0,5 mg metilkolantrént oltva im. Egy egérből progresszív növekedést mutató tumort (A/PH MC.S1.) izoláltak. A daganatot a szingén egerekben történt ötszöri sc átoltást követően ascitesben is növekvő tumorrá alakították át (16).

A tumort A szingén, normál, felnőtt, nőstény egerekben tartjuk fenn ascites formában 1-2 hetenként történő ip átoltásokkal. Az A/Ph MC.S1. tumor szövettanilag fibrosarcoma (17), amely sc szolid tumorként, ascitesben egyes sejtekből álló szuszpenzióként nő.

2.5. A tumorsejtszuszpenzió készítése

Az ip átoltás utáni 5-10. nap között a donor állatot elvéreztettük, az állat hasát 70%-os alkohollal dezinficiáltuk, majd a bőrt lehúztuk. A hasüri folyadékot tápfolyadékkal hígítva leszívtuk, majd 4 rétegű gézen 20 ml-es centrifugacsőbe szűrtük. Az így nyert szuszpenziót ettől kezdve 0-4°C-on tartottuk. A szuszpenziót 55g-vel 5 percig centrifugáltuk (K23, Janetzki, NDK). Az üledéket friss tápfolyadékban reszuszpéndáltuk, majd még kétszer mostuk. Bürker-kamrában történt sejtszámolás alapján meghatároztuk a sejtkoncentrációt és a tripánkék festékkizárásos módszerrel a vitalitást, majd beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt. A kísérletekhez csak olyan szuszpenziókat használtunk fel, amelyeknek a vitalitása meghaladta a 85%-ot. Az esetek túlnyomó többségében 95% feletti vitalitásúak voltak a tumorsejtszuszpenziók.

2.6. A tumorsejtek ultrahangos feltárása

Az előkészített, 5×10^7 /ml koncentrációra beállított és 0°C-ra hűtött tumorsejtszuszpenziót MSE PG-120 típusú ultrahangos

dezintegrátorba helyeztük úgy, hogy a dezintegrátor fejrésze a szuszpenzió felszínéhez érjen. Az ultrahangkezelést 2x1 percig folyamatos hűtés mellett alkalmaztuk a legerősebb fokozatban (amplitúdó 16-20 μm). A lizátum pH-ját 7,3-ra állítottuk be. A dezintegrálás hatékonyságát mikroszkóppal ellenőriztük, és megállapítottuk, hogy nem maradt benne élő, integrált tumorsejt. Egyes kísérletekhez az ultrahanggal feltárt lizátumot, majd annak felülúszóját centrifugáltuk. A centrifugálást mindkét esetben 10'000 g-vel 20 percig 4°C-on végeztük és az így nyert, durva részecskéktől mentes áttetsző felülúszót gyűjtöttük.

2.7. A tumorsejtek mitomycin C-vel való kezelése

A tumorsejtekből 10% FCS-t tartalmazó MEM-ben $10^7/\text{ml}$ koncentrációjú szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziókhoz 0,5 mg/ml koncentrációjú mitomycin C törzsoldatból mértük a megfelelő mennyiséget. Kétféle mitomycin-kezelést alkalmaztunk. A $10^7/\text{ml}$ koncentrációjú tumorsejtsuszuszpenzióhoz 50 μg mitomycint adtunk ml-enként, majd 30 percig 37°C-on inkubáltuk. A másik esetben az ugyanilyen töménységű sejtsuszuszpenzióhoz 100 μg mitomycint adtunk ml-enként és 100 percig 37°C-on inkubáltuk. Az inkubálás után FCS-mentes tápfolyadékkal kihígítottuk a szuszpenziót, majd 150 g-vel 5 percig 20°C-on centrifugáltuk. A sejteket ezután még kétszer mostuk. Meghatároztuk a sejtszámot és a vitalitást, majd a szuszpenziót a kívánt koncentrációra állítottuk be. Az így kezelt tumorsejteket

egyrészt in vivo kísérletekben használtuk fel, másrészt az in vitro DNS szintézisüket vizsgáltuk. Az in vitro vizsgálatokhoz a sejtsuszpenziókat FCS-tartalmú RPMI 1640 tápfolyadékban vettük fel, és a LINBRO gyártmányú, szövettenyésztésre alkalmas mikrotitráló lemezre lyukanként 200 μ l térfogatban 2×10^4 , illetve 2×10^5 élő tumorsejtet mértünk. Egy-egy kísérletben 10-12 párhuzamos mintát alkalmaztunk. A tumorsejtek mitotikus aktivitását tríciummal jelölt timidinnek a sejtekbe való beépülésével jellemeztük: a mikrotitráló lemezre való bemérés után 1 μ Ci 3 H-timidint adtunk minden mikrokultúrához és 18 órán keresztül 5% széndioxiddal dúsított levegőjű, 100% relatív páratartalmú termosztátban (Heraeus B 5060 EC/CO₂, NSZK) 37°C-on inkubáltuk. Az inkubálás után a kultúrákat a mikrotitráló lemezről házi készítésű harveszterrel Whatman GF/C filterre vittük át, és a lemezt lyukanként 10-10 ml fiziológiás sóoldattal mostuk. A filteren lévő sejteket 120°C-on szárítószekrényben 60 percig fixáltuk és víztelenítettük, majd az egyes mikrokultúrák sejtjeit hordozó szűrőpapírkorongokat Wheaton gyártmányú szcintillációs üvegküvetákba helyeztük, majd 4-4 ml szcintillációs koktélt mértünk rájuk. A minták aktivitását Beckman gyártmányú, LS-100C típusú szcintillációs spektrofotométerrel mértük. A minták aktivitását a mért cpm (beütés/perc) értékekkel jellemeztük.

2.8. A tumornövekedés regisztrálása

Az élő tumorsejtek sc oltása után az állatokat hetente

kétszer megvizsgáltuk a tumorok megeredési arányának meghatározása és a megjelent tumorok növekedésének nyomonkövetése céljából. A tumorok két átmérőjét - a legnagyobbat és az armerőlegeset - mértük, amelyekből átlagot számoltunk, és ezzel jellemeztük a tumor méretét az adott időpontban. Az ily módon egy mérési időpontban kapott tumorméreteknak a kísérleti csoportra jellemző átlagát és standard errorját kiszámoltuk. Az elhullásokat napi pontossággal regisztráltuk. Az elhullásoknak és a tumorok visszafejlődésének (a regresszióknak) az átlagos idejét ($\pm$ standard error) és %-os arányát vettük figyelembe az értékelésnél. Az élő tumorsejtek ip oltását követően csak az elhullások időpontját regisztráltuk, és az eredményeket az elhullások %-os arányai és az átlagos túlélési idők alapján értékeltük. Az átlagos túlélési, illetve a regressziós idők statisztikai összehasonlítására a Student-féle kétmintás t próbát, a mortalitás és a regresszió arányainak elemzésére pedig a χ^2 próbát alkalmaztuk. Statisztikailag szignifikánsnak azokat az eltéréseket tekintettük, amikor p értéke kisebbnek bizonyult 0,05-nál.

2.9. A lokális késői típusú túlérzékenységi (DTH) reakció mérése lábmegvastagodási teszttel

A lokális DTH reakció kiváltásához antigénpreparátumként ultrahanggal feltárt tumorsejtszuspenziót használtunk. A 10^6 feltárt tumorsejtet 20 ul térfogatban, 30-as tűvel, 100 ul-es Hamilton-fecskendővel oltottuk az egerek bal lábának dorsalis

oldali bőre alá. A jobb lábba 20 μ l MEM-et oltottunk "oltási" kontrollként a tumorsejtszuspenzió készítéséhez használt tápfolyadékból. Az oltások előtt közvetlenül, valamint az oltások után 6, 24, 48 és 72 órával mértük az állatok mindkét oldali lábvastagságát mérnöki mikrométercsavarral ($\pm 0,01$ mm hiba). A szubjektív hiba csökkentése céljából a csoportokat előzetesen kódoltuk, és a méréseket mindig ugyanaz a személy végezte. A lábmegvastagodást a kiinduló érték %-ában adtuk meg. A DTH reakció értékelésekor a nem immunizált, normál állatok tumor-antigén-preparátum okozta nem specifikus lábmegvastagodását tekintettük kontrollnak. A lokális DTH reakció intenzitásának jellemzésére használt specifikus lábmegvastagodás %-os értékét ennek figyelembevételével a következő módon számoltuk ki:

$$\left[\frac{\text{vastagodás}}{\text{kiinduló lábvastagság}} \times 100 \right]_{\text{kísérleti}} - \left[\frac{\text{vastagodás}}{\text{kiinduló lábvastagság}} \times 100 \right]_{\text{kontroll}}$$

Az egyedi értékeket átlagoltuk, kiszámoltuk a standard errorrt, és a statisztikai elemzésre a Student-féle kétmintás t próbát használtuk. A különbségeket itt is csak akkor tekintettük szignifikánsnak, ha p érték kisebb volt 0,05-nál.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Az A/Ph MC.S1. tumor immunogenitása

3.1.1. A tumorsejtek előkészítése az immunizáláshoz

Előkísérleteinkben ellenőriztük a tumorsejtszuspenziók kezelésére használt eljárások hatékonyságát in vitro és in vivo körülmények között. A tumorsejtek osztódásának gátlására kétféle mitomycin C-kezelést alkalmaztunk, amelyeknek az in vitro DNS szintézisre kifejtett hatását az I. táblázatban foglaltuk össze. Az enyhébb mitomycin-kezelés hatására a tumorsejtek in vitro DNS szintézise 54-60 %-kal csökkent. A kezelt szuspenzióból 10^6 élő tumorsejtet szingén egerekbe sc oltva valamennyi állaton megeredt a tumor, majd átmeneti növekedés után igen rövid idő alatt regrediált (lásd a II. táblázatban). Ez a mitomycin-kezelés tehát, az in vitro és in vivo eredmények alapján, csak részlegesen gátolta a tumorsejtek osztódóképességét.

A II. táblázatban feltüntettük a különböző számú kezeletlen élő tumorsejt sc oltását követő tumornövekedést is. 10^6 élő tumorsejt beoltása után minden állaton megindult a tumornövekedés és közel háromnegyed részük a tumortól elhullott. Ezerszer kevesebb, azaz 10^3 tumorsejttől is az állatoknak közel a felén megjelent a tumor, sőt néhány százalékuk el is pusztult. A mitomycinnel osztódásukban részlegesen gátolt tumorsejtek oltását követően megeredt tumorok igen rövid ideig tartó növekedése és gyors regressziója arra utal, hogy a kevésbé

I. táblázat. Mitomycin C-kezelés hatása a tumorsejtek in vitro timidin felvételére

	Kezeletlen	Mitomycin C-kezelt			
		50 ug MC, 30 perc ^o		100 ug MC, 100 perc ^x	
Tumorsejt/kultúra	CPM $\pm$ SE	CPM $\pm$ SE	Gátlás ⁺⁺ %	CPM $\pm$ SE	Gátlás ⁺⁺ %
<u>2x10⁴</u>					
A) kísérlet	81221 $\pm$ 2822	37222 $\pm$ 1146	54,2		
B) kísérlet	151244 $\pm$ 2811			1332 $\pm$ 26	99,1
<u>2x10⁵</u>					
A) kísérlet	196144 $\pm$ 3043	82912 $\pm$ 1352	57,7		
B) kísérlet	305322 $\pm$ 6152			10396 $\pm$ 247	96,6
C) kísérlet	247709 $\pm$ 6189	99083 $\pm$ 1424	60,0	5677 $\pm$ 308	97,7

⁺⁺a kezeletlen tumorsejtkultúrákban mért CPM %-ában

^o10⁷ élő tumorsejtet 50 ug mitomycin C-vel 30 percig 37°C-on inkubáltunk

^x10⁷ élő tumorsejtet 100 ug mitomycin C-vel 100 percig 37°C-on inkubáltunk

II. táblázat. Tumornövekedés kezeletlen, mitomycin C-vel blokkolt, illetve ultrahanggal feltárt tumorsejtekkel sc oltott szingén egerekben

Tumorsejtdózis	Incidencia (%)	Mortalitás (%)	Átl. túlélés +SE (nap)	Regresszió %	Átl. regressziós idő +SE (nap)
<u>Kezeletlen</u>					
10^3	18/45 (40)	3/45 (7)	71,0 $\pm$ 11,0	15/45 (33)	63 $\pm$ 6,9
10^4	24/25 (96)	5/25 (20)	65,0 $\pm$ 9,8	19/25 (76)	44 $\pm$ 4,8
10^5	20/20 (100)	5/20 (25)	73,2 $\pm$ 11,4	15/20 (75)	39 $\pm$ 6,5
10^6	120/120 (100)	88/120 (74)	45,3 $\pm$ 2,9	32/120 (26)	48 $\pm$ 4,7
<u>Kezelt</u>					
10^6 MC-részleges ⁺	15/15 (100)	0/15 (0)	-	15/15 (100)	13 $\pm$ 0,5
10^6 MC-teljes ⁺	0/15				
10^6 UH-feltárt ⁺⁺	0/35				

⁺ 10^6 élő, mitomycin C-vel osztódásukban részlegesen, illetve teljesen gátolt tumorsejtek

⁺⁺ 10^6 tumorsejteknek megfelelő mennyiségű ultrahangos lizátum

hatékony mitomycin-kezelés nem egyszerűen az osztódóképes tumorsejtek számát csökkentette a felére, hiszen ilyen rövid idő alatt lezajló tumornövekedést és regressziót a kezeletlen tumorsejtekkel oltott állatokon egyetlenegy dózis (még a leg-alacsonyabb) esetén sem tapasztaltunk (lásd a II. táblázatban).

Az erőteljesebb mitomycin-kezeléssel a tumorsejtek in vitro DNS szintézisét 97-99 %-kal sikerült csökkentenünk (lásd az I. táblázatban). Ha az így blokkolt tumorsejtsuszpenzióból 10^6 élő sejtet oltottunk az egerek hátbőre alá, a tumorok egyáltalán nem nőttek ki. Ezzel a mitomycin-kezeléssel tehát a tumorsejtek osztódóképességének gyakorlatilag teljes gátlását sikerült elérnünk (lásd a II. táblázatban).

Ha 10^6 tumorsejtnek megfelelő mennyiségű ultrahangos lizátumot oltottunk sc az egerekbe ugyancsak egyetlenegy esetben sem tapasztaltunk tumornövekedést (lásd a II. táblázatban).

3.1.2. A tumorrall szembeni rezisztencia előkezelt tumorsejtsuszpenziókkal immunizált egereken

Az előző fejezetben ismertetett kezeléseken átesett tumorsejtsuszpenziókkal megkíséreltünk színgén egereket sc immunizálni annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy lehet-e rezisztenciát kelteni osztódásukban gátolt, illetve feltárt tumorsejtekkel. Ebből a célból egymástól független egércsoportok egyedeit 10^6 élő, osztódásában részlegesen, illetve teljesen gátolt tumorsejttel, továbbá 10^6 tumorsejtnek megfelelő mennyiségű ultrahangos lizátummal, valamint ez utóbbi tisztított felülúszójával immunizáltuk. A rezisztencia "tesztelése"

céljából 10^6 élő tumorsejttel oltottuk az állatokat sc az immunizálás után két héttel. A III. táblázatban a "teszt" tumorsejtdózis okozta tumorincidenciát és mortalitást, az állatok túlélési idejét, a regressziók arányát, valamint az átlagos regressziós időket tüntettük fel. A "teszt" dózis által normál, kezeletlen egereken előidézett 100%-os tumorincidenciát az immunizálások egyike sem volt képes befolyásolni, egy kivételével minden állaton megjelent a tumor. Megfigyelhető viszont, hogy a mortalitás valamennyi immunizált csoportban jelentősen csökkent (kontroll: 74%; immunizált csoportok: 0-26%), ami a regressziók arányának növekedésével járt együtt. A különbség a kontroll és minden egyes immunizált csoport között szignifikáns. Az immunizált csoportok túlélő egerein a tumorok szignifikánsan gyorsabban fejlődtek vissza: az átlagos regressziós idő a kontroll egereken észlelt 48 napról 24-36 napra rövidült. A tumoral szembeni rezisztencia legerősebb fokozását az osztódásukban részlegesen gátolt tumorsejtekkel sikerült elérnünk. Ebben a csoportban az élő tumorsejtekkel végzett újraoltás egyetlen elhullást sem idézett elő, s a tumorok átlagos regressziós ideje is itt volt a legrövidebb. A mortalitás a tisztított lizátummal immunizált csoportban volt a legmagasabb, de az elhullások általában később következtek be, mint a kontroll csoportban.

III. táblázat. Tumorra szembeni rezisztencia osztódásukban gátolt, illetve feltárt tumor-sejtekkel sc immunizált egereken^x

Immunizálás	Incidencia (%)	Mortalitás (%)	Túlélés (nap)	Regresszió %	Átl.regressziós idő $\pm$ SE (nap)	
-	120/120 (100)	88/120 (74)	45,3 $\pm$ 2,9 ^o	32/120 (26)	48 $\pm$ 4,7	
MC-részleges ⁺	17/18 (94)	0/18 (0)	-	17/18 (94)	24 $\pm$ 2,2	
MC-teljes ⁺	15/15 (100)	1/15 (7)	66;	14/15 (93)	30 $\pm$ 2,0	1
UH-feltárt ⁺⁺	20/20 (100)	2/20 (10)	18; 24;	18/20 (90)	36 $\pm$ 5,2	20
UH-feltárt, ⁺⁺ tisztított	15/15 (100)	4/15 (26)	28; 91; 95; 96;	11/15 (74)	35 $\pm$ 1,9	1

^xa rezisztencia tesztelése 2 héttel az immunizálás után 10^6 élő tumorsejt sc oltásával történt

⁺ 10^6 élő, mitomycin C-vel osztódásában részlegesen, illetve teljesen gátolt tumorsejttel immunizált egerek

⁺⁺ 10^6 tumorsejtnek megfelelő mennyiségű, tisztított, illetve tisztított lizátummal immunizált egerek

^oátlagos túlélés $\pm$ SE

3.1.3. A feltárt tumorsejtekkel keltett rezisztencia tartóssága

Az előző fejezetben leírt vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a feltárt tumorsejtekkel sc oltott állatokban az immunizálás után két héttel jelentős fokú tumorról szembeni védettség mutatható ki. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az így keltett rezisztencia hasonlóképpen tartós-e, mint azt a korábbiakban az élő tumorsejtek oltását követően tumornegatívnak, illetve regresszornak bizonyult egerek újraoltásakor tapasztaltuk. Az erre vonatkozó eredményeinket a IV. táblázatban foglaltuk össze. A mortalitás drasztikus csökkenése, valamint a regressziós idők jelentős rövidülése azt mutatja, hogy a tumornegatív és regresszor egércsoportok még négy hónappal később is jelentős védettséget mutattak a sc adott 10^6 élő tumorsejt által okozott tumornövekedéssel szemben. A feltárt tumorsejtekkel kezelt állatokban négy hónappal az immunizálás után a "teszt" tumorsejtdózis okozta tumorincidencia a tumornegatív és regresszor állatokon tapasztaltakéhoz hasonlóan 100% volt, de a tizenöt állatból mindössze egy hullott el. Ezenkívül a visszafejlődő tumorkok átlagos regressziós ideje is szignifikánsan lecsökkent a nem immunizált normál egereken tapasztalthoz képest, ugyanúgy, mint azt a tumornegatív és regresszor csoportokban észleltük.

IV. táblázat. Tumorra szembeni rezisztencia tartóssága élő, illetve feltárt tumorsejtek oltását követően^x

	Incidencia (%)	Mortalitás (%)	Túlélés (nap)	Regresszió %	Átl.regressziós idő $\pm$ SE (nap)
—	120/120 (100)	88/120 (74)	45,3 $\pm$ 2,9 ^o	32/120 (26)	48 $\pm$ 4,7
Regresszor ⁺	42/43 (98)	0/43 (0)	—;	42/43 (98)	22 $\pm$ 3,4
Tumornegatív ⁺	25/25 (100)	3/25 (12)	27; 27; 102;	22/25 (88)	38 $\pm$ 5,0
Immunizált ⁺⁺	15/15 (100)	1/15 (7)	79;	14/15 (93)	29 $\pm$ 2,0

1
2
1

^xa rezisztencia tesztelése 4 hónappal az oltások után 10^6 élő tumorsejt sc oltásával történt

⁺ 10^4 élő tumorsejt sc oltását követően regresszornak, illetve tumornegatívnak bizonyult egerek

⁺⁺ 10^5 tumorsejtnak megfelelő mennyiségű, tisztítatlan ultrahangos lizátummal sc immunizált egerek

^oátlagos túlélés $\pm$ SE

3.1.4. A feltárt tumorsejtekkel keltett rezisztencia függése az immunizálás helyétől

Ezek után megvizsgáltuk, hogy a tumorsejtek ultrahangos lizátumával végzett immunizálás eredményessége függ-e az immunizálás módjától (sc vagy ip), és a létrehozható rezisztencia szisztémás jellegű-e. Az V. táblázat adatai azt mutatják, hogy az ip, illetve a sc immunizálás után hogyan alakul a tumor-növekedéssel szembeni védettség 10^6 élő tumorsejt ip, illetve sc oltását követően.

Az élő tumorsejtekkel ip "tesztelt" csoportokban csak a mortalitási értékeket és az átlagos elhullási időket tüntettük fel, mert a tumorok hasúri megeredése és esetleges regressziója nem ítélt meg olyan egyszerűen és egyértelműen, mint a sc tumoroltások esetén, s így ezekre vonatkozóan nem rendelkezünk biztos adatokkal. Megfigyelhető, hogy a nem immunizált kontroll csoportban 10^6 élő tumorsejt oltását követően kifejlődött ascites-sarcomától minden állat igen rövid idő alatt elpusztult. Az ip immunizálás után a mortalitás a tizedére csökkent, és még a sc immunizálást követően is előfordult néhány túlélés.

A sc, illetve az ip immunizálásnak a sc tumornövekedésre kifejtett hatására vonatkozó eredményeink az alábbiakban foglalhatók össze. A sc immunizált csoportban a kontrollhoz képest erősen csökkent a mortalitás és a túlélő egereken a tumorok átlagos regressziós ideje jelentősen megrövidült, megerősítve az előző két fejezetben leírt eredményeinket. Az ip immunizált csoportban azonban a sc adott "teszt" tumorsejtdózis okozta tumornövekedés gátlását nem tapasztaltuk, éppen ellenkezőleg,

V. táblázat, A tumorraal szembeni rezisztencia függése a feltárt tumorsejtekkel történt immunizálás módjától

Immuni- zálás módja ⁺	"Teszt" tumor- oltás ^x	Incidencia (%)	Mortalitás (%)	Túlélés (nap)	Regresszió %	Átl. regressziós idő ±SE (nap)	
—	<u>ip</u>	—	32/32 (100)	15,0 ±0,5 ^o	—	—	
<u>ip</u>	<u>ip</u>	—	1/10 (10)	18;	—	—	
<u>sc</u>	<u>ip</u>	—	11/14 (79)	15,5 ±0,4 ^o	—	—	
—	<u>sc</u>	120/120 (100)	88/120 (74)	45,3 ±2,9 ^o	32/120 (26)	48 ±4,7	24
<u>sc</u>	<u>sc</u>	25/25 (100)	3/25 (12)	49; 51; 67;	22/25 (88)	33 ±3,4	—
<u>ip</u>	<u>sc</u>	25/25 (100)	24/25 (96)	38,1 ±3,9 ^o	1/25 (4)	78;	

⁺ az immunizálás 10⁶ tumorsejtnak megfelelő, tisztítatlan ultrahangos lizátummal történt sc, illetve ip

^x a rezisztencia tesztelése az immunizálás után 2 héttel 10⁶ élő tumorsejt sc, illetve ip oltásával történt

^o átlagos túlélés ±SE

a tumor növekedése fokozódott. Három egymástól független kísérleti csoportban - összesen huszonöt állat közül - csak egy állaton következett be regresszió, a többi elpusztult a tumortól, mégpedig szignifikánsan rövidebb idő alatt, mint a nem immunizált kontroll csoport egerei.

3.1.5. A feltárt tumorsejtek immunterápiás hatása tumoros egerekben

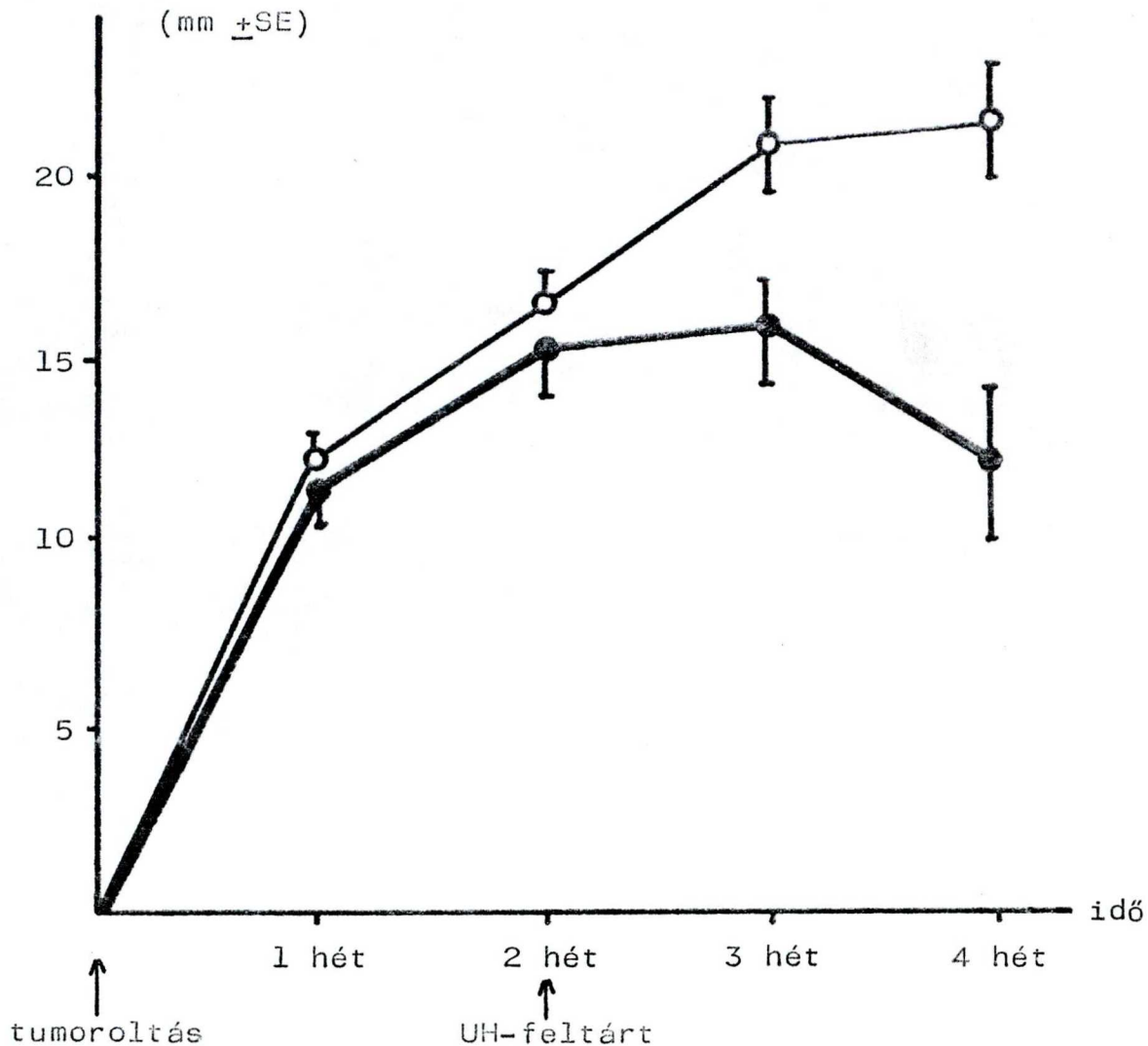
A továbbiakban azt vizsgáltuk, meg, hogy a normál egerek immunizálása során hatásosnak bizonyult ultrahangos lizátummal a már nagy tumorú állatokon visszafordítható-e a tumornövekedés. 10^6 élő tumorsejt sc oltását követően a 14. napon, amikor az átlagos tumorátmérő a másfél centimétert meghaladta, 10^6 tumorsejtnak megfelelő mennyiségű lizátumot kaptak az állatok sc.

Az 1. ábrán látható a tumornövekedés dinamikája a kezeletlen és az ultrahanggal feltárt tumorsejtekkel kezelt csoportban. A kezelt csoportban, a kezelés után egy héttel már megállt a tumornövekedés, két hét múlva pedig az átlagos tumorátmérő kisebb lett, jelezve, hogy a tumor az állatok többségén visszafejlődésnek indult. A különbség a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ekkorra már statisztikailag szignifikánssá vált.

A 2. ábrán megfigyelhető az is, hogy nemcsak átmeneti hatásról van szó, hiszen a feltárt tumorsejtekkel történt utókezelés eredményeként a mortalitás is csökkent, az egereknek a kontroll csoporthoz képest kb. a fele hullott el. Ezen az ábrán bemutatjuk azokat az eredményeket is, amelyeket a tumoroltás után 4, illetve 28 nappal kezelt csoportokban kaptunk.

Átlagos tumorátmérő

(mm $\pm$ SE)



1. ábra

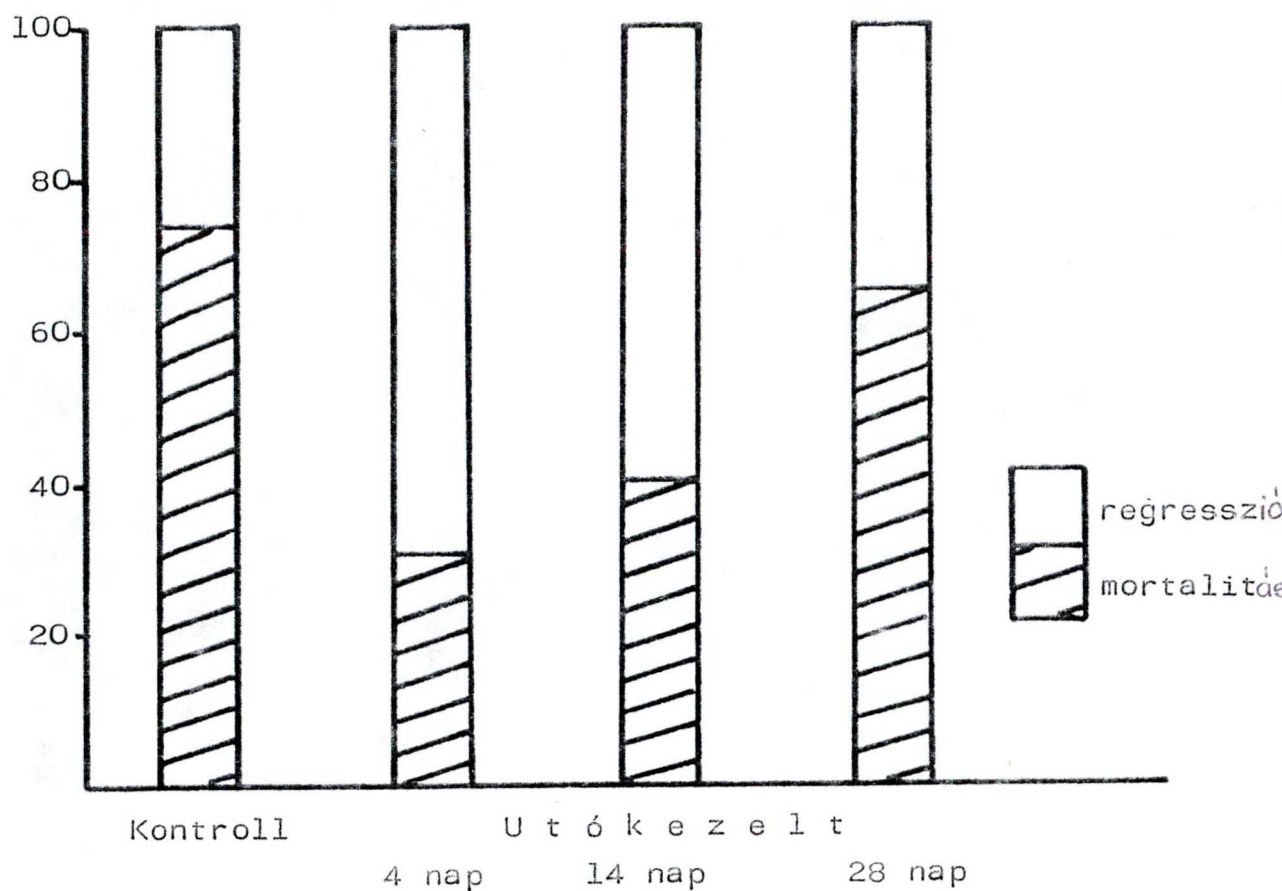
Feltárt tumorsejtek hatása a tumornövekedésre

Az állatok 10^6 élő tumorsejtet kaptak sc a 0. napon.
A kezelés a 14. napon történt 10^6 tumorsejtnak megfelelő
tisztítatlan ultrahangos lizátummal sc.

○ kezeletlen kontroll

● utókezelt

tumor incidencia (%)



2. ábra

Feltárt tumorsejtek hatása a tumorviselő állatok mortalitására

Az állatok 10^6 élő tumorsejtet kaptak sc a 0. napon.
A kezelés a 4., a 14., illetve a 28. napon történt 10^6
tumorsejtnak megfelelő tisztítatlan ultrahangos lizátum-
mal sc.

A tumornövekedés kezdeti stádiumában, amikor még éppen csak megjelentek a szemmel látható és tapintható tumorok, az utókezelés hatékonyabbnak bizonyult: az állatoknak csak 30%-a pusztult el. A tumornövekedés késői stádiumában végzett kezelés viszont már nem volt képes befolyásolni az állatok sorsát.

3.2. Az A/Ph MC.S1. tumorról szembeni lokális DTH reakció

3.2.1. A regresszor állatok lokális DTH reaktivitása

3.2.1.1. A lokális DTH reakció dinamikája

A lábmegevastagodási reakciót 10^6 tumorsejtnak megfelelő mennyiségű ultrahangos tumorsejtlizátummal váltottuk ki, amelyről az előző fejezetekben ismertetett immunizálási kísérletek során bebizonyosodott, hogy tartalmazza az A/Ph MC.S1. sarcomasejtek által hordozott TATA-t. A feltárt tumorsejteket az egerek lábának dorsalis oldali bőre alá oltottuk. Az oltás a láb kipirulását és ödémás duzzadását okozta (lásd az 1. képen).

A reakció mértékének számszerű jellemzésére a lábmegevastagodás %-os értékeit használtuk (lásd a Módszerek 2.9. fejezetében).

A 3. ábrán a feltárt tumorsejtekkel regresszor, illetve normál egereken kiváltható lokális lábmegevastagodási reakció időbeli lefutását tüntettük fel. A harmadik görbe adatait pedig úgy számoltuk ki, hogy a regresszor egereken kapott %-os lábmegevastagodási értékekből kivontuk a normál állatokon kapott értékeket, és így ez a görbe a regresszor egerek ún. specifikus





1. kép

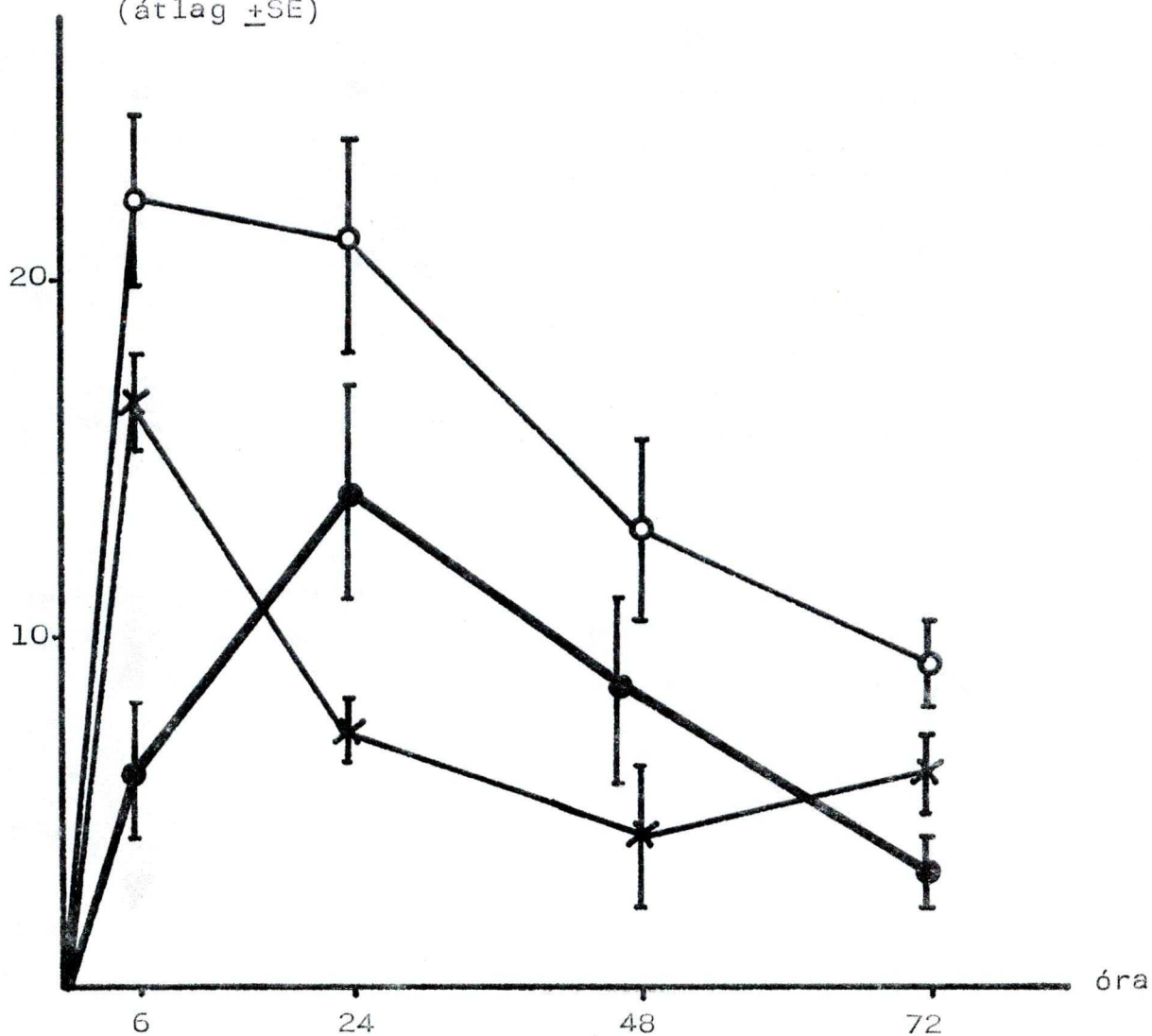
Lokális DTH (lábmegvastagodási) reakció regresszor
egéren

bal láb: 10^6 feltárt tumorsejt sc oltását követően
24 órával

jobb láb: "oltási" kontroll (MEM tápfolyadék)

lábmegvastagodás (%)
(átlag $\pm$ SE)

- 30 -



3. ábra

Tumorantigénnel szembeni lokális DTH reakció regresszor egereken

A reakció kiváltása 10^6 feltárt tumorsejttel történt.
X normál, illetve O regresszor egerek lábmegvastagodási reakciója; ● regresszor egerek specifikus lábmegvastagodási reakciója (regresszor-normál).

lokális reaktivitásának dinamikáját mutatja. A tumorsejt-lizátum a normál egereken a kiváltás után 6 órával átlagosan 16,8%-os lábmegvastagodást okozott. Ez a 24. órára jelentősen csökkent (7,3%), 48 óra eltelte után pedig minimális értéket mutatott. A regresszor állatokon a kiváltás utáni 6. órában lényegesen erősebb reakciót figyeltünk meg (23%), ennek azonban a nagyobbik komponense nem tekinthető specifikusnak, mivel azt a normál állatokon is tapasztaltuk. A kiváltás után a 24. órában a regresszor állatokon mért reakció a korai időpontban kapott értékhez viszonyítva lényegesen nem változott (21%). Mivel a normál állatokon a 24 órás reakció jelentősen kisebb volt, így adódik, hogy a regresszor egerek specifikus reakciója a 24. órában érte el a maximumát. A második napon a regresszor állatokon kapott lábmegvastagodásnak mind az abszolút, mind a specifikus értékei csökkentek, ekkorra a reakció már a regresszor csoportban is lezajlott. A tumorantigénekkel ily módon regresszor egereken kiváltható specifikus lábmegvastagodási reakció időbeli lefutása alapján DTH reakciónak tekinthető.

3.2.1.2. A lokális DTH reakció tartóssága regresszor egereken

További kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy a regresszor állatokon a tumoroltástól számítva különböző időpontokban - ugyanakkor, amikor ezen állatok a tumor újraoltásakor jelentős tumorról szembeni védettséget mutattak - kiváltható-e a lokális DTH reakció.

A 3.1.1. fejezetben ismertettük azt a kísérletünket, amelyben mitomycinnel osztódásukban részlegesen gátolt tumorsejtekkel sc oltottuk az egereket, hogy a tumorrall szemben rezisztenciát keltsünk. A II. táblázatban látható volt, hogy az osztódásukban részlegesen gátolt tumorsejtek beoltását követően valamennyi állaton megindult a tumornövekedés, a tumorok azonban minden esetben két héten belül visszafejlődtek. Az ilyen egerek a 15. napon végzett újraoltás eredménye alapján a tumorrall szemben rezisztensnek bizonyultak (lásd a III. táblázatban).

Az ugyanilyen előéletű, de élő tumorsejtekkel újra nem oltott csoportban megkíséreltük kiváltani a lokális DTH reakciót. A kiváltás után 24, 48 és 72 órával kapott specifikus %-os lábvastagodási értékeket tüntettük fel a VI. táblázatban. Megfigyelhető, hogy mindhárom időpontban 10% körüli volt a lokális DTH reakció.

A 3.1.3. fejezetben leírt eredményeink szerint a regresszor állatok a tumoroltás után 4 hónappal is rezisztensnek bizonyultak a tumorrall szemben. Megvizsgáltuk, hogy ebben az időpontban is kiváltható-e regresszor állatokon a lokális DTH reakció. A VI. táblázatban látható, hogy a reakció kiváltása után 24 órával csaknem 15%-os specifikus lábmegvastagodást figyeltünk meg és a reakció nagysága a 48., sőt a 72. órában is 10% körüli volt.

A dolgozatban nem tárgyalt kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a regresszor állatok az első tumoroltás után még egy évvel is igen erős védettséget mutattak a tumornövekedéssel szemben.

VI. táblázat. Tumorantigénekkel szembeni lokális DTH reakció regresszor egereken
a tumoroltás utáni különböző időpontokban

A tumoroltás után eltelt idő	Specifikus lokális lábmegvastagodás % (átlag $\pm$ SE)			
	6 óra	24 óra	48 óra	72 óra
15 nap ⁺	-	10,3 $\pm$ 3,5	8,6 $\pm$ 3,4	8,6 $\pm$ 2,4
4 hónap ⁺⁺	-	14,7 $\pm$ 3,3	7,9 $\pm$ 2,3	9,4 $\pm$ 2,0
12 hónap ⁺⁺	4,2 $\pm$ 2,7	10,8 $\pm$ 4,5	6,3 $\pm$ 2,7	3,5 $\pm$ 1,8

⁺10⁶ élő, mitomycin C-vel részlegesen gátolt tumorsejttel sc oltott regresszor egerek a tumoroltás után 15 nappal

⁺⁺10⁴ élő, kezeletlen tumorsejttel oltott regresszor egerek a tumoroltás után 4, illetve 12 hónappal

A lokális DTH reakciót az ilyen regresszor állatokon is sikerült kiváltanunk, és ennek 24 órás értéke ebben az esetben is meghaladta a 10%-ot (lásd a VI. táblázatban). Valamennyi regresszor csoport 24 órás lokális reakciója szignifikáns volt a normál egereken tapasztalthoz képest.

3.2.1.3. A lokális DTH reakció fokozhatósága regresszor egereken

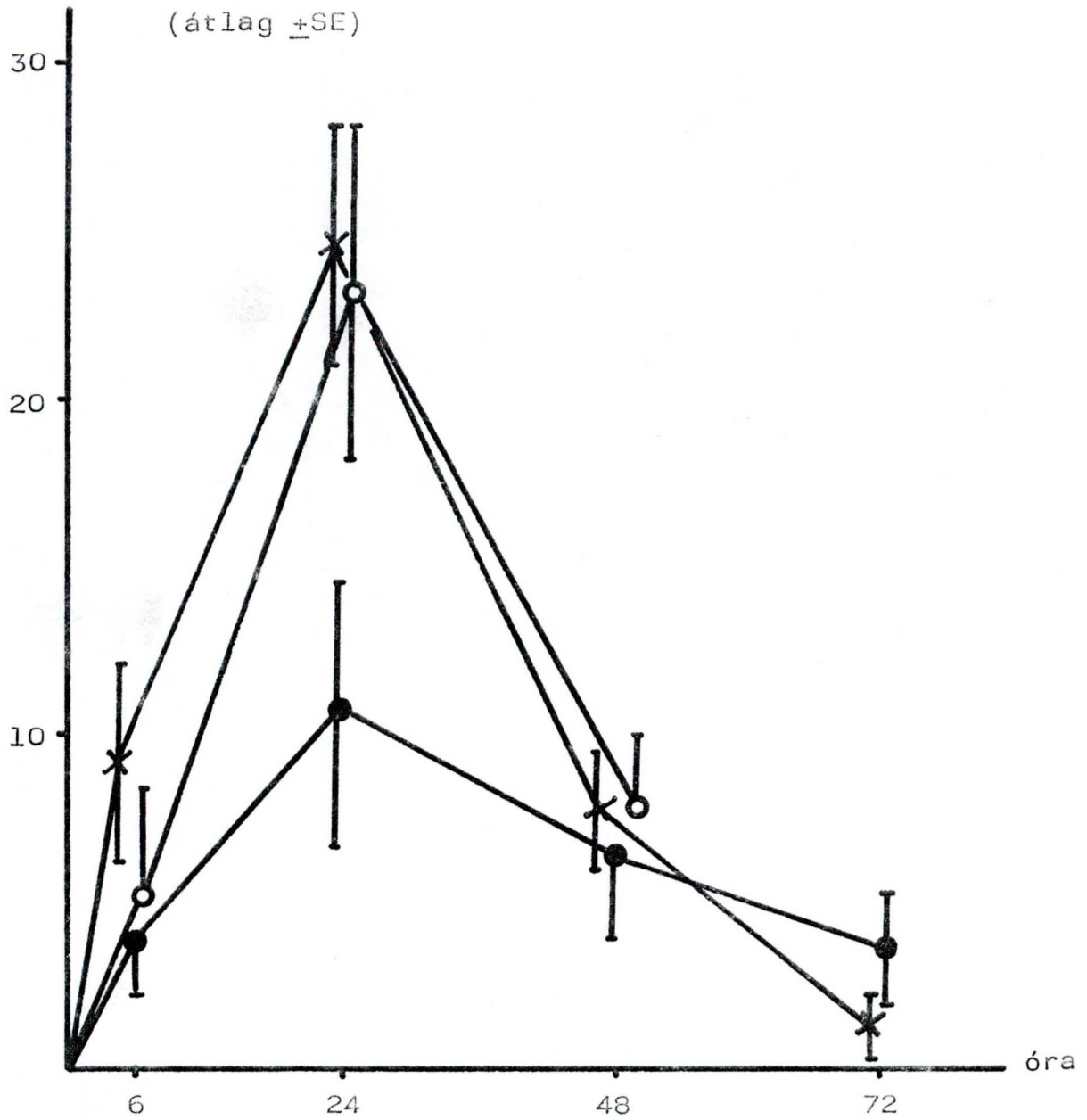
Azokon a regresszor állatokon, amelyeken a tumoroltás után egy évvel váltottuk ki a reakciót, megvizsgáltuk azt is, hogy ismételt kiváltáskor a DTH reaktivitás mutat-e fokozódást. Mivel a reakció kiváltása a TATA-t tartalmazó feltárt tumor-sejtszuszpenzióval történt (lásd a 3.1.2. és 3.1.3. fejezetben), ez egyben a regresszor állatok immunrendszerének a tumorantigénekkel való ismételt találkozását jelentette. A 4. ábrán feltüntetett eredményeink alapján az első kiváltás után 1 hónappal történt második kiváltáskor a 24 órás DTH reakció több, mint kétszeresére emelkedett. Az újabb 1 hónap múlva végzett harmadszori kiváltáskor azonban - tehát kétszeri emlékeztető oltás után - már nem növekedett tovább a DTH reaktivitás.

3.2.2. A tumoros állatok lokális DTH reaktivitása

3.2.2.1. A lokális DTH reakció nagysága a tumoroltás utáni különböző időpontokban

A további kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a tumoros állatokon is kimutatható-e a lokális DTH reakció. Az 5. ábrán a 10^6 élő tumorsejttel történt sc oltás utáni különböző

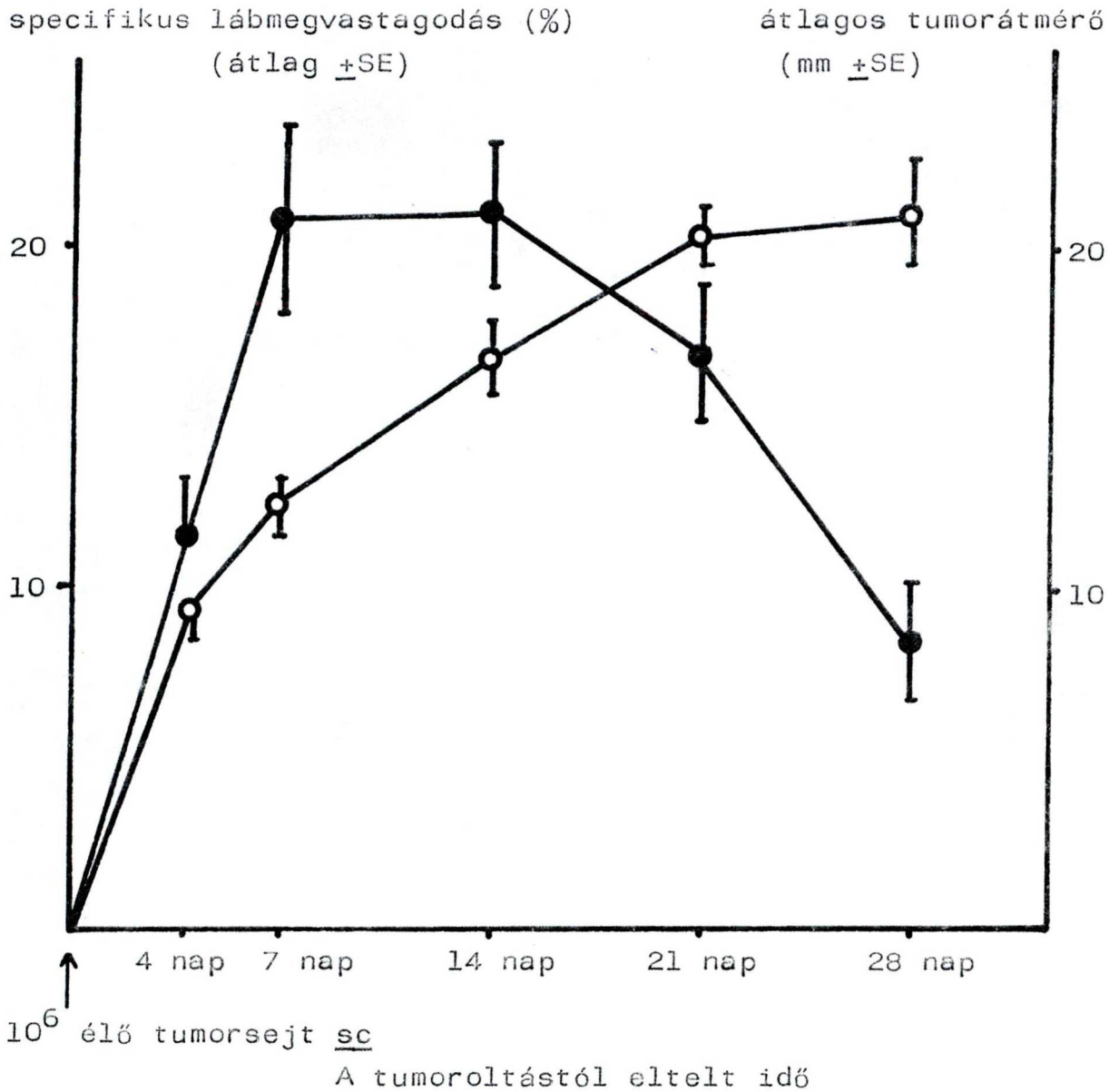
specifikus lábmegevastagodás (%)
($\text{átlag} \pm \text{SE}$)



4. ábra

Tumorantigénnel szembeni lokális DTH reakció regresszor egereken többszöri kiváltás után

A reakció kiváltása a tumoroltás után 12 hónappal (● 1. kiváltás), 13 hónappal (X 2. kiváltás), illetve 14 hónappal (○ 3. kiváltás) történt.



5. ábra

Tumorantigénnel szembeni 24 órás lokális DTH reakció és a tumornövekedés időbeli változása

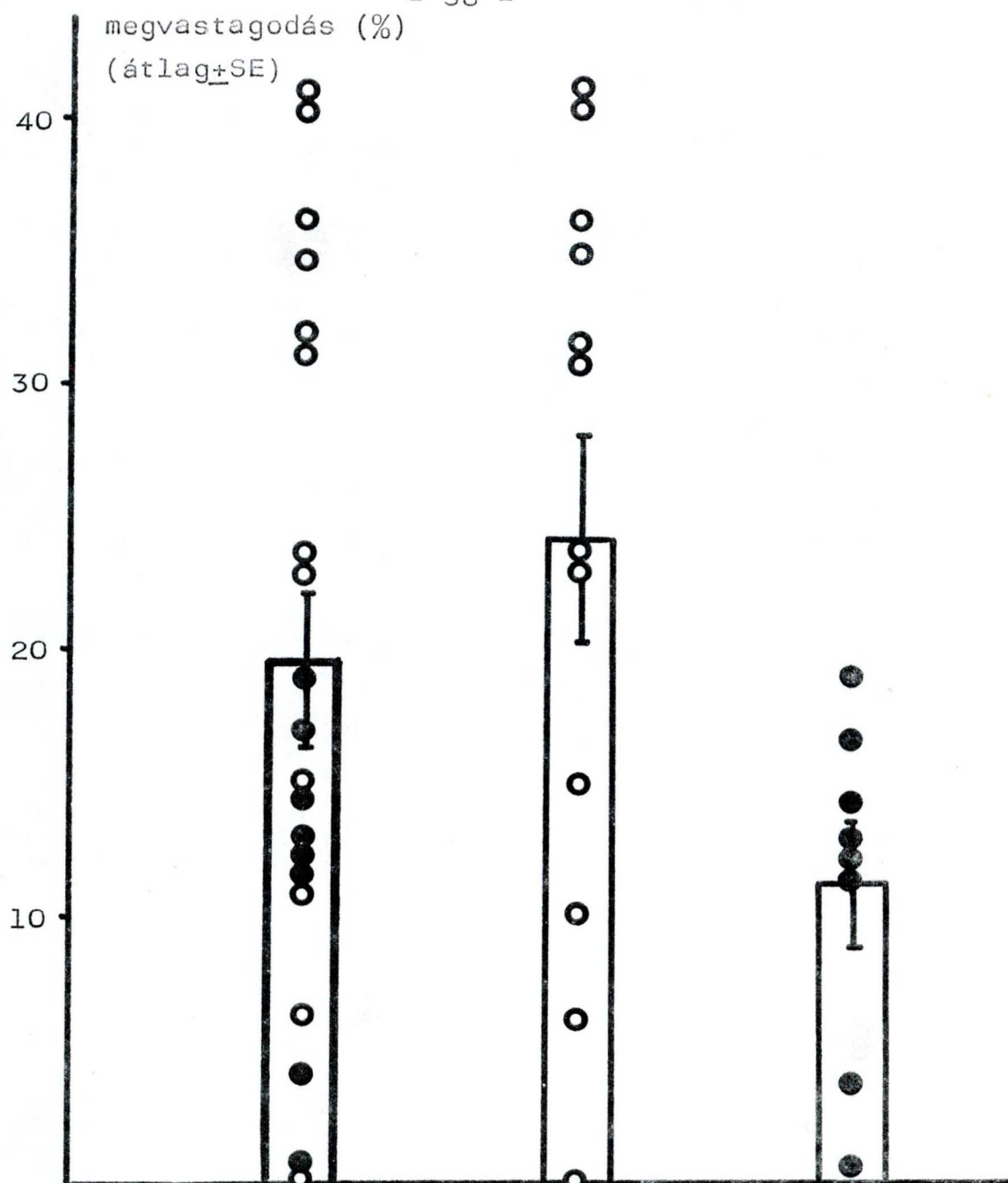
A lokális DTH reakció kiváltása a tumoroltás után a vízszintes tengelyen feltüntetett időpontokban történt egymástól független egércsoportokban.

- specifikus lábmegvastagodási %
- tumorátmérő

időpontokban egymástól független egércsoportokon kiváltott DTH reakciók 24 órás specifikus értékeit, továbbá a reakció kiváltásán át nem esett kontroll állatokon a tumornövekedés dinamikáját ábrázoltuk. A kontroll egereken a tumor fokozatosan növekedett, és több mint 70%-uk elhullott. A tumoroltás utáni 4. napon az állatok hátán megjelentek a látható és tapintható tumorok. Ebben az időpontban már szignifikáns lokális DTH reakciót lehetett kiváltani ($12\% \pm 2,0$). A DTH reaktivitás a tumoroltás utáni 7. napon elérte a maximumát ($21,1\% \pm 5,9$), a 14. napon változatlan nagyságú volt ($20,8\% \pm 3,3$) a 21. napon pedig, akkor, amikor a tumorok átmérője meghaladta a 2 centimétert, már csökkenni kezdett ($16,9\% \pm 2,6$). A tumoroltás után a 28. napon az átlagos DTH reaktivitás igen alacsony értéket mutatott.

3.2.2.2. A lokális DTH reakció prediktív értéke a tumoros állatokon

A tumoroltás utáni 14. napon a 10^6 élő tumorsejttel sc oltott állatokon a tumorok átlagos átmérője meghaladta a másfél centimétert és az egerek fizikális állapota még szemmel láthatóan egyáltalán nem volt leromlott, s a tumoraik is nagyjából egyformák voltak. A 6. ábrán látható, hogy az ilyen egerek átlagos lokális DTH reaktivitása 24 órával a kiváltás után 20% körüli specifikus értéket mutatott, az egyedi értékek azonban meglehetősen széles tartományban oszlottak meg (0-40%). Ha ezt a csoportot az egerek további sorsa alapján két részre bontjuk, akkor az utóbb regresszornak bizonyult egereken



6. ábra

Tumorról szembeni 24 órás lokális DTH reakció tumoros egerekben a tumoroltás utáni 14. napon

Az egerek a 0. napon 10^6 élő tumorsejtet kaptak sc

○ regresszorá vált

● elhullott

kétszer akkora lokális DTH reakciót ($25,1\% \pm 3,9$) észleltünk, mint azokon az állatokon, amelyek később elpusztultak ($12,2\% \pm 2,0$). A két csoport között a különbség szignifikáns. Ezenkívül ki lehet emelni, hogy valamennyi átlag feletti DTH reakciót mutató állaton visszafejlődött a tumor (8/8), míg az átlag alatti DTH reaktivitású állatok kétharmad részben elhullottak (8/12). A megoszlásbeli különbség ebben az esetben is szignifikáns.

Amikor a lokális DTH reakció kiváltását a tumoroltást követően a 4. napon végeztük el, a reakció nagysága és az egerek további sorsa között nem találtunk összefüggést. A tumoroltás utáni 28. napon az egerek már a hátukon viselt tumoruk nagysága alapján nagyjából elkülöníthetők aszerint, hogy elfognak-e pusztulni vagy visszafejlődik-e rajtuk a tumor. "Klinikai" állapotukkal összefüggött a DTH reakció kiválthatósága: a későbbiekben elhulló egerek gyakorlatilag negatívnak, a regresszorrá váló állatok pedig pozitívnak bizonyultak (különbe nem mutatott eredmények).

3.3. Az A/Ph MC.S1. tumorról szembeni szisztémás DTH reakció

3.3.1. A szisztémás túlérzékenységi reakció jelensége és kiválthatóságának körülményei

Amikor ezzel az erős TATA-val rendelkező tumorról szembeni hiperimmun állapot előidézése céljából szingén egereket sorozatos immunizálásnak vetettünk alá, az immunizálás során súlyos, sok esetben elhulláshoz vezető szisztémás túlérzékenységi

reakcióra emlékeztető tünetegyüttes jelentkezését észleltük. A kísérlet körülményei és a megfigyeléseink a következők voltak.

Az élő sarcomasejtekkel oltott, masszív daganatnövekedésen átesett, majd regresszornak bizonyult egereket a tumoroltás után 4 hónappal sc újraoltottuk 10^6 élő tumorsejttel. Az egerek e második tumortranszplantátummal szemben jelentős rezisztenciát mutattak, mint ahogy azt a 3.1.3. fejezetben leírtuk. Ezeket a sc kétszer immunizáltnak tekinthető állatokat 4 hónappal a második sc tumoroltást követően 10^6 élő tumorsejttel oltottuk be ip. Az V. táblázatban látható volt, hogy az e tumorsejtdózis hatására kialakult ascites-sarcomától minden normál állat elpusztult, és az egerek túlélési ideje igen rövid, átlagosan $15 \pm 0,5$ nap volt. A sc kétszer immunizált állatok ip tumoroltása után 4 hétig vártunk, azt vizsgálva, hogy az ip oltott 10^6 tumorsejt ebben az esetben okoz-e elhullást. Ezen egerek közül egyetlenegy sem pusztult el, sőt bennük az ascites-sarcoma szemmel is megítélhető növekedését sem tapasztaltuk, ami igen erős, szisztémás jellegű tumorelles rezisztenciára utal.

A tumorrall szembeni hiperimmun állapot előidézése céljából további, megemelt dózisú ip immunizáló oltásokat terveztünk. Ennek megfelelően az első ip oltás után 4 héttel 5×10^6 élő tumorsejtet kaptak az állatok, ismét ip.

Egy nap múlva az egerek szőre borzassá vált, oldaluk "behorpadt", gerincük "kipúposodott" (lásd a 2. képen), dyspnoesak és hidegek lettek, spontán aktivitásuk csökkent.



2. kép

Szisztémás túlérzékenységi reakció ip szenzibilizált regresszor egereken

x = az ip szenzibilizált egerek az 5×10^6 élő tumorsejttel történt kiváltás után 2 nappal

+ = a normál egerek az 5×10^6 élő tumorsejt ip beoltása után 2 nappal

A második napra a 10 állatból 4 elhullott.

Boncoláskor az állatokban sem ascitesben, sem szolidan növekvő tumort nem találtunk, a hasúr alapos átmosása után a beoltott tumorsejtmennyiségnek legfeljebb a felét-harmadát nyertük vissza. A mesenteriumban, a hasüregi és a kismedencei zsírszövetben grízszerű, esetenként nagy kiterjedésű szinte hófehér elváltozásokat tapasztaltunk. A jobb szívfél tágult és vérrel telt volt. A hasüregi nyirokcsomókban és a távolabbi szervekben áttéteket nem találtunk.

A "klinikai" kép és a bonclelet egyaránt arra utalt, hogy az egerek shockban pusztultak el, nem pedig progresszív tumor-növekedés következményeként. A normál egerek egyébként az 5×10^6 ip adott tumorsejttől legkorábban a 7. napon hullottak el, mégpedig ascites-sarcomától (be nem mutatott eredmény).

A kísérlet megismétlésekor lényegében azonos eredményeket kaptunk. Az első ip oltást, amelyet a továbbiakban "szenzibilizáló" oltásnak neveztünk, 14 egéren végeztük el. Négy hétig ebben az esetben sem tapasztaltunk ascites-tumortól történt elhullást. A második ip oltás, azaz a "kiváltó" oltás után ugyanazokat a "klinikai" tüneteket észleltük, mint az előző kísérletben. A második napon 4, a negyedik napon további 1 állat elpusztult.

A fenti kísérletekben jelentkező shock okaként a tumor-antigénekkel szemben fellépő, időbeli lefolyása alapján késői típusúnak látszó, szisztémás túlérzékenységi reakciót feltételeztünk.

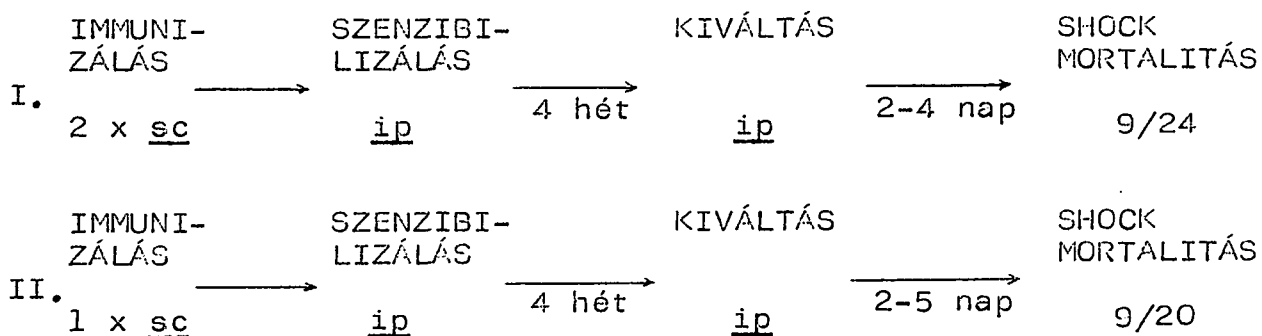
Ezt követően a kísérlet időtartamának rövidítése céljából



megvizsgáltuk, hogy a reakció kiváltható-e a szenzibilizáló oltást megelőzően csak egyszer sc immunizált állatokon is. 10^6 daganatsejttel sc oltott és regresszornak bizonyult 21 egéren végeztük el a szenzibilizáló oltást. Közülük mindössze 1 állat pusztult el ascites-sarcomától, mégpedig a szenzibilizáló oltás után 15 nappal. A 4 hét múlva adott kiváltó oltás után bekövetkezett "klinikai" tünetegyüttes és az elhullások aránya az előző két esetben leírtakéval meggyezett. A második napon a shock okozta mortalitás 7/20 volt, a 3. és 5. napon további 1-1 állat elhullott.

A reakció súlyosságának számszerű jellemzésére indexet vezettünk be. Az intenzitást egy önkényesen megválasztott skálán értékeltük, amely szerint az állatokat négy csoportba soroltuk: elhullott (3), súlyos reakciót mutató (2), enyhe reakciót mutató (1), és tünetmentes (0) állatok. Az értékelést naponta elvégeztük, és az így nyert adatokból átlagot számoltunk. Ezen utóbbi csoportban ily módon számolva a reakció súlyossági indexe a második napon 2,35 volt.

A fenti kísérletek sémája és összesített eredményük a következőkben foglalható össze:



3.3.2. A szisztémás és lokális DTH reakció összefüggése
valamint antithymocytá savóval (ATS) való
befolyásolhatóságuk

Ezen előzmények után az immunizáló, a szenzibilizáló, illetve a kiváltó oltások alkalmazásának időbeli sémáján nem változtatva azt vizsgáltuk, hogy e feltételezett szisztémás DTH reakció mutat-e párhuzamosságot a tumorról szembeni lokális DTH reaktivitással (lásd a 3.2. fejezetet), továbbá azt, hogy a szisztémás és lokális reakciót lehet-e befolyásolni ATS-sel előidézett immunszuppresszióval.

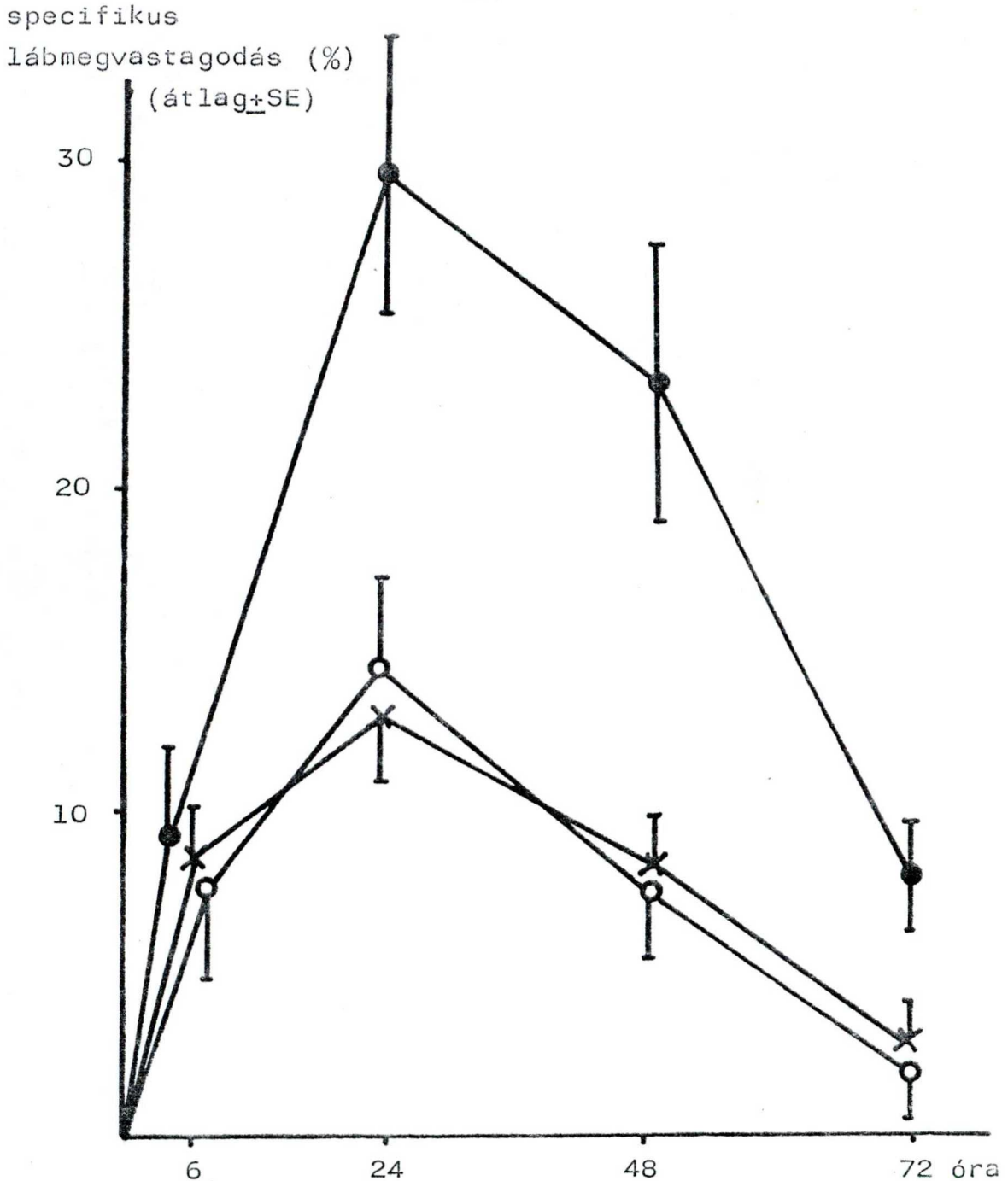
Regresszor egerek előállítására céljából 10^4 élő tumorsejttel sc oltottuk az állatokat. A II. táblázatban látható volt, hogy 10^4 élő tumorsejt sc bevitele után szinte valamennyi állaton megjelent a tumor, ezt követően azonban az állatok 80%-án visszafejlődtek a daganatok. Így viszonylag nagy hatékonysággal nyertünk regresszor egereket. A szenzibilizáló oltást 32 egéren végeztük el, amelyek közül mindössze 1 állat hullott el ascites-sarcomától, a többin viszont - az előző fejezetben leírt kísérletekhez hasonlóan - nem észleltük a tumornövekedés jeleit. Tizenöt állatot a kiváltás előtti 4. és 1. napon 0,5-0,5 ml erős immunszuppresszív hatású ATS-sel kezeltünk. Ezekből 10 állaton szisztémás, 5 állaton pedig lokális DTH reakciót váltottunk ki. Az ATS-sel nem kezelt állatokat ugyanúgy szisztémásan és lokálisan kiváltott csoportra osztottuk. A szisztémás reakcióra vonatkozó eredményeket a VII. táblázatban, a lokális reakció alakulását pedig a 7. ábrán tüntettük fel.

VII. táblázat. Az ATS-kezelés hatása a tumorra szembeni szisztémás DTH reakcióra

	A kiváltás utáni idő	
	1. nap	2. nap
<u>ip</u> szenzibilizált ⁺		
elhullás	0/11	0/11
súlyos	0/11	5/11
enyhe	7/11	6/11
negatív	4/11	0/11
reakciósúlyossági index	0,64	1,45
<u>ip</u> szenzibilizált és ATS-kezelt ⁺⁺		
elhullás	0/10	0/10
súlyos	0/10	0/10
enyhe	2/10	4/10
negatív	8/10	6/10
reakciósúlyossági index	0,2	0,4

⁺ 10^4 élő tumorsejt sc oltását követően 4 hónappal 10^6 élő tumorsejt ip oltásával szenzibilizáltuk a regresszor állatokat, ezután 4 héttel 5×10^6 élő tumorsejt ip oltásával váltottuk ki a szisztémás reakciót

⁺⁺ a reakció kiváltása előtti 4. és 1. napon $2 \times 0,5$ ml ATS-sel kezeltük sc az előzetesen ip szenzibilizált állatokat



7. ábra

Tumorról szembeni lokális DTH reakció kezeletlen és ATS-sel kezelt ip szenzibilizált egereken

- 10^4 élő tumorsejt sc oltását követően 4 hónappal 10^6 élő tumorsejt ip oltásával szenzibilizáltuk a regresszor állatokat, ezután 4 héttel 10^6 tumorsejtnek megfelelő ultrahangos lizátummal váltottuk ki a lábmegvastagodási reakciót.
- Az ugyanígy ip szenzibilizált egereket a reakció kiváltása előtti 4. és 1. napon $2 \times 0,5$ ml ATS-sel oltottuk sc.
- × Az ip nem szenzibilizált regresszor állatokon a tumoroltás után 4 hónappal váltottuk ki a reakciót.

A táblázatból látható, hogy a szisztémás kiváltást követően az ATS-sel nem kezelt csoportban az 1. napon csak enyhe reakciót észleltünk 7 állaton, a súlyossági index 0,64 volt. A 2. napon az index 1,45 volt, ami abból adódott, hogy súlyos reakciót 5, enyhe reakciót pedig 6 állat mutatott. Ebben a kísérletben az előzőektől eltérően shock okozta elhullás nem történt, de a súlyos szisztémás túlérzékenységi reakció "klinikai" tünetei ugyanúgy kialakultak. A párhuzamos csoportban, ahol a kiváltást megelőzően ATS kezelést alkalmaztunk, a "klinikai" reakció sokkal enyhébben zajlott le. Az első napon mindössze 2, a második napon pedig 4 állaton mutatkoztak az enyhe túlérzékenységi reakció jelei, súlyos reakciót az ATS-sel kezelt állatokon egyáltalán nem észleltünk.

A 7. ábrán látható, hogy az ATS-sel nem kezelt szenzibilizált állatok, amelyeken 10^6 feltárt tumorsejttel lokális kiváltás történt, extrém nagy lábmegvastagodási reakcióval válaszoltak. A kiváltás utáni 1. napon 30%-osnál nagyobb lokális DTH reakciót mértünk, szemben a nem szenzibilizált regresszor egereken kapott 13%-os értékkel. A reakció a szenzibilizált csoportban még a 2. napon is 23% volt, és csak a 3. napon mutatott kifejezett csökkenést. Az ATS kezelés a lokális DTH reakciót is jelentősen gátolta, de a szisztémás reakcióhoz hasonlóan ezt sem szüntette meg teljesen. Az ATS-sel kezelt szenzibilizált egereken a kiváltás után 24 órával a lokális DTH reakció lényegében megegyezett a nem szenzibilizált regresszor egerekével.

4. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

4.1. Osztódásukban gátolt és feltárt tumorsejtek immuno- genitása

A metilkolantrénnel indukált tumorokon megjelenő új antigének és azok immunogén tulajdonságai Foley (3), Prehn és Main (8), Klein és mtsai (36), valamint Old és mtsai (37) munkássága nyomán váltak ismertté. A dolgozatomban leírt vizsgálatokhoz használt, Zákány és mtsai által indukált A/Ph MC.S1. tumor (16) is erősen immunogén tulajdonságú, tehát rendelkezik TATA-val (18). Ennek a munkának az első részében tárgyalt kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy e tumor TATA-jának rezisztenciakeltő képessége élő, osztódóképes, intakt tumorsejtek beviteléhez kötött-e vagy sem. A tumorról szembeni immunizálásra több próbálkozás történt osztódásukban gátolt tumorsejtekkel (19, 23, 38), valamint szubcelluláris tumorsejtszármazékokkal (20, 21, 39, 40). Nem talákoztunk olyan munkákkal, amelyek összehasonlító jelleggel vizsgálták volna ezek rezisztenciakeltő képességét, vagy azt, hogy immunogenitásuk hogyan viszonyul az élő és osztódóképes tumorsejtekéhez. E kérdések elemzése céljából mitomycin C-vel kezelt, illetve feltárt tumorsejtekkel kíséreltünk meg immunizálni színgén egereket.

Kétféle, egy enyhébb és egy erőteljesebb mitomycin kezelési módot alkalmaztunk. Az enyhébb mitomycin C-kezelés a tumorsejtek in vitro DNS szintézisét csak részlegesen

gátolta. Az ilyen kezelésen átesett sejtek in vivo (sc állatokba oltva) csak rövid ideig tartó átmeneti tumornövekedést okoztak (lásd a 3.1.1. fejezetben). Ez valószínűleg nem egyszerűen a tumorsejtek limitált osztódóképességére vezethető vissza, hanem feltehetőleg a gazda immunrendszere is aktívan közreműködik benne. Az erőteljesebb kezelés hatására a tumorsejtek in vitro DNS szintézise közel nullára csökkent és in vivo egyetlenegy esetben sem nőtt ki a tumor.

Ami az általunk alkalmazott ultrahangos feltárás hatékonyságát illeti, megállapítottuk, hogy az nem hagyott intakt tumorsejteket a szuszpenzióban. A feltárt nyers lizátumot 10'000 g-vel történt kétszeri centrifugálással tisztítottuk. Így egy áttetsző, durva részecskéktől mentes felülszót nyertünk.

A különbözőképpen előkészített antigénpreparátumokkal immunizálva az állatokat minden esetben sikerült a tumoral szemben rezisztenciát keltetni a sc oltott élő tumorsejtek tumornövekedést kiváltó hatásával szemben (lásd a 3.1.2. fejezetben). Ez a rezisztencia a "teszt" tumorsejtdózis okozta mortalitás, valamint a tumorok regressziós idejének szignifikáns csökkenésében nyilvánult meg. A legerősebb tumoral szembeni védettséget az osztódásukban részlegesen gátolt tumorsejtekkel immunizált állatokon tapasztaltuk, amelyeken előzőleg rövid, átmeneti sc tumornövekedés zajlott le. Ebben a csoportban az állatok közül egy sem hullott el, és a regressziós idők átlaga is itt volt a legrövidebb. A teljesen blokkolt tumorsejtekkel, továbbá a feltárt tumorsejtszuszenzióval, illetve annak tisztított felülszójával immunizált állatok tumoral

szembeni rezisztenciája egymáshoz viszonyítva hasonló erősségű volt. Nem volt különbség tehát a rezisztenciakeltő képességben aszerint, hogy a gazda szubcelluláris partikulumokon vagy élő, integrált, de osztódóképességben teljesen gátolt tumorsejteken prezentált TATA-val találkozott. A tumorrall szembeni rezisztencia keltéséhez tehát nem szükséges élő és osztódóképes tumorsejtek bevitele, sőt tumorhomogenizátummal is kiváltható, bár gyengébb fokban. Az, hogy az A/Ph MC.S1. tumor TATA-ja az ultrahanggal feltárt tumorsejtek centrifugálással nyert felülúszójában is jelen van - feltehetően szolubilis formában - lehetőséget nyújt e tumor TATA-jának további tisztításához, izolálásához.

A továbbiakban a feltárt tumorsejtekkel keltett rezisztencia tartósságát és erősségét vizsgáltuk (lásd a 3.1.3. fejezetben). Megállapítottuk, hogy a rezisztencia az immunizálás után 4 hónappal is ugyanolyan erős, mint az immunizálás után 2 héttel, sőt intenzitása lényegében megfelel a kezeletlen élő tumorsejtek oltását követően kialakult, a tumornegatív és regresszor állatokon ugyanilyen körülmények között tapasztalt igen erős rezisztencia mértékének. A feltárt tumorsejtszuszpenzióval történt rezisztenciakeltés során tehát ugyancsak hosszú életű immunmemória alakul ki.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a feltárt tumorsejtekkel végzett immunizálással lehet-e szisztémás jellegű rezisztenciát kelteni (lásd a 3.1.4. fejezetben). Megállapítottuk, hogy a sc immunizálással elsősorban a sc, az ip immunizálásokkal pedig kizárólag csak az ip tumornövekedést tudtuk gátolni.

A feltárt tumorsejtekkel keltett rezisztencia tehát elsősorban lokális jellegűnek bizonyult, szemben a kezeletlen, élő tumorsejtekkel oltott és regresszornak bizonyult egereken tapasztalt szisztémás rezisztenciával (ez utóbbit lásd a 3.3.1. fejezetben).

Külön ki kell emelnünk azt a megfigyelésünket, amely szerint az ip immunizálás után sc oltott tumor növekedése fokozódott (lásd a 3.1.4. fejezetben). Ebben az esetben tehát nem tumorral szembeni rezisztenciakeltő, hanem éppen ellenkezőleg, tumornövekedést fokozó hatást tapasztaltunk. Ezek az eredményeink alátámasztják Pellis és Kahan ilyen irányú kísérleteit (41'), amelyekben szolubilis tumorantigénnel történt immunizálást követően az immunizálás és tesztelés módjától és időbeli viszonyaitól függően a tumornövekedés gátlását, illetve fokozódását tudták elérni. A tumornövekedést fokozó effektust létrehozhatják a szolubilis tumorantigének önmagukban (42), illetve ellenanyagokkal képzett komplexeik útján (43), továbbá az általuk indukált "enhancing" típusú ellenanyagok (14) vagy szuppresszor sejtek (13) révén. Ezek mellett az is elképzelhető, hogy az általunk használt antigénpreparátum immunogén és "szuppresszogén" faktotokat egyaránt tartalmaz, mint ahogy azt mások is tapasztalták (44), és az alkalmazás viszonyaitól függően hol az egyik, hol a másik hatása kerül előtérbe. Kísérleti rendszerünket ezek alapján a tumornövekedést gátló, illetve fokozó immunmechanizmusok tanulmányozására egyaránt alkalmasnak tartjuk.

A tumorsejtekből készült "vakcinákkal" történt immun-

terápiás próbálkozások nagyon régi keletűek. Tisztított tumorantigénnel történt aktív immunizálás ritkán járt sikerrel (22), eredményesebbek voltak azok a beavatkozások, amikor fokozták a tumorantigének immunogenitását (45, 46).

Saját kísérleti rendszerünkben feltárt tumorsejtekkel végzett utólagos immunizálással immunterápiás hatást tudtunk elérni (lásd a 3.1.5. fejezetben). A sc tumoroltás után még két héttel is (amikor a tumorok már igen nagyok voltak, és az egerek átlagos elhullási idejéből már egyharmad rész eltelt) sc adott tumorsejthomogenizátummal a mortalitást a felére tudtuk csökkenteni. Feltárt tumorsejtekkel tehát az egyébként halálos kimenetelű tumornövekedés is sokszor visszafordítható. A kísérleti rendszerünkben talált tumornövekedést fokozó effektus azonban figyelmeztet az immunfolyamatok összetettségére, valamint azokra a kétségekre, amelyek ezen biztató eredmények közvetlen, gyakorlati felhasználhatóságára vonatkoznak.

4.2. A tumorról szembeni rezisztencia és a lokális DTH reakció összefüggése

Az erősen immunogén A/Ph MC.S1. tumorról szemben fellépő immunválasz mechanizmusát vizsgálva Zákány és mtsai megállapították, hogy abban a celluláris immuntényezők, azon belül a T-sejtek és makrofágok játszanak döntő szerepet. Leírták azt is, hogy regresszor egereken a tumor lizátumával lokális DTH reakciót lehet kiváltani (18). Saját vizsgálatainkban regresszor valamint hiperimmunizált állatokból nyert limfoid sejt-

szuszpenziókban nem sikerült kimutatnunk a tumorsejtek ellen irányuló citotoxikus effektor sejtek jelenlétét (nem közölt eredmények).

A celluláris immunválaszban és így a tumorokkal szembeni védekezés mechanizmusában a DTH reakció alternatívája lehet a T-sejtek közvetlen citotoxikus működésének. Ezért különös figyelmet szenteltünk az A/Ph MC.S1. tumorra szembeni lokális DTH reakció vizsgálatának (lásd a 3.2. fejezetben).

Wang (26) mutatott ki először tumorhomogenizátummal szembeni lokális DTH reakciót tumorra szemben hiperimmunizált patkányokon, amely jóllehet a neoantigének ellen irányult, azonban nem volt specifikus a tumorra nézve. Oettingen és mtsai-nak (27) sikerült először specifikus, tumorantigénnel szembeni lokális DTH reakciót kiváltaniuk tengerimalacokon és szoros összefüggést kimutatniuk e reakció és a tumorra szembeni transzplantációs rezisztencia között. Színgén egértumor rendszerben először Halliday és Webb (29), illetve Hoy és Nelson (28) számoltak be hasonló eredményekről. Nem sokkal utána Wespis és mtsai (47) a tumorra szemben immunizált állatokból, azok limfoid sejtsuszpenziójával a DTH reakciónak és a tumornövekedés gátlásának együttes átvihetőségét mutatták ki. Abe és mtsai a tumor eltávolítása után tumormentes (48), illetve élő tumorsejtekkel erősen immunizált állatokban (49) jelentős tumorelles DTH reaktivitást tapasztaltak. Macek és mtsai (50), LeGrue és mtsai (51) tisztított tumorantigénnel immunizált egerekben in vivo tumorelles rezisztenciát és DTH reakciót egyaránt ki tudtak mutatni. Kearny és Harrop (52) összefüggést

találtak a tumorok immunogenitása és az ellenük irányuló DTH reakció nagysága között. A fentiektől eltérően Miami és mtsai (31) szolubilis tumorantigénekkal immunizált patkányokon szignifikáns DTH reakciót mutattak ki, viszont ezeken az állatokon a tumor fokozottabban nőtt. Henderson és mtsai (32) ugyancsak a tumorról szembeni rezisztencia és DTH reaktivitás elkülönülését tapasztalták.

Az ellentmondó irodalmi adatok indokolták, hogy a tumorról szembeni rezisztencia és lokális DTH reaktivitás összefüggésének kérdésével mi magunk is foglalkozzunk. Regresszor egerekben az immunogén tulajdonságú feltárt tumorsejtszuspenzióval (amellyel tumorról szembeni rezisztenciát lehetett kelteni, sőt amely immunterápiás hatásúnak is bizonyult), specifikus lokális lábmegvastagodási reakciót tudtunk kiváltani. Ezt a reakciót időbeli lefolyása (lásd a 3.2.1.1. fejezetben) és ATS-sel való gátolhatósága (lásd a 3.3.2. fejezetben) alapján DTH reakciónak tekintjük. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy azokon a regresszor állatokon, amelyekben közvetlenül a tumorregresszió után, illetve az első tumoroltás után 4 hónappal (lásd a 3.1.3. fejezetben), továbbá 1 évvel (nem közölt eredmény) igen erős tumorról szembeni rezisztenciát lehetett kimutatni, ki tudjuk-e váltani a lokális DTH reakciót. Valamennyi ilyen regresszor csoportban hasonló intenzitású lokális DTH reakciót mértünk, tehát a tumorantigénekkal szembeni lokális DTH reaktivitás ugyanúgy tartósan fennáll, mint a tumorról szembeni rezisztencia (lásd a 3.2.1.2. fejezetben).

Azokat a regresszor egereket, amelyekben a tumoroltás után

1 évvel váltottuk ki a DTH reakciót, ismételt kiváltásoknak vetettük alá, azt vizsgálva, hogy így lehet-e a reakciót fokozni (lásd a 3.2.1.3. fejezetben). Az első kiváltás egyben a gazdaszervezetnek a tumorantigénekkel való újbóli találkozását is jelentette, aminek következtében a második kiváltáskor a DTH reakció több mint kétszeresre való fokozódását észleltük. A regresszor egereken a rezisztenciakeltő képessége alapján a TATA-t tartalmazó feltárt tumorsejtszuspenzió tehát a lokális DTH reaktivitást fokozni képes, hasonlóképpen ahhoz, ahogy azt az élő tumorsejtek ip újraoltása esetén tapasztaltuk. Ez utóbbi esetben az állatok egyidejűleg igen erősen rezisztensnek bizonyultak a tumor növekedésével szemben is (lásd a 3.3.2. fejezetben). Az eddigiekben tárgyalt, regresszor egereken kapott eredményeink a tumorról szembeni rezisztencia és a DTH reaktivitás összefüggésére utalnak.

Megvizsgáltuk ezenkívül azt is, hogy a tumoros állatokon is kimutatható-e a lokális DTH reakció (lásd a 3.2.2. fejezetben). A tumoroltás utáni különböző időpontokban végzett kiváltásokkal megállapítottuk, hogy az élő tumorsejtekkel történt találkozás után már igen korán kimutatható a DTH reakció, amely maximumgörbét leírva, a tumornövekedés előrehaladottabb állapotában ismét csökkenést mutatott (lásd a 3.2.2.1. fejezetben). A lokális DTH reakció intenzitása tehát a tumornövekedés különböző fázisaival is kapcsolatba hozható, mint ahogy azt mások is tapasztalták (53, 54). A nagy tumorú, később elhulló állatokon tapasztalt reaktivitáscsökkenés oka a tumorról szembeni celluláris effektor mechanizmusok kimerülése vagy szuppresszor

mechanizmusok előtérbe kerülése lehet.

A tumoroltás utáni 14. napon a 20% körüli átlagos DTH reaktivitás széles tartományban megoszló egyedi értékekből adódott (lásd a 3.2.2.2. fejezetben). Az átlag feletti DTH reaktivitású tumoros állatokban később visszafejlődtek a tumorkok, az átlag alatti reaktivitásúaknak kétharmada pedig a későbbiekben elhullott. A tumoroltás után a 14. napon tehát - akkor, amikor az állatok már viszonylag egységesen nagy tumort viseltek, de a "klinikai" állapotuk még nem volt leromlott - a DTH reaktivitás nagysága alapján meg lehet jósolni az állatok további sorsát. Ez annál is inkább figyelemre méltó, mivel rákos betegeken is beszámoltak saját tumorról szemben kiváltható lokális DTH reakcióról. Ennek prediktív értékével kapcsolatban azonban megoszlanak a vélemények (30, 55, 56).

Kísérleti adataink szerint szoros összefüggést találtunk a tumorról szembeni rezisztencia és a tumorantigénnel kiváltható DTH reakció között. Eredményeink alapján felvetődik annak a lehetősége is, hogy nem pusztán párhuzamosságról van szó, hanem a DTH reaktivitás szerepet játszhat az A/Ph MC.S1. tumorról szembeni immunológiai védekezésben. Mindenesetre a tumorantigénnel szembeni lokális DTH reakció mérése alkalmasnak látszik a daganatellenes rezisztencia fokának megítélésére, nemcsak a tumorról előzetesen szenzibilizált egereken, hanem esetleg diagnosztikai célzattal a tumoros állatokon is.

4.3. A szisztémás és lokális DTH reakció összefüggése

Az Eredmények 3. fejezetében a tumorantigénnel szembeni szisztémás DTH reakció jelenségére vonatkozó megfigyeléseinket írtam le. A tumorrall szembeni hiperimmun állapot előidézése céljából sorozatos ip oltásokat terveztünk regresszor egereken. Ehhez olyan állatokat választottunk, amelyek már kétszer át-estek sc tumornövekedésen és regresszió (sc kétszer "immunizált" egerek), és feltételeztük róluk, hogy az ip tumornövekedéssel szemben is ellenállnak. Ezeket az egereket először 10^6 élő tumorsejttel ("szenzibilizáló" oltás) újraoltottuk. Az egerek az ip tumornövekedéssel szemben is védettek voltak, ez igen erős szisztémás tumorelles rezisztenciára utal. Amikor a szenzibilizáló oltás után 4 héttel még nagyobb tumorsejtdózissal (5×10^6 ip) oltottuk az állatokat ("kiváltó" oltás), váratlanul a kiváltás után egy nappal kifejlődő, a későbbiekben elhullásokhoz is vezető szisztémás túlérzékenységi reakciót tapasztaltunk. Az egerek shockban pusztultak el, nem pedig tumornövekedés következtében. A kísérlet megismétlésekor ugyanezt az eredményt kaptuk. A továbbiakban a kísérleti körülmények egyszerűsítése céljából a sc csak egyszer immunizált állatokon vizsgáltuk meg a reakció kiválthatóságát. Megállapítottuk, hogy sem az ip daganatnövekedéssel szembeni rezisztencia foka, sem pedig a négy hét múlva kiváltott szisztémás reakció súlyossága nem tért el a sc kétszer immunizált egereken észleltektől (lásd a 3.3.1. fejezetben).

Egy további kísérletben azt vizsgáltuk, hogy ez a

szisztémás túlérzékenységi reakció befolyásolható-e a kiváltás előtt végzett ATS-kezeléssel, valamint azt, hogy lehet-e összefüggést találni a lokális DTH reakció és ezen szisztémás túlérzékenységi reakció között (lásd a 3.3.2. fejezetben). Ebben a kísérletben a szisztémásan kiváltott, ATS-sel nem kezelt csoportban tendenciájában az előzőekhez hasonló eredményeket kaptunk: a kiváltás után kialakultak a súlyos szisztémás reakció "klinikai" tünetei. Ebben a kísérletben a sc immunizálás 10^4 élő tumorsejttel történt, amely dózis kisebb mértékű tumornövekedést idéz elő, szemben az előző kísérletben alkalmazott 10^6 tumorsejttel. Elképzelhető, hogy a reakció intenzitásában észlelt eltérés erre a különbségre vezethető vissza, bár az ilyen egerek daganattal szembeni rezisztenciája nem különbözött a 10^6 tumorsejttel oltottakétól. Ugyanílyen egereken - a szisztémás reakció kiváltásával párhuzamosan - intenzív lokális DTH reakciót is sikerült kimutatnunk. Az ATS-kezelés mind a szisztémás mind a lokális reakció intenzitását jelentősen csökkentette, de egyiket sem szüntette meg teljesen. Ismeretes, hogy az ATS in vivo specifikusan a T-sejtek közvetítette immunválaszokat gátolja (35). Ennek alapján a szisztémás túlérzékenységi reakciót ugyanúgy, mint a lokális reakciót a T-sejtek működésén alapuló, kóros mértékben fokozódott celluláris immunválasznak tekinthetjük.

Azt, hogy a szisztémás reakciót nem a hiperimmun állatokban gyorsan elpusztuló daganatsejtekből esetleg felszabaduló "toxikus" anyagok idézik elő, alátámasztják azok az eredmények, melyek szerint a tumorsejtek ultrahangos lizátuma még nagy

dózisban ($2,5 \times 10^7$ feltárt tumorsejt ip) sem okoz semmiféle tünetet normál egereken. Citotoxikus effektor sejteket nem tudtunk kimutatni még a hiperimmun állatokban sem; komplement-függő citotoxikus ellenanyagok megjelennek ugyan a hiperimmunizálás során, de titerük alacsony (nem közölt eredmények).

A kísérleti rendszerünkben tapasztalt shock okaként a tumorantigénekkal szemben a sorozatos immunizálás során kialakult, időbeli lefolyása alapján DTH-nak imponáló reakciót feltételezünk. Alátámasztják ezt a feltevésünket a szisztémás reakció és a lokális DTH reakció párhuzamosságai. A szisztémás reakció magas fokú daganatellenes rezisztenciájú állatokon jelenik meg, a lokális reakció intenzitása ugyanilyen állatokon éri el a maximumát. Időbeli lefolyásuk szembeötlően hasonlít egymásra. Mindkét reakció ATS-sel gátolható, gátolhatóságuk mértéke közel egyforma. Mindezek arra utalnak, hogy feltehetően alapvetően azonos mechanizmusokon, mégpedig celluláris immunreakciókon alapuló, késői típusú túlérzékenység kétféle megnyilvánulási formájáról van szó.

Mikrobiális antigénekkal szembeni szisztémás DTH reakcióval kapcsolatos közlések fellelhetők ugyan (57), a tumorantigénekkal szembeni szisztémás DTH reakcióra vonatkozó közleményt azonban a rendelkezésünkre álló irodalomban nem találtunk.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinket metilkolantrénnel A törzsű egérben indukált, ascites formában fenntartott, erős tumorhoz asszociált transzplantációs antigénnel rendelkező fibrosarcomával végeztük szingén egerekben.

A tumor immunogenitására vonatkozó vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a mitomycin C-vel való blokkolás, illetve ultrahanggal történt feltárás során a tumorsejtek rezisztenciakeltő képességüket nem veszítik el. A rezisztenciakeltés eredményessége szempontjából nincs különbség aszerint, hogy a "tumorantigént" élő, integrált (de osztódásukban gátolt) tumorsejtek, illetve ultrahanggal feltárt tumorsejtek (szubcelluláris partikulumok) formájában használjuk immunizálásra. A tumorsejt lizátummal keltett rezisztencia erős és tartós, de elsősorban lokális jellegű. Bizonyos kísérleti körülmények között a feltárt tumorsejtekkel kezelt egerekben rezisztenciakeltő hatás helyett a tumornövekedés fokozódása mutatható ki. Tumoros állatokon a feltárt tumorsejtek bevitele immunterápiás hatású: az esetek jelentős részében az egyébként halálos kimenetelű tumornövekedés visszafordítható.

A tumorról szemben rezisztens regresszor állatokon a tumorsejtlizátummal lokális DTH reakciót lehet kiváltani. A reakció a tumorról történt első találkozás után 1 évvel is kimutatható, tehát ugyanolyan tartósan fennáll, mint a tumorról szembeni rezisztencia. Feltárt tumorsejtekkel történt emlékeztető oltással regresszor egereken fokozni lehet a DTH

reaktivitást, hasonlóan ahhoz, ahogy azt az élő tumorsejtek ip emlékeztető oltása után tapasztaltuk.

Tumoros állatokban a tumoroltás után már korán kimutatható a lokális DTH reaktivitás, amely a tumornövekedés során maximumgörbét ír le. A reakció intenzitása a tumornövekedés különböző stádiumaival kapcsolatba hozható. Meghatározása alkalmasnak látszik a daganatos betegség kimenetelének előrejelzésére is.

Élő tumorsejtekkel ip szenzibilizált, erős tumorelleses rezisztenciát mutató regresszor egerekben az állatok egy részének elhullását eredményező szisztémás túlérzékenységi reakciót, illetve igen intenzív lokális DTH reakciót lehet kiváltani. A szisztémás túlérzékenységi reakciót időbeli lefolyása és ATS-sel való gátolhatósága alapján ugyancsak DTH reakciónak tartjuk.

Kísérleteinkben szoros összefüggést találtunk a tumoral szembeni rezisztencia és a tumorantigénnel kiváltható késői típusú túlérzékenységi reakció között. Ez arra is utalhat, hogy a DTH reaktivitás szerepet játszik a tumoral szembeni rezisztenciában.

A dolgozatban leírt eredmények alapján kísérleti rendszerünket a tumornövekedést gátló, illetve fokozó immunológiai mechanizmusok vizsgálatára, továbbá immundiagnosztikai és immunterápiás eljárások kidolgozására egyaránt alkalmasnak véljük.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hokama, Y. and R.M. Nakamura: Immunology of Cancer. In: Immunology and Immunopathology, p. 415. (Ed. by: Y. Hokama and R.M. Nakamura), Little, Brown and Company, Boston (1982).
2. Byers, V.S. and R.W. Baldwin: Tumor Immunology. In: Basic and Clinical Immunology, 2nd ed. p. 283. (Ed. by: H.H. Fudenberg, D.P. Stites, J.L. Caldwell and J.V. Wells), LANGE Medical Publications, Los Altos (1978).
3. Foley, E.J.: Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumours in mice of the strain of origin. Cancer Res., 13, 835 (1953).
4. Möller, G. and E. Möller: Immunological surveillance against neoplasia. In: Immunological Aspects of Cancer, p. 206. (Ed. by: J.E. Castro), MTP Press Limited, Lancaster (1978).
5. Thomas, L.: Discussion. In: Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitivity, p. 529. (Ed. by: H.S. Lawrence), Hoeber-Harper, New York (1959).
6. Burnet, F.M.: Immunological surveillance in neoplasia. Transplant. Rev., 7, 3 (1971).
7. Baldwin, R.W.: Immunity to methylcholanthrene-induced tumors in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumor. Br. J. Cancer, 9, 652 (1955).
8. Prehn, R.T. and J.M. Main: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Nat. Cancer Inst., 18, 769 (1957).

9. Gold, P. and S.O. Freeman: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.*, 122, 467 (1956).
10. Bloom, H.J., N.W. Richardson and J.R. Field: Host resistance and survival in carcinoma of the breast. *Brit. Med. J.*, 2, 181 (1970).
11. Kelly, B.S. and J.G. Levy: Purification of a protein associated with human bronchogenic squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 39, 224 (1979).
12. Hellström, I., K.E. Hellström, H.O. Sjögren and G.A. Warner: Serum factors in tumor-free patients cancelling the blocking of cell-mediated tumor immunity. *Int. J. Cancer*, 8, 185 (1971).
13. Hellström, K.E., I. Hellström, K. Nelson, J.W. Forstrom and G.T. Nepom: Suppressor factors in tumor immunity. *Transplant. Proc.*, 2, 470 (1984).
14. Baldwin, R.W. and R.A. Robins: Factors interfering with immunological rejection of tumours. *Br. Med. Bull.*, 32, 118 (1976).
15. Herberman, R.B. and H.T. Holden: Natural cell mediated immunity. *Adv. Cancer Res.*, 27, 305 (1978).
16. Zákány, J., G. Chihara and J. Fachet: Effect of lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic hosts. *Int. J. Cancer*, 25, 371 (1980).
17. Zákány, J., G. Chihara and J. Fachet: Effect of lentinan on the production of migration inhibitory factor induced by syngeneic tumor in mice. *Int. J. Cancer*, 26, 783 (1980).

18. Zákány, J., T. Jánossy, P. Németh, G. Chihara, J. Fachet and G. Petri: Mechanism of the A/Ph MC.S1. tumor graft rejection in syngeneic mice. *Gann*, 74, 712 (1983).
19. Tsuru, S. and K. Nomoto: Effects of PSK on specific tumor immunity to syngeneic tumor cells. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 4, 215 (1983).
20. Natori, T., L.W. Law and E. Appella: Immunochemical evidence of a tumor specific surface antigen obtained by detergent solubilization of membranes of a chemically induced sarcoma. *Neth A. Cancer Res.*, 38, 359 (1978).
21. Pellis, N.R. and B.D. Kahan: Specific tumor immunity induced with soluble materials. restricted range of antigen dose and of challenge tumor load for immunoprotection. *J. Immunol.*, 115, 1717 (1975).
22. Kahan, B.D., T. Tanaka and N.R. Pellis: Immunotherapy of a carcinogen-induced murine sarcoma with soluble tumor specific transplantation antigens. *J. Nat. Cancer Inst.*, 65, 1011 (1980).
23. Wu, R.L. and R. Kearney: Specific tumor immunity induced with mitomycin C-treated syngeneic tumour cells (MCT). Effects of carrageenan and trypan blue on MCT-induced immunity in mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, 64, 81 (1980).
24. Mackannes, G.B.: Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.*, 116, 381 (1962).
25. Loveland, B.E. and I.F.C. McKenzie: Which T-cells cause graft rejection? (Overview). *Transplantation*, 33, 217 (1982).
26. Wang, M.: Delayed hypersensitivity to extracts from primary sarcomata in the autochthonous host. *Int. J. Cancer*, 3, 483 (1968).

27. Oettgen, H.F., L.J. Old, E.P. McLean and E.A. Carswell:
Delayed hypersensitivity and transplantation
immunity elicited by soluble antigens of chemically
induced tumours in inbred guinea-pigs. *Nature*, 220,
295 (1968).
28. Hoy, W.E. and D.S. Nelson: Delayed-type hypersensitivity
in mice after skin and tumour allografts and tumour
isografts. *Nature*, 222, 1001 (1969).
29. Halliday, W.J. and M. Webb: Delayed hypersensitivity to
chemically induced tumors in mice and correlation
with an in vitro test. *J. Nat. Cancer Inst.*, 43,
141 (1969).
30. Stewart, T.H.M.: The presence of delayed hypersensitivity
reactions in patients toward cellular extracts of
their malignant tumors. I. The role of tissue
antigen, nonspecific reactions of nuclear material,
and bacterial antigen as a cause for this
phenomenon. *Cancer*, 23, 1368 (1969).
31. Minami, A., Y. Mizushima, N. Takeichi, M. Hosokawa and
H. Kobayashi: Dissociation of anti-tumor immune
responses in rats immunized with solubilized tumor-
associated antigens from a methylcholanthrene-
induced fibrosarcoma. *Int. J. Cancer*, 23, 358 (1979).
32. Henderson, D.C., D. Parker and J.L. Turk: Dissociation
between tumour resistance and delayed-type hyper-
sensitivity to tumour-associated antigens in the
mouse. *Immunology*, 39, 1 (1980).
33. Silvers, W.K.: Definition and maintenance of inbred strains.
In: Transplantation of Tissues and Cells, pp.133-143.
(Ed. by: R.E. Billingham and W.K. Silvers), The
Wistar Institute Press, Philadelphia (1961).

34. Levey, R.H. and P.B. Medawar: Some experiments on the action of antilymphoid antisera. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 129, 164 (1966).
35. Végh, P.: Antilymphocytá savók előállítása és alkalmazása a transzplantációs immunreaktivitás befolyásolására. Kandidátusi értekezés. Szeged (1981).
36. Klein, G., H.O. Sjögren, E. Klein and K.E. Hellström: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, 20, 1561 (1960).
37. Old, L.J., E.A. Boyse, D.A. Clarke and E. Carswell: Antigenic properties of chemically induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 101, 80 (1962).
38. Benjamini, E., S. Fong, C. Erickson, C.Y. Leung, D. Reunick and R.J. Scibienski: Immunity to lymphoid tumors induced in syngeneic mice by immunization with mitomycin C-treated cells. *J. Immunol.*, 118, 685 (1977).
39. Rogers, M.J. and L.W. Law: Sonic immunogenic and biochemical properties of tumor associated antigens (TATA) obtained in soluble form or solubilized from two methylcholanthrene-induced sarcomas, Meth A and CI-4. *Int. J. Cancer*, 27, 789 (1981).
40. Ransom, J.H., C.L. Schengrund and G.L. Bartlett: Solubilization and partial characterization of a tumor-rejection antigen from an ultraviolet light-induced murine tumor. *Int. J. Cancer*, 27, 545 (1981).
41. Pellis, N.R. and B.D. Kahan: Methods to demonstrate the immunogenicity of soluble tumor specific transplantation antigens. I. The immunoprophylaxis assay. *Methods Cancer Res.*, 13, 291 (1976).

42. Rao, V.S. and B. Bonavida: Detection of soluble tumor-associated antigens in serum of tumor bearing rats and their immunological role in vivo. Cancer Res., 37, 3385 (1977).
43. Hellström, I., K.E. Hellström and H.O. Sjögren: Serum mediated inhibition of cellular immunity to methylcholanthrene-induced murine sarcomas. Cell. Immunol., 1, 18 (1970).
44. Kobrin, B.J., D. Naor and B.Y. Klein: Immunogenicity of subcellular fractions and molecular species of MuLV induced tumors. II. Stimulation of syngeneic anti-tumor cell-mediated immune responses by subcellular fractions and molecular species of the Rauscher-virus-induced RBL 5 tumor. J. Immunol., 126, 1874 (1981).
45. Simmons, R.L. and A. Rios: Immunotherapy of cancer: Immunospecific rejection of tumors in recipients of neuraminidase-treated tumor cells plus BCG. Science, 174, 591 (1971).
46. Eilber, F.R., D.L. Morton, E.C. Holmes, F.C. Sparks and K.P. Ramming: Adjuvant immunotherapy with BCG in treatment of regional lymph node metastases from malignant melanoma. N. Engl. J. Med., 294, 237 (1976).
47. Wespic, H.T., B. Zbar, H.J. Rapp and T. Borsos: Systemic transfer of tumor immunity: delayed hypersensitivity and suppression of tumor growth. J. Nat. Cancer Inst., 44, 955 (1970).
48. Abe, S., M. Yamazaki and D. Mizuno: Antitumor immunity after surgical removal of 3-methylcholanthrene-induced murine tumors: correlation between resistance and delayed hypersensitivity reaction. Gann, 69, 323 (1978).

49. Abe, S., K. Takahashi, M. Yamazaki and D. Mizuno: Assembly of transferred normal spleen cells in situ at sites eliciting the delayed hypersensitivity reaction to tumor antigens in mice. *Gann*, 75, 442 (1984).
50. Macek, C.M., B.D. Kahan and N.R. Pellis: Delayed hypersensitivity to crude and partially purified murine-tumor-specific transplantation antigens and allo-antigens utilizing the footpad swelling assay. *J. Immunol.*, 125, 1639 (1980).
51. LeGrue, S.J., J.P. Allison, C.M. Macek, B.D. Kahan and N.R. Pellis: Immunobiological properties of 1-butanol extracted cell surface antigens. *Cancer Res.*, 41, 3956 (1981).
52. Kearney, R. and P. Harrop: Modulation of anti-tumor immunity induced by syngeneic mitomycin C-treated murine tumour cells. *Int. J. Cancer*, 34, 255 (1984).
53. Jasnis, M.A., S. Klein, Y.P. Bonaparte, S.O. Daga and R.R. Pirotsky: Delayed hypersensitivity in tumor-bearing mice. In vitro activation of "eclipsed" spleen cells. *Int. J. Cancer*, 20, 394 (1977).
54. Paranjpe, M.S. and C.W. Boone: Kinetics of the anti-tumor delayed-hypersensitivity response in mice with progressively growing tumors: stimulation followed by specific suppression. *Int. J. Cancer*, 13, 179 (1974).
55. Oren, M.E. and R.B. Herberman: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to membrane extracts of human tumour cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 9, 45 (1971).

56. Hollinshead, A.C., W.T. Jaffurs, L.K. Alpert, J.E. Harris and R.B. Herberman: Isolation and identification on soluble skin-reactive membrane antigens on malignant and normal human breast cells. Cancer Res., 34, 2961 (1974).
57. Uhr, J.W. and M.W. Brandriss: Delayed hypersensitivity. IV. Systemic reactivity of guinea pigs sensitized to protein antigens. J. Exp. Med., 108, 905 (1958).

Köszönetnyilvánítás

Tisztelettel adózom Petri Professzor emlékének. Petri professzor úr teremtette meg azokat a körülményeket, amelyek oly sok embernek adták meg a lehetőséget a munkára.

Köszönettel tartozom Végh Pál docensnek, aki bizalmat szavazott nekem, amikor munkatársává fogadott, és aki iránymutató szakmai és nem szakmai tanácsaival segítette előrehaladásomat.

Köszönettel tartozom Jánossy Tamás tudományos munkatársnak, aki megpróbálta megtanítani nekem, hogyan kell pontosan és eredményesen dolgozni. Elsősorban neki köszönhetem azt, amit most "tumorimmunológiából" tudok.

Köszönettel tartozom az asszisztensnőknek, akik nélkül aligha lehetett volna elvégezni ezeket a munkákat és akik kialakítják azt a szép emberi környezetet, ahová minden reggel meg lehet érkezni.