

DANIEL RUKAVINA

MEHANIZAM IMUNOLOŠKE REAKTIVNOSTI
NA TRANSPLANTACIJSKE STIMULE
U PERINATALNOJ DOBI ŠTAKORA

M a g i s t e r s k i r a d

MEDICINSKI FAKULTET

RIJEKA

1968

Ovaj magisterski rad izrađen je u Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Zahvaljujem Upravi fakulteta što mi je omogućila pohađanje nastave III stupnja i materijalno pomogla opremanje radnje.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru doc. dr Šimi Vlahoviću, predstojniku Zavoda za fiziologiju, na pomoći u izboru teme, a posebno na vrijednim savjetima i kritičkim primjedbama u svim fazama izrade magisterskog rada.

Zahvaljujem se svim kolegama i osoblju Zavoda za fiziologiju na razumijevanju i stimulaciji u toku rada. Posebno se zahvaljujem Viktoriji Petrešević, službenici Zavoda za fiziologiju, na požrtvovnoj pomoći u crtanju slika, pisanju matrica i tehničkoj opremi radnje; i prijatelju Nikoli Mikić, laborantu Zavoda za fiziologiju, na izvanrednoj suradnji u eksperimentalnoj fazi rada.

Rijeka, lipnja 1968.

Daniel Rukavina

S A D R Ź A J

I O P Ā I D I O

STRANICA

1. ZNAĀAJ PERINATALNE DOBI.....	1
2. REAKTIVNOST NA ALOGENA TKIVA U NEONATALNOM PERIODU.....	3
A/ Aktivno steĀena imunološka tolerancija...	4
a) Genetske razlike.....	6
b) Broj injiciranih stanica.....	8
c) Dob primaoca.....	9
d) Put injiciranja antigena.....	10
e) Vrste antigena.....	10
B/ Homologna bolest.....	11
a) Sekundarna bolest.....	13
b) Bolest krŹljanja ("Runt disease")....	13
C/ Mehanizam nastanka tolerancije i bolesti krŹljanja.....	16
3. CELULARNA I HUMORALNA REAKTIVNOST NA TRANSPLANTACIJSKE ANTIGENE.....	21
4. SAZRIJEVANJE IMUNOLOŠKE REAKTIVNOSTI U PERINATALNOJ DOBI.....	25
5. IMUNOLOŠKI ODNOSI IZMEĀU MAJKE I ĀEDA.....	29

II O B R A Z L O Ź E N J E T E M E	34
--	----

III E K S P E R I M E N T A L N I D I O

1. MATERIJAL I METODE.....	36
A/ Pokusne životinje.....	36
B/ Anestezija.....	36
C/ Presađivanje kožnog kalema.....	37
D/ Priprema suspenzije splenocita.....	40
E/ Način injiciranja stanica.....	41
F/ Određivanje vijabilnosti stanica.....	42
G/ Test hemaglutinacije (Metoda sa dekstranom).....	42
H/ Odvajanje seruma.....	44
I/ Statističke metode.....	44
2. ANALIZA HOMOLOGNE BOLESTI.....	47
A/ Materijal i metode.....	47
B/ Rezultati.....	47
C/ Diskusija.....	57
3. PRIJENOS TRANSPLANTACIJSKOG IMUNITETA SA MAJKE NA ČEDO.....	67
A/ Materijal i metode.....	67

	STRANICA
a) Izbor životinja.....	67
b) Plan pokusa.....	67
c) Kontrolne grupe.....	69
d) Kategorizacija stupnja tolerancije roditeljskih kalema.....	70
B/ Rezultati.....	71
C/ Diskusija.....	83
a) Preživljavanje roditeljskih kalema.....	84
b) Incidencija bolesti kržljanja.....	94
c) Hemaglutinacijska reaktivnost krvnog seruma mladunčadi.....	96
IV ZAKLJUČNI PREGLED	99
V LITERATURA	103

I O P Ć I D I O

U životu mladog sisavca perinatalna dob predstavlja period najburnijeg razvoja. U to vrijeme mladi se organizam razvija i raste dok ne dostigne takav stupanj anatomske i funkcionalne organizacije, koji će mu omogućiti preživljavanje u vanjskoj sredini. Iako se može reći da u perinatalnoj dobi nastupa definitivna organizacija nerijetko se događa, da je reaktivnost novorođenčeta na stimule vanjske sredine slabo izražena ili neadekvatna, ako to upoređujemo sa odraslom životinjom. Reaktivnost koja se javlja u oba dijela perinatalne dobi, tj. u prenatalnom i novorođenačkom periodu, prema tome je specifična za taj životni period. Ova je pojava odavno poznata i privlačila je interes brojnih istraživača.

U prenatalnoj dobi fetus je zaštićen od nepovoljnih uvjeta vanjske sredine, ali se cijeli organizam intenzivno priprema, da bi olakšao adaptaciju na promjenu sredine. Čitav niz procesa dosiže u kasnom prenatalnom periodu takav nivo, koji se nakon poroda ne može nikada ponoviti. Tako napr. fetus štakora u zadnjoj fazi trudnoće (16 - 22 dana) poveća svoju tjelesnu težinu skoro za osam puta, u odnosu na težinu koju postiže 15-og dana. U zadnjoj fazi fetalnog razvoja glodavca počinju funkcionirati i endokrine žlijezde, pa tako i osovina hipofiza - nadbubrežna žlijezda (Jacquot, 1959.). Osim snažne i brze izgradnje vlastitih struktura (anabolizam), metabolizam je u tom periodu usmjeren i na stvaranje rezervnih tvari (napr. jetrnji glikogen) koje se neposredno nakon okolta upotrebljavaju u energetske svrhe (Eberhardt i sur., 1965. ;

Rukavina i Eberhardt, 1966.; Dawkins, 1963.). To ukazuje, da je mladunče sposobno i za brzu metaboličku adaptaciju na promjene okoline. Iako se zna, da osovina hipofiza - nadbubrežna žlijezda funkcionira u vrijeme neposredno pred porod, mnogi istraživači smatraju da neonatus štakora ne može reagirati na vanjske stres-stimule aktiviranjem ove osovine. Prema nekima razlog bi bio u nemogućnosti izlučivanja ACTH (Milković i Milković, 1959.), a prema drugima već postojeća hiperfunkcija osovine izazvana porodom i promjenom sredine (Gregoire, 1957.). Naši prethodni radovi (Rukavina i Eberhardt, 1966.) navode nas na mišljenje da bi kortikalni hormoni imali relativno malo značenje u reakciji na vanjske stimule, čak i onda kada bi osovina hipofiza - nadbubrežna žlijezda mogla normalno funkcionirati.

Spomenute metaboličke i endokrine osobitosti, a posebno reaktivnost na vanjske stimule u perinatalnoj dobi, potakle su nas na istraživanja koja se odnose i na preinačenu aktivnost imunoloških mehanizama u toj dobi. Može se čak i općenito smatrati, da su takve funkcionalne specifičnosti baš karakteristične za tu dob, jer se u odraslom organizmu pod normalnim uvjetima nikada ne sreću.

Ovaj rad se odnosi na istraživanja transplantacijske imunologije i to posebno na transplantaciju alogenih stanica u neonatalnom periodu i prijenos imuniteta na alogena tkiva u perinatalnoj dobi. U daljnjem tekstu se iznose podaci koji se odnose na reaktivnost na alogena tkiva u neonatalnom periodu i na transplantacijsku imunologiju općenito.

I 2. REAKTIVNOST NA ALOGENA TKIVA U NEONATALNOM PERIODU

Postoji znatna razlika u imunološkoj reaktivnosti između odraslog organizma i fetusa, odnosno novorođenčeta. Imunološki stimuli, u obliku stranih antigena, koji u normalnoj odrasloj životinji dovode do imuniteta, u fetusu ili novorođenčetu mogu ponekad izazvati isti tip reakcije kao u odraslog, no mnogo češće nastaje kvalitetno posve drukčija reakcija, ponekad je čak i odsutna, a može nastupiti i imunološka tolerancija. Situacija je naročito komplicirana ako se injiciraju imunokompetentne stanice, jer se prema njima u primaocu može razviti tolerancija, ali i one same mogu imunološki djelovati protiv primaoca i dovesti čak do bolesti.

Još prije nego su utvrđene bitne razlike u imunološkoj reaktivnosti, na strane stanice i tkiva, između odrasle osobe i fetusa, odnosno novorođenčeta, bilo je mišljenja koja su na takve mogućnosti i ukazivala (Owen, 1945.; Burnet i Fener, 1949.). Međutim, ovo područje transplantacijske imunologije dobija snažni poticaj tek otkrićem fenomena aktivno stečene imunološke tolerancije.

I 2.A. Aktivno stečena imunološka
 tolerancija

Injiciranjem mladunčeta u perinatalnoj dobi, stranim antigenima, može se u nekim slučajevima izazvati imunološku nereaktivnost organizma prema tim antigenima . U tom slučaju govorimo o aktivno stečenoj imunološkoj toleranciji.

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

Većina stranih antigena, koji su sposobni da induciraju stanje imunološke tolerancije u mladom organizmu, u pravilu može u odrasloj dobi inducirati imunitet. Naprotiv, od svih antigena koji u odraslom organizmu mogu dovesti do imuniteta, tek je manji dio u stanju izazvati toleranciju u mladunčeta.

Uobičajeni postupak za izazivanje tolerancije u sisavaca, ptica i amfibija sastoji se u injiciranju alogenih stanica u perinatalnoj dobi (Billingham,1961b; Hildemann i Hass,1962.; Hašek i sur.,1958.). Toleranciju je moguće izazvati, u ovom periodu, jer još nije funkcionalno sazrela sposobnost mladog organizma da imunološki reagira, pa dolazi do zatajivanja mehanizma imunološkog odgovora. Burnett i Fenner (1949.) su pretpostavili da imunokompetentne stanice razvijaju sposobnost prepoznavanja vlastitih antigena u toku

embrionalnog života mladunčeta. Po njihovom mišljenju izlaganje organizma, u tom periodu, velikoj dozi stranog antigena, dovelo bi do tolerancije, jer mlada životinja nije još u toj ranoj fazi svog razvoja sposobna da razlikuje tuđe od vlastitog. Prvi dokaz tolerancije dao je Owen (1945.). On je primjetio da su heterozigotni blizanci goveda često eritrocitne himere, tj. svaki od blizanaca ima u svojoj krvi mješavinu vlastitih eritrocita i eritrocita koji pripadaju drugom blizancu. Ovaj se nalaz objašnjava izmjenom krvi placentarnim anastomozama, pri čemu dolazi do mješanja eritropoetskih stanica, koje u novom domaćinu nesmetano nastavljaju sa produkcijom eritrocita. Ovakve su životinje ujedno tolerantne na hematopoetsko tkivo drugog blizanca, a mogu biti tolerantne i na njegov kožni kalem ili druga presađena tkiva (Owen, 1945.; Stone i sur., 1965.). Eritrocitne himere pronađene su u par slučajeva i u čovjeka, a Woodruff i Lennox (1959.) su izmijenili jednom paru kožne kaleme i dokazali toleranciju u oba partnera.

Eksperimentalno su prvi put izazvali toleranciju Billingham i sur. (1953.), injiciranjem fetusa miševa soja CBA, sa stanicama slezene, bubrega i testisa miševa soja A. Slične rezultate dobio je Hašek (1953.) na pilićjim embrionima, spajajući embrione parabiotskom vezom. Naknadno testiranje sa kožnim kalemom davaoca stanica, u odrasloj dobi, pokazalo je, da se u oba slučaja doista razvila tolerancija.

Slijedećih nekoliko svojstava karakteristično je za

stanje tolerancije : a) odsustvo cirkulirajućih antitijela protiv antigena koji su doveli do tolerancije; b) uspostavljanje imunološke reaktivnosti domaćina i ukidanje tolerantnog stanja, injekcijom imunokompetentnih stanica (Gowland,1965.; Medawar,1962.); c) tolerancija je specifična za injicirane transplantacijske antigene, a tolerantni domaćin može, međutim, i dalje reagirati na druge antigene (Gowland,1965.); d) Tolerancija nije fenomen "sve ili ništa" (Woodruff,1960.): može se javiti u svim stupnjevima od vrlo slabe do potpune tolerancije. U potpuno tolerantne životinje alotransplantat se ponaša kao autotransplantat, a isto se ponašaju i svi naknadni transplantati od istog davaoca.

Na temelju a) odsustva cirkulirajućih antitijela i b) mogućnosti specifičnog ukidanja tolerantnog stanja, Gowland (1965.) i Eichwald (1963.) smatraju, da je tolerancija izazvana centralnim zatajivanjem mehanizma imunog odgovora, a ne blokiranjem aferentnog ili eferentnog puta.

U kojem će se obimu razviti tolerantno stanje ovisi o više faktora :

I 2.A.a. Genetske razlike. Poznavanje genetskih odnosa od posebnog je značenja za razumijevanje osnova tolerancije." Inbred " ili genetski čisti sojevi životinja omogućili su veliki napredak u proučavanju genetskih osnova za odbacivanje i prihvatanje tuđeg tkiva (Billingham i Silvers,1959.).Svi pripadnici jednog čistog soja imaju isti genetski sastav i tkivo bilo kojeg pri-

padnika koja primaju kao vlastito. Jedina razlika može nastupiti ako se kalem mužjaka transplantira na ženku. Odbacivanje u tom slučaju može nastupiti zbog toga, što se na spolnom " Y " kromozomu mužjaka nalaze, ženki nepoznati, antigeni histokompatibilnosti. To je tzv. Eichwald-Silmser-ov fenomen (Eichwald,1963.; Billingham i Silvers,1960.). Geni čija specifični krajnji produkti (tzv. antigeni histokompatibilnosti) mogu izazvati imunni odgovor i dovesti do odbacivanja kalema, nazvani su geni histokompatibilnosti (Eichwald,1963.; Russell i Monaco,1965.; Palm, 1961. i Batchelor,1965.). Ako su neki antigeni histokompatibilnosti prisutni u kalemljenom tkivu, a odsutni u primaocu, doći će do imunog odgovora primaoca, što završava odbacivanjem kalema davaoca (Hašek i sur.,1961.). Međutim, svi antigeni jedne individue, koji su odgovorni za histokompatibilnost, nisu specifični samo za nju.

Broj gena histokompatibilnosti razlikuje se u pojedinim specijes, a često i unutar specijes. Geni histokompatibilnosti smješteni su na različitim lokusima na kromozomima i odgovorni su za preživljavanje alokalema (Hašek i sur.,1961.; Russell i Monaco,1965.; Palm,1961.; Billingham i Silvers,1959. i Popp, 1957.).

Najvažniji je H - 2 gen histokompatibilnosti, smješten na tzv. lokusu H - 2 unutar devete vezne grupe, tj. grupe gena na istom kromozomu koji se zajedno nasljeđuju. Najbolje je istražen H-2 lokus u miša, jer on determinira ne samo najjače transplantacijske antigene, već i stanične antigene na površini

eritrocita i drugih stanica, pa ih nije bilo teško identificirati serološkim metodama. Slabi antigeni histokompatibilnosti vezani su na H - 1 i H - 3 lokus u miša, a nalazimo ih i u drugih specijes (Eichwald, 1963.; Billingham i Silvers, 1960.; Batchelor, 1965.).

Prema tome, toleranciju će u miša biti lakše izazvati ukoliko su razlike na H-1 ili H-3 lokusu, a ne na H-2 lokusu. Općenito se može reći, da će toleranciju biti to lakše inducirati, što su razlike u histokompatibilnosti između davaoca i primaoca slabije.

I 2.A.b. Broj injiciranih stanica, koji je potreban za indukciju tolerancije, ovisi o genetskim razlikama između davaoca i primaoca, i o dobi primaoca. Što su genetske razlike između davaoca i primaoca manje (H-1 i H-3 lokus), to je potreban manji broj stanica da se izazove tolerancija (Gowland, 1965.). I reaktivnost na slabe antigene pojavljuje se u razvoju mlade životinje kasnije od reaktivnosti na jake antigene. To može značiti da je osjetljivost novorođene životinje na jake antigene nešto iznad, a na slabe antigene nešto ispod praga reaktivnosti (Medawar, 1962.).

Efikasnost određenog broja stanica, u izazivanju tolerancije, ovisi i o specijes na kojoj se pokusi izvode. Tako napr. u štakora i miša tolerancija se može izazvati postnatalno, a u kunića samo u ranoj fazi gestacije, bez obzira na broj injiciranih stanica (Porter, 1960.). Važno je i to, da li se daje određeni broj stanica na čitavu životinju ili se uzima doza prema tjelesnoj težini (WAD - weight adjusted dose). Postoji veća

vjerojatnost da će se primjenom WAD-a izazvati tolerancija (Gowland, 1965.; Billingham, i sur. 1960. i 1962.; Brent i Gowland, 1961. i 1962.).

I 2.A.c. Dob primaoca. Prvobitno se općenito smatralo da je novorođenačka dob kritički preduvjet za uspješno induciranje tolerancije. Međutim, podnošljivost tuđeg tkiva može se iznimno postići čak i u odrasloj životinji (Gowland, 1965.). Smatra se, da je mlada individua u stanju imunološke nezrelosti jer posjeduje mnogo manje, apsolutno i relativno, imunokompetentnih stanica. Imunološka nezrelost, međutim, tako izrazito povećava šansu za izazivanje tolerancije, da ne treba biti ispuštena iz definicije tolerancije (Hašek i sur., 1961.). Vjerojatno se ipak ne radi o potpunoj nezrelosti, jer su Howard i suradnici (1962.a i b) pokazali, da novookoćeni miš može biti i senzibiliziran malim brojem stranih stanica. Voisin (1962) pridaje još manje važnosti imunološkoj nezrelosti. Kada su u pitanju žive stanice, on smatra toleranciju aktivnim stanjem u kojem je dvosmjerna imunološka reaktivnost stanica, primaoca i davaoca, u osjetljivoj ravnoteži. Ipak, općenito se smatra, da će neki broj stanica, koji je inače u stanju da izazove toleranciju, biti sve to manje efikasan ukoliko ga se injicira u sve to kasnijim vremenskim intervalima nakon okota.

WAD, međutim, povećava vremenski period kroz koji inokulum može dovesti do tolerancije - u štakora i miša do 6-og dana, - ako su u pitanju jače antigene razlike (Gowland, 1965.; Brent i Gowland, 1961. i 1962.).

Kod slabijih antigenih razlika (napr. ako su razlike samo na H-3 lokusu) čak i injiciranje stanica 20-og dana po okotu može dovesti do visoke tolerancije (McKhann, 1962.). Općenito se može reći, da je šansa za postizanje tolerancije to veća, što je vrijeme između okota i injekcije stanicama kraće.

I 2A.d. Put injiciranja antigena. Billingham (1957.) je injiciranjem istog broja splenocita CBA miševa, u miševu soja A, dobio intravenskim putem 80 % tolerantnih, intraperitonealnim 24 %, a supkutanim 0 %. U štakora je situacija nešto drugačija, utoliko što i intraperitonealni put može biti dovoljno efikasan, vjerojatno zbog toga, što štakor imunološki sporije sazrijeva nego miš, pa ima dovoljno vremena da se stanice davaoca transportiraju iz peritonealne šupljine u krv i konačno smjeste u limfatički aparat primaoca.

I 2.A.e. Vrste antigena. Žive stanice, tj. stanice koje posjeduju svojstvo reprodukcije, najbolji su izvor antigena za indukciju imunološke tolerancije. To su imunokompetentne stanice limfnih čvorova, zatim splenociti i leukociti, stanice koštane srži i u niskom procentu timociti (Billingham, i sur., 1962.; Billingham i Silvers, 1962.). No, postotak tolerantnih životinja može biti znatno smanjen, baš ako se injiciraju stanice limfnih čvorova, jer one mogu izazvati u visokom postotku bolest kržljanja, sa fatalnim ishodom.

Žive stanice imaju prednost, jer su sposobne da se reproduciraju u domaćinu, pa njihovi potomci održavaju tolerantno stanje. To se slaže i sa Medawarovom definicijom tolerancije. Tolerancija inducirana stanicama mezenhimalnog porijekla proteže se

ne samo na kožu, već i na druga tkiva davaoca (Medawar i Russel, 1958.), dok stanice drugih tkiva često daju toleranciju samo na odgovarajuće, transplantirano tkivo (Woodruff i Lennox, 1959.). Iz ovog se može zaključiti da su stanice mezenhimalnog porijekla daleko bogatije na antigenima histokompatibilnosti, nego druge stanice.

Tolerancija se može inducirati i davanjem antigena koje ne nose žive stanice. U tu grupu spadaju antigeni koji se ne mogu reproducirati. Među njih ubrajamo nežive stanice (napr. eritrociti), bjelančevine, bakterijske antigene itd. (Smith, 1961.). Tolerancija na ove antigene je prolazno stanje, ali njeno trajanje može biti produženo ponovljenom administracijom antigena. Tolerantno stanje prestaje, u roku od par dana do 3 tjedna, nakon iščezavanja antigena iz domaćina (Mitchinson, 1959.).

I 2.B. Homologna bolest

Za ishod reakcije nakon transplantacije obično se ističe reaktivnost primaoca, protiv antigena u presađenom kalemu. No, reakcija se može odnositi i na reaktivnost stanica kalema protiv antigena domaćina. Za ovaj drugi slučaj odlučan je sastav samog kalema. Naime, među presađenim stanicama mogu biti i imunokompetentne stanice (stanice koje se u domaćinu mogu reproducirati i protiv njega imunološki djelovati), ili se kalem može sastojati isključivo od stanica koje su prema domaćinu imunološki neaktivne. Reakcija pri kojoj organizam primaoca reagira na unos stranog tkiva ili stanica (kalema), naziva se reakcija domaćina protiv kalema ili HVG reakcija (host-versus-

-graft, angloameričkih autora). Istovremeno i kalemljeno tkivo, ako sadrži imunokompetentne stanice, može reagirati protiv domaćina (GVH ; graft-versus-host reakcija, prema angloameričkim autorima), pa se odvija dvosmjerna reakcija. U nekim slučajevima primalac nije uopće u stanju da reagira protiv unesenih stanica, pa nastaje samo reakcija kalema protiv domaćina (GVH reakcija), koja može imati i letalan ishod. Patološke manifestacije GVH reakcije nazivaju se "homolognom bolešću"^x. Ova bolest nastaje unosom alogenih imunokompetentnih stanica u domaćina, koji je imunološki nereaktivan ili mu je reaktivnost bitno reducirana. Homolognu bolest susrećemo u dva oblika, kao "sekundarnu" bolest i bolest "kržljanja".

x = Prema novoj nomenklaturi izraz "homologni" zamijenjen je izrazom "alogeni", što označava kalem transplantiran između partnera koji pripadaju istoj specijes (Gorer, 1960.; Gorer i sur., 1961.; i Snell, 1964.). U daljnjem tekstu, kad se radi o homolognoj bolesti, zadržati ćemo ipak izraz "homologni", jer se naziv "homologna bolest" udomaćio u transplantacijskoj literaturi, unatoč novoj terminologiji.

I 2.B.a. Sekundarna bolest. nastaje u letalno ozračenih životinja, koje su bile injicirane alogenom koštanom srži, da bi ih se zaštitilo od hematopoetske smrti (Vos i sur., 1959.; Van Bekkum i sur., 1959.; Jutila i Weiser, 1962.). Injicirane stanice repopuliraju koštanu srž i limfatički aparat ozračenog domaćina, te tako spriječavaju ranu smrt unutar 30 dana. Nakon oporavka, međutim, ipak dolazi do razvoja bolesti ("sekundarna" bolest), koja većinom završava letalnim ishodom. Organizam primoca, zračenjem je izgubio sposobnost reagiranja na injicirane stanice, a s obzirom da su među njima prisutne i imunokompetentne stanice, ispunjeni su uvjeti za nastanak GVH reakcije. Sekundarna se bolest ne javlja u životinja koje su liječene izolognom koštanom srži, što ukazuje na njenu imunološku prirodu.

I 2. B.b. Bolest "kržljanja" ("Runt"disease). I prirodno, bez zračenja postoje uvjeti za nastanak GVH reakcije, ako se alogene imunokompetentne stanice injiciraju fetusu ili novorođenoj životinji. Takav mladi organizam, imunološki nezreo, ne može reagirati na unos stranog tkiva, već ga prihvaća kao vlastito (Billingham, 1961.b; Hildemann i Haas, 1962.; Hašek i sur., 1958.). Zbog toga se nakon unosa alogenih imunokompetentnih stanica odrasle individue, u imunološki nezrelo novorođenče, može također razviti homologna bolest, koju u ovom slučaju zovemo bolest "kržljanja" ("Runt" disease - angloameričkih autora).

Za razliku od tolerancije, bolest kržljanja je učestalija kad su genetske razlike između davaoca i primaoca veće, tj. ako se radi o razlikama na H-2 lokusu. Ako su u pitanju jake genetske razlike između davaoca i primaoca razvit će se klasična slika bolesti (Gowland, 1965.; Billingham i sur., 1960. i 1962.; Billingham i Silvers, 1962.; Sinkovics i Howe, 1964.). Injiciranje većeg broja stanica dovodi do većeg postotka oboljelih životinja (Egdahl i sur., 1958.). Svaka injicirana životinja ne mora pokazati sve znakove bolesti. Međutim, kod genetski vrlo srodnih kombinacija miševa injicirana novorođenčad postaju visoko tolerantna, a niti jedan ne pokazuje bilo kakve abnormalnosti u smislu kržljanja (Billingham 1958.). Novorođenčad injicirana manjim brojem stanica, može se oporaviti i nakon kliničke slike bolesti. Životinja koja preživi kliničku sliku bolesti, ne pokazuje u odrasloj dobi niti znakove tolerancije niti znakove pojačane reaktivnosti protiv kalema davaoca (Billingham i sur., 1962.).

Splenociti i limfociti predstavljaju najpotentnije stanice za izazivanje bolesti kržljanja. Mrtve stanice ili žive stanice, koje su različitim procedurama oštećene, ne izazivaju bolest (Siskind i Thomas, 1959.a).

Bolest započinje sa kožnim promjenama koje su karakteristične (Billingham i sur., 1960. i 1962.). Prvo se razvijaju upalne manifestacije na koži uški, repa i distalnih dijelova abdomena, a u kasnijoj fazi prevladava eksfolijacija i stanjivanje kože po čitavom tijelu.

Uporedo dolazi do niza procesa koji dovode do propadanja oboljele životinje. Tjelesna temperatura se snizuje, nekada i za 2°C. Usporuje se porast tjelesne težine, a ponekad dolazi i do pada. Razvija se dijareja, koja ubrzava propadanje i klinički pogoršava opću sliku slabljenja životinje. Često se razvija ascites, a povećana jetra sadrži žučkasta područja koagulacione nekroze (Siskind i Thomas, 1959.b).

Slezena je izrazito povećana, u odnosu na kontrolne životinje. Povećanje slezene je to veće, što su veće genetske razlike između davaoca i primaoca (Simonsen, 1960.; Simonsen i Jensen, 1959.). U slezeni bujaju okrugle pironinofilne stanice tipa A (hemocitoblasti), a limfociti iščezavaju iz folikula slezene. Stanice tipa A pokazuju snažnu eritropoetsku aktivnost, koja je u koštanoj srži izrazito deprimirana, a u zadnjoj se fazi bolesti i njihov broj jako smanjuje (Billingham i sur., 1962.).

Na histološkim preparatima limfnih čvorova i slezene primijećuje se nestanak normalne strukture. Timus atrofira zbog inhibicije produkcije timocita, već 4 - 5 dana nakon injekcije alogenih stanica. Broj eritrocita u perifernoj krvi je smanjen, uz pojavu anizocitoze, poikilocitoze i sferocitoze. Broj se leukocita višestruko povećava, naročito kada raste intenzitet drugih promjena (dermatozna i splenomegalija). U koštanoj srži dolazi do jakog pada broja eritropoetskih stanica, a povećanja broja mijelopoetskih. Domaćin je nesposoban da razori unesene stanice, a vlastitom ih genetskom građom stimulira na reakciju.

nante. U embrionalno doba ili neposredno nakon poroda, bit će uništeni klonusi, koji mogu producirati antitijela protiv vlastitih antigena. Ako se u tom periodu unese u organizam strani antigen, on će također uništiti specifičan klonus, na isti način kako to teorija predviđa za "zabranjene" klonuse, koji su bili sposobni da reagiraju protiv vlastitih antigena organizma. Visoki stupanj mutabilnosti, karakteristika je mezenhimalnih stanica. Lederberg (1960.) smatra da je broj mutacija u rasponu 10^{-3} do 10^{-1} po diobi stanice. Ovako visok nivo mutacija dozvoljava mogućnost da se mutacijom obnovi "zabranjeni" klonus, pa se time objašnjava potreba stalnog prisustva antigena za održavanje tolerantnog stanja. Antigen, u ovom slučaju, čeka "u zasjedi" na pojavu eventualne specifične mutacije, da bi uništio mutirane stanice. Ova teorija smatra toleranciju svojstvom cijelog organizma, a ne samo jedne stanice ili populacije stanica.

Loutit (1959.) misli da se zrele stanice, koje produciraju antitijela, regrutiraju čitavog života diferenciranjem iz zametnih stanica. U određenoj fazi sazrijevanja ove stanice mogu prije reagirati tolerancijom nego imunitetom.

Medawar (1960.) smatra, da je efekt antigena na embrion i odrasli organizam različit. Dok u embrionu inducira imunološku toleranciju, u odraslom izaziva dvostruki efekt :

- a) imuni odgovor zrelih stanica, koje produciraju antitijela i
- b) toleranciju manjeg dijela stanica, koje su u vrijeme izlaganja antigenima još bile nezrele. Ove tolerantne stanice, kada

postanu zrele, sposobne su da reagiraju na druge antigene. U odraslom bi se organizmu, prema tome, nalazile serije toleran-tnih stanica, koje su sposobne da reagiraju na sve antigene, osim na onaj prema kojem su tolerantne.

Neki autori prilaze fenomenu tolerancije kao dinamičkom stanju. Voisin (1962.) pretpostavlja, da embrionalna tkiva slično tumorskim, rađe pokazuju "enhancement" (imunološku facilitaciju), nego reakciju odbacivanja. Slično se ponašaju i mezenhimalne (zametne) stanice odraslih individua. Stanice kalema, kao i stanice domaćina, mogu reagirati jedne protiv drugih ili reakcijom odbacivanja ili reakcijom facilitacije. Reakcija na unos stranih imunokompetentnih stanica odvija se u dvije faze. U I fazi reagiraju stanice kalema, jer domaćin nije imunološki zreo za reakciju. U fazi II reagira mladunče, kada postane imunološki zrelo, protiv kalema. Ako u I fazi (GVH tip reakcije), prevladava reakcija odbacivanja, onda dolazi do bolesti kržljanja, a ako prevladava reakcija facilitacije spriječiti će se kržljanje. Ako u fazi II (HVG reakcija), prevladava reakcija odbacivanja, neće nastati tolerancija, a prevladava li reakcija facilitacije nastati će tolerancija. Prema Voisin-u, imunološka je tolerancija, dakle, aktivno stanje dvosmjerne reaktivnosti, koje se održava u vrlo osjetljivoj ravnoteži.

Nakić i sur. (Nakić,1962.; Nakić i Silobrčić,1962.; Nakić i sur.,1962.) također shvaćaju toleranciju kao dinamički proces u kojem je domaćin nereaktivan, zbog imunološkog "pritiska" davaočevih stanica na preostale, imunološki aktivne stanice

domaćina. Poremećaj ovog omjera može dovesti ili do ukidanja tolerancije ili do fatalne GVH reakcije, kao ekstremnih mogućnosti. Himerizam i GVH reakcija su neophodni preduvjet za toleranciju, a fatalna GVH reakcija predstavlja najviši stupanj tolerancije. Nakić (1968.), dalje smatra, da je limfni čvor kritično mjesto gdje se izaziva tolerancija. U izazivanju tolerancije razlikuje dvije faze. Prva faza je indukcija. U ovoj fazi mora postojati zamjena za domaćinove imunokompetentne stanice, što potvrđuje visok postotak davaočevih stanica, u limfnih čvorovima domaćina (50 - 100 %). Druga je faza održavanje tolerancije. U ovoj fazi je vrlo nizak postotak davaočevih stanica, a tolerancija je i dalje na visini. Prednost je ove teorije u tome što imunitet i toleranciju smatra jedinstvenim entitetom, a pruža povoljna objašnjenja za većinu fenomena tolerancije i GVH reakcije u novorođenčeta, F_1 hibrida i ozračenih himera.

Simonsen (1960.a) smatra da postoji ne samo tolerantan organizam, već i tolerantna linija stanica. Imunokompetentna stanica može, u kontaktu sa velikom količinom antigena, proći kroz fazu "iscrpljujuće" senzibilizacije, pa izgubiti sposobnost da reagira protiv odgovarajućeg antigena, a istovremeno zadržati reaktivnost prema drugim antigenima. Ova pretpostavka slaže se sa brzim iščezavanjem parentalnih splenocita injiciranih u F_1 hibrida, što je interpretirano kao "alergijska" smrt kalema (Gorer i Boyse, 1959.b).

Mladi F_1 hibrid miša, star 4 - 10 dana, već je dovoljno zreo da eliminira imunokompetentne stanice drugog soja, međutim, još uvijek dovoljno je mlad da dopusti tipičnu GVH reakciju stanica parentalnog soja, na koje je genetski tolerantan. Ako se F_1 hibridu injiciraju imunokompetentne stanice stranog soja, koje su jednom od parentalnih sojeva identične na H-2 lokusu, onda se također, u pomenutoj dobi, može razviti GVH reakcija (Simonsen, 1960.a). To ukazuje da u F_1 hibrida potpuna genetska tolerancija nije neophodan preduvjet za izazivanje fatalne GVH reakcije. Ovo se slaže sa mišljenjem Billingham i Brenta (1959.), da u ovom smislu nije neophodna niti kompletna stečena tolerancija.

Gowans (1962.) je utvrdio da je mali limfocit imunološki aktivna stanica, koja i u odraslog F_1 hibrida proizvodi GVH reakciju. Slične je rezultate dobio i Porter (1962.). Hildeman i Haas (1962.) su postavili hipotezu, na osnovu zapažanja na larvama žabe, da indukcija tolerancije ovisi o odsutnosti ili relativno niskom broju domaćinovih malih limfocita, u vrijeme kada se unose alogene stanice.

Uzrok smrti u GVH reakciji nije još objašnjen, ali se pretpostavlja da bi se moglo raditi o snažnoj depleciji broja malih limfocita primarca, ubrzo nakon injekcije alogenih imunokompetentnih stanica. Tako Simonsen (1960.a) smatra, da se bitno oštećenje nanese domaćinu injiciranjem imunokompetentnih stanica događa vrlo rano, jer injicirane stanice u životinje sa uznapredovalom bolešću već mogu postati toleran-
tne na domaćina. Davanje imunog seruma ili imunih stanica

domaćinovog soja, u svrhu spriječavanja kržljanja, efikasno je samo 1 - 2 dana nakon injiciranja splenocita u neonatuse miševa (Russell , 1962.b), što se slaže sa mišljenjem Simonsena.

Ireverzibilna oštećenja domaćina, već neposredno nakon unoša stanica, onemogućuju bilo kakav naknadni blagotvorni efekt spomenutih postupaka.

Za nastanak tolerancije i bolesti kržljanja očito je od posebne važnosti specifična reaktivnost ili nereaktivnost mladog organizma u perinatalnoj dobi. Baš zahvaljujući okolnostima ovog ranog perioda života organizma mogle su se i otkriti neke karakteristike transplantacijskog imuniteta, koje bi inače na modelu odrasle životinje ostale dobrim dijelom skrivene.

I 3. CELULARNA I HUMORALNA REAKTIVNOST NA TRANSPLANTACIJSKE ANTIGENE

Intenzivan interes za proučavanje transplantacije datira od polovice našeg stoljeća, kada je Medawar (Medawar, 1945.; Gibson i Medawar, 1943.) utvrdio osnovne zakonitosti u interpretaciji događaja koji slijede nakon presađivanja tuđeg tkiva. Ovi su radovi potvrdili da je za odbacivanje tuđeg tkiva odgovoran imunološki proces. Medawar je otkrioⁱ fenomen ubrzanog odbacivanja drugog kalema kože istog davaoca, tzv. "reakcija drugog seta" ("second set" - angloameričkih autora). Imuni odgovor organizma vjerojatno je izazvan ulaskom stranih

antigena iz transplantiranog tkiva i njihovim kontaktom sa "imunim" centrima domaćina. U slučaju ortotopnog kožnog alokalema, najbliži imuni centri su regionalni limfni čvorovi (Scothorne, 1958.). "Second set" reakciju, protiv drugog kalema kože, moguće je postići ne samo prvim kalemom kože, već i injiciranjem leukocita, splenocita, stanica jetre, bubrega i drugih stanicama istog davaoca (Billingham i sur., 1954. a). Imunitet stvoren na prvi kožni kalem može trajati i preko 8 mjeseci, a nakon injekcije limfatičkih stanica znatno opada već poslije mjesec dana (Billingham i sur., 1959.).

Važan izuzetak u izazivanju reakcije ubrzanog odbacivanja drugog alokalema predstavljaju eritrociti. Injiciranje eritrocita, naime, ne dovodi do senzibilizacije primaoca na naknadni alokalem kože istog davaoca (Mathé i Amiel, 1962.),. To vjerojatno znači, da antigene histokompatibilnosti kalema nose samo nukleirane stanice.

Po svojim karakteristikama transplantacijski imunitet spada u odgođeni tip preosjetljivosti (delayed type of hypersensitivity- angloameričkih autora) i pokazuje brojne sličnosti sa preosjetljivosti tuberkulinskog tipa (Lawrence, 1957.; Boyd, 1956.). Nakon stavljanja kožnog alokalema, ili transplantacije drugog alogenog tkiva, slijedi period latencije u toku kojeg se primalac imunizira, što dovodi do odbacivanja presađenog tkiva. Ovaj senzibilitet se ne može prenijeti serumom, niti se u serumu mogu naći specifična antitjela. Ubrzano odbacivanje alokalema kože može se prenijeti na normalne nesen-

zibilizirane životinje inokulacijom stanica dobijenih iz slezene i limfnih čvorova, prethodno senzibiliziranih davalaca. Neživa tkiva, čitava krv, serum i koncentrirani leukociti nisu u ovom smislu bili efikasni (Billingham i sur., 1954.a i 1954.b).

U presađenom alogenom kožnom kalemu, nakon perioda latencije, dolazi do obilne infiltracije mononuklearnih stanica, nakon čega obično slijedi odbacivanje kalema. Danas se smatra da su za transplantacijski imunitet odgovorne imunokompetentne stanice ("celularna antitijela"), a ne humoralna antitijela (Billingham i sur., 1954.b; Lawrence, 1957. i 1960.).

Noviji radovi pridaju posebnu važnost analizi mehanizma nastanka celularnog, odnosno humoralnog, tipa imuniteta u procesu reakcije na presađena strana tkiva ili stanice.

Ako je antigen periferno fiksiran, kao napr. u kožnom kalemu, limfociti prvaoca stimulirani kontaktom sa njim odlaze u regionalne limfne čvorove. U parakorteksu limfnih čvorova nastavlja se njihova proliferacija. Poslije 4 ili više dana, potomci ovih limfocita napuštaju regionalne limfne čvorove, odlaze po cijelom organizmu i naseljavaju druge limfne čvorove. U toku seobe limfociti mogu reagirati protiv specifičnog antigena, ako sa njim dođu u kontakt, što predstavlja celularni tip manifestacije imunološkog odgovora. Međutim, ograničena količina periferno fiksidanih antigena može i sama "otputovati" u regionalne limfne čvorove. Ovi će antigeni zatim stimulirati limfocite, koji se transformiraju u prekurzore plazma stanica,

pa može doći do stvaranja humoralnih antitijela (Turk, 1967.). Među tako stvorenim humoralnim antitijelima nalazi se obično više vrsta, kao hemaglutinini, hemolizini, citotoksini (Hil- demann, 1957.; Gorer i Boyse, 1959.a), pa čak i antitijela koja mogu facilitirati preživljavanje kalema (Kaliss, 1957.). Sva se ova antitijela mogu odgovarajućim metodama otkriti, ali je njihova uloga u odbacivanju tuđeg kalema vjerojatno tek sekundarna.

Prvi dokaz o prisustvu hemaglutinina u serumu miša nakon odbacivanja alogenog tumora, dao je Gorer (1942.). Međutim, i nakon transplantacije kože ili drugih alogenih tkiva, često se može u serumu primaoca osjetljivim metodama otkriti prisustvo hemaglutinina. Hemaglutinini su najbolje istraženi u miša, jer H-2 lokus u miša determinira i stanične antigene na eritrocitima, pa se nakon transplantacije alogenog tkiva u miša hemaglutinini mogu smatrati detektorima transplantacijskih antigena.

U tom pogledu, u drugih specijes, uloga je hemaglutinina u najmanju ruku nejasna. Tako se napr. u psa ne pokazuje nikakva zavisnost između stupnja histokompatibilnosti i pojave hemaglutinina, nakon transplantacije alogenog kalema kože (Vlahović i Vlahović, 1966.; Vlahović i sur., 1965.). U štakora, prema našim iskustvima, ne čini se da intenzitet hemaglutinacijske reakcije ovisi o histokompatibilnim razlikama među transplantacijskim partnerima (Vlahović i Rukavina, 1968.).

Unatoč nepoznatoj ulozi humoralnih antitijela u transplantacijskom imunitetu potrebno je o njima voditi računa, jer se u sklopu reakcije na transplantirano tkivo pojavljuju u serumu. Ni facilitacijska uloga humoralnih antitijela nije do kraja objašnjena, a predstavlja važan paradoksan nalaz u sklopu različitih fenomena transplantacijskog imuniteta.

Imunokemijskim svojstvima antitijela također treba obratiti odgovarajuću pažnju, naročito pri proučavanju transplantacijskih reakcija u perinatalnoj dobi. Čini se, naime, da je propustljivost placente barem djelomično ovisna o fizikalno-kemijskim svojstvima antitijela, o čemu će biti govora u daljnjem tekstu.

I 4. SAZRIJEVANJE IMUNOLOŠKE REAKTIVNOSTI U PERINATALNOJ DOBI

Na temelju brojnih eksperimentalnih podataka, često se naglašava da je imunološka reaktivnost fetusa i novorođenčeta nedostatna. Međutim, normalna se reaktivnost, ovisno o specijes, uspostavlja u različito vrijeme po rođenju. Kako je poznato da limfatičke stanice i tkiva predstavljaju izvor svih oblika imunološke reaktivnosti, to je logično i pretpostaviti da se ona razvija u skladu sa sazrijevanjem limfatičkog aparata. Iako su, u mnogih životinjskih vrsta, neke temeljne karakteristike limfatičkog tkiva definitivno naznačene već prije rođenja, ipak ne može se govoriti o potpunoj funkcionalnoj razvijenosti imunološkog aparata, o čemu postoje brojni dokazi.

U pilićjem embrionu timus i Fabricijeva burza, prvi su organi koji se već mogu identificirati kao limfatičko tkivo (Papermaster i Good, 1962.). Međutim, imunološka zrelost u ptica postiže se tek oko 5-og tjedna starosti. Nađeno je, štoviše, da postoji korelacija između veličine slezene i sposobnosti ptica da produciraju antitijela (Wolfe i sur., 1957.).

Timus je i u kunića prvi organ koji postaje limfoidan, a tek zatim u tom smislu sazrijevaju slezena i periferni limfni čvorovi. Timus ima znatan utjecaj i na ostalo limfatičko tkivo, jer se timektomijom kunića, neposredno po okotu, spriječava limfatički razvoj slezene i limfnih čvorova (Archer i sur., 1963. a i 1963. b). Štoviše, kunići kojima je po okotu uklonjen timus i apendiks (centralni limfatički organi), često pokazuju Coombs pozitivnu anemiju, amiloidozu parenhimskih organa i obilne nakupine plazma stanica u ostalom limfatičkom tkivu (Good i Papermaster, 1964.), što karakterizira autoimuno oštećenje. Prema tome, timus i apendiks u kunića imaju važnu ulogu i u prepoznavanju vlastitih struktura. Nakon stimulacije sa stranim antigenom kunići pokazuju pironinofiliju i razvoj plazma stanica, tek pri koncu drugog tjedna života (Bridges i sur., 1959.), a reaktivnost odrasle životinje dostignu sa 4 tjedna starosti. Za razliku od kunića, u zamorčeta je sposobnost produkcije humoralnih antitijela prisutna neposredno po rođenju, ali je intenzitet produkcije, u odnosu na odraslu životinju slabiji (Bishop i Gump, 1961.).

Limfatički aparat miša, slično kao i u drugih sisavaca, postepeno se razvija još u embrionalno doba. Prvo se razvija timus, koji pokazuje limfatičku aktivnost oko 14-og dana intrauterinog života, dok se limfni čvorovi i slezena organiziraju u tom smislu tek nakon okota (Ball i Amerbach, 1960.). Uklanjanje timusa u miša, štakora i hrčka, neposredno nakon okota, snažno utječe na razvoj imunološke kompetencije u smislu izazivanja nespecifične imunološke tolerancije na alogena tkiva (Miller, 1961.; Janković i sur., 1962.).

Imunološka reaktivnost, na stimulaciju antigenom, slabo je razvijena i u ljudskog novorođenčeta. Karakteristično je, međutim, da je reaktivnost u nedonoščeta jednaka kao i u donošena čeda. Ova činjenica mogla bi ukazivati na važnost faktora okoline. U toku prvih nekoliko tjedana života novorođenče postepeno nadoknađuje manjak u intenzitetu imunološkog odgovora i približava se reaktivnosti odrasle osobe (Osborn i sur., 1952.a i 1952.b). Sazrijevanje imunološkog odgovora možda je prije uzrokovano odvajanjem od zaštitne uloge prethodne sredine (uterus), nego vremenskim sazrijevanjem. Prema tome, i nedonošće reagira slično kao donošeno čedo. Prva antitijela, koja se u novorođenčeta pojavljuju nakon stimulacije antigenom, pripadaju IgM ili 19S γ -globulinima (Smith, 1960.; Fink i sur., 1962.).

Imunološka aktivnost na presađena alogena tkiva, u mnogih životinjskih vrsta, sazrijeva tek nakon nekog vremena po okotu. Puna sposobnost odbacivanja tuđeg tkiva postiže se većinom nekoliko tjedana nakon okota i usko je povezana sa sposobnošću produkcije antitijela (Good i Papermaster, 1964.).

Međutim, u nekih životinjskih vrsta, kao napr. ovce, i fetus je sposoban da odbaci alogalem, pa čak i majčin kalem, što ukazuje na već razvijen aktivan imunološki aparat (Schinckel i Ferguson, 1953.). Egdahl (1957.) je u fetusa kunića također dokazao snažnu imunološku reaktivnost na alogalem, što se slaže sa nalazom Portera (1960.), da je u zadnjoj fazi intrauterinog života u kunića, teško izazvati toleranciju na alogene splenocite. I pored toga, imuni odgovor kunića nije u ranoj postnatalnoj dobi na nivou odrasle životinje, naročito ne, ako se radi o slabijim antigenima (Ivanyi i Ivanyi, 1961.).

Mnogo slabiju imunološku reaktivnost na transplantirani alogalem kože pokazuju novookođeni štakori, a u nekim se slučajevima može kalem čak i tolerirati (Medawar i Woodruff, 1958.). Hildemann i Haas(1962.) postavili su hipotezu, prema kojoj pojava imuniteta na alogalem koincidira sa pojavom malih limfocita u cirkulaciji mladunčeta. Ljudsko novorođenče, bez obzira da li je donošeno ili nedonošeno, pokazuje dobro razvijenu imunološku sposobnost za odbacivanje alokalama kože (Fowler i sur., 1960.).

Može se istaći da je imunološki odgovor na alogalem, u većine životinjskih vrsta, nedovoljno izražen nakon okota, te da se radi o pojavi koja je paralelna sa drugim oblicima imunološke nereaktivnosti ili izmijenjene reaktivnosti u ovoj životnoj dobi.

I 5. IMUNOLOŠKI ODNOSI IZMEĐU MAJKE I ČEDA

Još uvijek nije dovoljno poznato šire biološko značenje trudnoće u sisavaca, koje omogućava majci da u svome organizmu nosi djelomično genetski strano čedo. Jedno se vrijeme smatralo da je sam akt poroda istovjetan s odbacivanjem alokalema, no ta je ideja napuštena kada se ustanovilo da trudnoća ima isti tok u genetski čistim sojevima životinja. Za ovakav odnos između majke i čeda izbjegava se riječ nereaktivnost, već se u odnosu na majčin imunološki aparat govori o "imunološkoj inerciji". Taj izraz označava oslabljeno djelovanje sistema što održava imunološku homeostazu jednog individua, nakon primjene imunološke stimulacije (Anderson, 1965.). U ovom smislu fetus možemo smatrati alokalemom, koji se dobro tolerira.

Za ovaj fenomen "placentarna barijera" nije, međutim, adekvatno objašnjenje; naime, i sama placenta dijelom je fetalnog porijekla. Placenta omogućava fizičku odvojenost između majke i čeda (Lanman i sur., 1962.). Fizička odvojenost uz odvojene cirkulacije može imati ulogu, bilo u spriječavanju senzibilizacije majke, bilo u zaštiti fetusa od postojećeg majčinog imuniteta.

Od svih fetalnih stanica u krvotok majke mogu ući samo eritrociti, leukociti i stanice trofoblasta (Billington, 1965. Lanman i sur., 1962.). Ako između majke i fetusa postoji inkompatibilnost krvnih grupa, ne samo s obzirom na Rh faktor, već i na ABO sistem (Vlahović i sur., 1968.; Lejeune, 1962.), pla-

centa ne mora predstavljati barijeru, jer antitijela stvorena u majci mogu pręći u čedo i izazvati hemolitičku bolest.

Leukociti čeda također mogu djelovati kao antigen i dovesti do izoimunizacije majke (Lalezari i sur.,1960.). Zasad nije poznat jedino primjer imunizacije sa stanicama trofoblasta (Douglas i sur.,1959.; Galton,1960.). Galton je pokušao teoretski objasniti ovu činjenicu. Prema njemu, stanice sincicijskog trofoblasta su haploidne i možda sadržavaju kromatin samo majčinog porijekla. Prema tome, ovakve bi stanice bile kompatibilne i sa majkom i sa fetusom.

U nekim slučajevima čini se da placentarna barijera ipak sprječava ili bar bitno smanjuje prijenos nekih imunih faktora koji nastaju u reakcijama organizma na alokalem (Lanman i sur.,1962.). Pod tim se obično podrazumijevaju faktori što uzrokuju celularni imunitet, premda se mora možda misliti i na humoralna antitijela (Stetson i Jensen,1960.).

Ako i pored placentarne barijere stanice fetusa mogu prelaziti u majku, logično je pretpostaviti da i stanice majčinog porijekla mogu prijeći u fetalni organizam. Prema nekim podacima od stanica majčinog porijekla placentarnu barijeru prolaze eritrociti (Hansen i Phillips,1949.) i leukociti (McCarthy i McDougall,1953.). Međutim, u pokusima na novookoćenim štakorima i miševima, utvrđena je i mogućnost prijelaza imunokompetentnih stanica kroz placentarnu barijeru (Good i Papermaster, 1964.). Do sličnog nalaza došao je i Billingham sa suradnicima (1965.).

Postojanje stranih imunokompetentnih stanica u mladunčetu, teoretski može dovesti do GVH reakcije, što je od posebnog značenja u humanoj medicini. Ako se, naime, u hemolitičkoj bolesti GVH reakcija ne događa prirodno, uvjeti za njen razvoj često se stvaraju umjetno, terapijskom intervencijom, prilikom eksangvinotransfuzije novorođenčeta krvlju odraslih davalaca (Hašek i sur., 1961.). Novorođenče se tada nalazi u kritičnoj fazi imunološkog razvoja, pa se zbog unosa imunokompetentnih stanica odraslog individua, mora pretpostaviti da može nastati neka od ovih reakcija :

a) tolerancija, što je Lejeune i dokazao (1962.); b) imunitet ili c) proliferacija imunokompetentnih stanica davalaca, u reakciji na antigene čeda (GVH reakcija).

Iako i fetalni i novorođenački organizam, u mnogih životinjskih vrsta, može sintetizirati serumske proteine, ipak je u serumu teško dokazati imunoglobuline u znatnijim količinama. Štoviše, činjenica je da se pasivna imunološka zaštita novorođenčeta može, u periodu od imunološke nereaktivnosti do pune reaktivnosti, osigurati prijenosom γ -globulina koji sadržavaju antitijela. Ovaj se prijenos odvija kroz razne epitelijalne barijere. Među ovim epitelijalnim barijerama najznačajnije su placenta i crijevna sluznica.

Prijenos imunoglobulina iz majke u čedo odvija se bilo u kasnom fetalnom ili ranom neonatalnom periodu, a u nekih životinjskih vrsta kroz čitavo vrijeme intrauterinog i ranog postnatalnog života. Tako novorođenčad goveda, i svinja uopće

ne sadržavaju imunoglobuline, jer oni u toku fetalnog života ne prolaze placentarnu barijeru. Međutim, u kolostrumu ih nalazimo u velikim količinama, a budući da je sluznica probavnog trakta novorođenčeta vrlo permeabilna, ona omogućava njihov prijenos u krvotok (Hansen i Phillips, 1949.; McCarthy i McDougall, 1953.).

U miša i štakora imunoglobulini se prije porođaja prenose putem žumanjčane vreće, amnionske tekućine i crijevne sluznice fetusa. Apsorpcija imunoglobulina kroz probavni trakt nastavlja se i nakon okota, jer ih sluznica crijeva propušta sve do 15-og ili 21-og dana života. Na apsorpciju, međutim, znatno utječu kortikosteroidi, pod čijim se djelovanjem prijenos može i ranije prekinuti (Good i Papermaster, 1964.; Brambell, 1961.).

U čovjeka nivo γ -globulina, u vrijeme rođenja, čak je i nešto veći nego u majke, jer je za njih placenta permeabilna. Međutim, imunoglobulini se putem majčinog mlijeka ne mogu prenositi, jer ih sluznica crijeva ne propušta (Good i Papermaster, 1964.; i Vahlquist, 1958.).

Osim toga, preko placentne se ne mogu prenositi sve vrste antitijela. Placentarna barijera propušta, naime, neka antitijela, što ovisi o veličini molekule antitijela, pa se placentarna barijera može u neku ruku smatrati "molekularnim sitom". U većini životinjskih vrsta, kao i u čovjeka, preko placentarne barijere prolaze uglavnom antitijela 7S tipa, dok antitijela 19S tipa ne prolaze, ili pak prolaze samo u minimalnim količinama (Good i Papermaster, 1964.).

Prema iznesenom, čini se da postoji dosta specifičnosti u imunološkoj reaktivnosti mladog organizma u perinatalnoj dobi. Ova se specifičnost ne može objasniti samo sazrijevanjem imunološkog aparata, već se mora uzeti u obzir i poseban položaj mladunčeta u ovoj životnoj dobi. Mladunče se, naime, razvija u zreлом organizmu sposobnom za punu imunološku reaktivnost, a kontakt fetusa s njim vrlo je blizak. Preko placente vrši se obostrano živa izmjena tvari, ponekad i stanica, što sve može znatno utjecati na imunološku reaktivnost i majke i čeda.

II O B R A Z L O Ž E N J E T E M E

Poznato je, kako je to u Općem dijelu i navedeno, da se u perinatalnoj dobi mogu očitovati posebni oblici transplantacijske reaktivnosti, koji se kasnije u životu više nikada ne susreću. Među njima posebno mjesto zauzimaju aktivno stečena imunološka tolerancija i bolest kržljanja.

Budući da se u ovoj životnoj dobi mladunče odvaja od majke, može se smatrati da je period adaptacije mladunčeta na uvjete vanjske sredine upravo kritičan za manifestaciju specifičnih oblika reaktivnosti, pa tako i imunološke, te posebno reaktivnosti na transplantacijske stimule. Znamo da mladunče, u najranijoj fazi samostalnog života, koristi imunološku zaštitu naslijeđenu od majke. Moglo se pretpostaviti stoga, da ni prethodno stečeni transplantacijski imunitet majke neće ostati bez utjecaja na imunološku reaktivnost čeda, prema transplantacijskim antigenima. U tom pogledu valjalo se posebno osvrnuti na mogućnost prijenosa transplantacijskog imuniteta s majke na čedo kako u pogledu celularnog, tako i humoralnog imuniteta, jer se i jedan i drugi oblik imuniteta javljaju kao elementi reakcije na transplantacijske stimule.

U pokusima smo upotrijebili genetski nesrodne štakore, da bi izbjegli ujednačene odnose histokompatibilnosti i da bi eksperimentalne uvjete, u tom smislu, što više približili uvjetima koji vladaju u ljudskoj populaciji.

Za transplantacijski stimulus mladunčadi odabrali smo splenocite oca, a majke smo, u različito vrijeme prije okota, odnosno parenja, stimulirali tkivima iste životinje, tj. oca budućeg mladunčeta. Injiciranjem novookočene mladunčadi splenocitima oca htjeli smo izazvati specifičnu imunološku toleranciju i bolest kržljanja. Prethodnom imunizacijom majki na tkiva oca htjeli smo specifično imunizirati majke i pratiti utjecaj takve imunizacije na imunološku reaktivnost mladunčeta.

Mladunčad smo konačno testirali roditeljskim kalemima i određivali smo im hemaglutinacijsku aktivnost prema eritrocitima roditelja.

Zbog svega navedenog eksperimente smo izveli u dva dijela. Prvo je izvršena analiza bolesti kržljanja u uvjetima genetski nesrodne populacije štakora. U drugom dijelu pokusa istraživa-
ne su mogućnosti prijenosa transplantacijskog imuniteta sa majke na čedo, pri čemu je naročita pažnja poklonjena vremenu primjene transplantacijskog stimula (prije ili u toku graviditeta), na ženku.

III E K S P E R I M E N T A L N I D I O

III 1. MATERIJAL I METODE

III 1.A. Pokusne životinje

U pokusima smo upotrijebili genetski nesrodne albino štakore soja Y, iz vlastitog laboratorijskog uzgoja Zavoda za fiziologiju. Štakorska kolonija razvija se kao zatvorena populacija, što je u ovakvom radu od posebne važnosti. Štakori dobijaju standardnu prehranu (keksi, proizvod "Vesterum" Zavoda -Kalinovica), a posebno se dohranjuju zelenjem, mrkvom, kvascem i svježom goveđom jetrom. Životinje se stavljaju na rasplod po principu slučajnog izbora, bez obzira na srodnost. Zbog toga, kao i zbog zatvorenog tipa kolonije, mogu se dobiti kombinacije štakora koji mogu biti genetski (obzirom na gene koji određuju histokompatibilnost) vrlo slični, ali i vrlo različiti. Štakori su podijeljeni po spolu u odvojene kaveze. U jednom kavezu nalazi se prosječno 6 životinja. U pokusima sa novorođenim štakorima uz majku se nalazilo 5 do 11 mladih, što je ovisilo o vrsti pokusa i dobi mladih u vrijeme pokusa.

III 1.B. Anestezija

Od anestetika upotrebljavali smo kloral-hidrat (Chlorali hydras "Medika"), kao 3,6 % otopinu, u dozi od 1 ml/100 g. tjelesne težine štakora i eter (Aether ad narcosin "Lek"). Kloralhidrat se injicira intraperitonealno. Vrlo je pogodan, jer u ovoj dozi ne pokazuje toksične efekte. Kloralhidrat smo

upotrebljavali kao anestetik prilikom kalemljenja odraslih životinja. Da bi izbjegli eventualne incidente, kod stavljanja kalema na mlade životinje, upotrebljavali smo etersku narkozu, jer se ona lakše kontrolira. Eter smo upotrebljavali i kod vađenja krvi za serološke pretrage.

III 1. C. Presađivanje kožnog kalema

Presadivanje kožnog kalema, upotrebljavali smo za određivanje stupnja histokompatibilnosti transplantacijskih partnera. Stavljali smo ortotopni kalem kože, tj. kalem koji se ušije na antomski analogno mjesto na drugoj životinji. Upotrebljavali smo metodu kalema pune debljine / "full thickness graft" - angloameričkih autora / (Billingham, 1961.a).

Koža sisavaca građena je od više slojeva : a) epidermis sa svojim privjescima (dlake i žlijezde), b) dermis ili korijum sa brojnim kolagenim vlaknima. Granica između ova dva sloja je neravna, sa brojnim izbočenjima i udubljenjima, koja su međusobno kongruentna. Između kože i priležećih dijelova nalazi se c) fascisa superficialis. Ona nije homogena, jer se između njenih vlakana nalazi jedan ili više slojeva masnog tkiva - panniculus adiposus, a ispod njega i u intimnom kontaktu sa njim nalazi se sloj poprečno prugastih mišića - panniculus carnosus. Neposredno iznad panniculus carnosus-a nalazi se sloj krvnih žila, kojem treba posvetiti posebnu pažnju prilikom uklanjanja kalema sa davaoca i pripremanja ležiš-

ta za kalem na primaocu. Prije uzimanja kalema anesteziiranog štakora-davaoca se prethodno pripremi tako da se dlake grubo odstrane škarama, koža nasapuna i izbrije žiletom. Operativno polje premaže se 70 % alkoholom i uz upotrebu sterilnog instrumentarija na koži davaoca se omeđi kvadrat veličine 2 x 2 cm (kod mladih životinja 1,5 x 1,5 cm) i dublje zasječe na lijevom donjem rubu. Malom kirurškom pincetom prihvati se tako pripremljeni donji rub i "tupo" se ispreparira sloj koji leži neposredno iznad panniculus carnosus-a, pri čemu posebno treba paziti da krvne žile ostanu neozlijeđene. Kožni odsječak se odvoji od podloge i stavi u sterilnu zdjelicu sa fiziološkom otopinom. Istim se postupkom pripremi i primalac, pa se kalem davaoca prenese u priređeno ležište na primaocu, koje je iste veličine kao i kalem. Kalem se okrene za 180°, da bi se, u slučaju duljeg preživljavanja, lakše pratila sudbina presađenog kalema, jer dlaka na kalemu raste suprotno od smjera rasta dlake primaoca. Nakon što se kalem kozmetički adaptira, pričvrsti se uz rubove ležišta sa osam šavova (4 šva na uglovima, a 4 na sredini svake strane). Obično se kalem postavlja na lateralnu stijenkku grudnog koša, jer rebra i leđne kosti predstavljaju čvrstu podlogu. Mamarne i torakalne arterije i njihovi ogranci dobro opskrbljuju kalem krvlju, a osigurana je i aksilarna venska i limfna drenaža. Na kalem se stavi sterilna gaza premazana sa 10 % ungu. sulphatiasoli, a grudni koš se uvije u leukoplast, čime se postiže dovoljan pritisak kalema na ležište i spriječava naknadna traumatizacija. Leukoplast ne smije ometati pokrete grudnog koša u toku

respiracije.

Kada nema komplikacija (loša tehnika, infekcija itd.), kalem se prihvati per primam intentionem. Krvne žile brzo uraštavaju iz ležišta u kalem , tako da je 4-og dana presađena koža obilno vaskularizirana (Converse i Rapaport,1956.). Leukoplast i zavoji skidaju se 7-og dana, a stanje kalema prati se svakodnevno makroskopski. Ocjenjuje se boja, elastičnost, mekoća i eventualni rast dlake.

Odbacivanje alogenog kalema kože može biti akutno ili kronično, što ovisi o više faktora (Barnes i Krohn,1957.):1/ genetskih ili antigenih razlika davaoca i primaoca, 2/ veličine kožnog kalema i 3/ eventualne prethodne senzibilizacije primaoca sa antigenima davaoca.

Reakcija akutnog odbacivanja kalema praćena je snažnom upalnom infiltracijom (Eichwald i sur.,1956.). Koža postaje edematozna, a zatim joj se promijeni boja od svijetloružičaste prema žučkastoj, smeđoj i katkada crnoj. Kalem gubi elastičnost, a zatim mekoću, dok se na kraju ne pretvori u tvrdu krustu. Stvaranje tvrde kruste, u ovakvom tipu reakcije, uzimali smo kao kriterij za odbacivanje kalema. U pokusima sa prethodnom senzibilizacijom primaoca, na tkivo davaoca, dolazilo je često do burne reakcije sa liziranjem kalema.

Reakciju kroničnog odbacivanja kalema mnogo je teže egzaktno kontrolirati i odrediti tačan dan konačnog odbacivanja (Billingham i Parkes,1955.). Kalem se postepeno počme smanjivati, epidermis se stanjuje, oslabi mu veza sa dermisom, dola-

zi do involucije privjesaka kože (dlake ne rastu, iako se kalem dugo drži), a pri kraju pojave se brazgotine. Značajnije smanjenje kalema i pojavu brazgotina, uzimali smo u svim reakcijama ovog tipa kao kriterij za odbacivanje.

III 1.D. Pripremanje suspenzije splenocita

Žive nukleirane stanice slezene upotrebljavali smo za izazivanje tolerancije, odnosno, bolesti kržljanja. Anesteziranom davaocu, kroz uzdužno otvoren abdomen, uzimali smo nešto više od pola slezene. Cijelu slezenu nismo uzimali da bi spriječili pojavu bartoneloze. Ostatak slezene suturirala se sa 2 šva i tako spriječi krvarenje. Izvađeni dio slezene škarama se izreže na veći broj komadića i stavi na metalnu mrežicu, koja je uronjena u Ringerovu rastopinu, puferiranu sa fosfatnim puferom (Billingham, 1961. b). pH rastopine iznosi oko 7,6. Sa porcelanskim tučkom tkivo slezene se protiskuje kroz mrežicu, te pojedinačne stanice, kao i nakupine stanica, prolaze u rastopinu, a na mrežici ostaje uglavnom vezivno tkivo. Suspenzija stanica se zatim proštrcava kroz injekcione igle od broja 1 do broja 20, pri čemu se potpuno razbijaju nakupine stanica. Tako se dobije suspenzija pojedinačnih stanica. Suspenziju se centrifugira 3 minute na 1500 okretaja (centrifuga Železniki, tip LCU-72), supernatant se odbaci, a sedimentu se ponovno doda puferirana Ringerova rastopina, pa se ovaj postupak ponovi još dva puta.

Sediment se konačno razrijedi u 1 - 2 ml puferirane Ringerove rastopine, dobro promiješa, da se dobije jednolična suspenzija i odredi broj stanica u jednom ml. Broj stanica određivali smo standardnim hemocitometrijskim postupkom, tj. brojali smo obojene nukleirane elemente.

Broj injiciranih stanica kretao se od 4,0 do 150 milijuna, u volumenu od 0,2 ml otopine. Kontrolne smo životinje injicirali sa 0,2 ml puferirane Ringerove rastopine.

III 1.E. Način injiciranja stanica

Novorođene štakore injicirali smo intraperitonealno, po metodi Simonsen - Jensen-a (1959.), unutar 48 sati po okotu. Suspenziju stanica navukli smo u tuberkulinsku špicu kroz injekcionu iglu br.20. Igla se provuče kroz muskulaturu pektoralne regije i uvodi prema abdomenu, neposredno ispod kože. Koža novorođenčeta je prozirna, pa se ovaj postupak lako kontrolira okom. Kada vršak igle prođe donji rub jetre, probije se sloj abdominalnih mišića i sadržaj injicira u peritonealnu šupljinu. Igla se pažljivo izvuče, a ulazno mjesto lagano komprimira. Mišići zatvore prolaz koji je načinila igla, pa se praktički ne izgubi ništa od injiciranog volumena.

III 1.F. Određivanje vijabilnosti stanica

Budući da opisani postupak pripremanja stanica dovodi do mehaničkih oštećenja, pa i ugibanja, izvjesnog broja stanica određivali smo uvijek i postotak preživjelih stanica, metodom ekskluzije boje (Schreck, 1958.). Upotrebljavali smo 0,2 % eozina (Eozinum flavum " Kemika ") u fiziološkoj rastopini. Finalnu suspenziju splenocita za injiciranje, navuče se u eritrocitni melanžer do oznake 1, a 0,2 % otopinu eozina do oznake 101, te se miješa tačno 3 minute. Nakon toga se jedna kap stavi na mrežicu hemocitometra i odredi broj stanica, koje su primile crvenu boju. Te stanice smatramo "mrtvim", a njihov broj se kretao u rasponu od 35 - 45 %.

III 1. G. Test hemaglutinacije (Metoda sa dekstranom)

Budući da se transplantacijom kože ili drugog tkiva može u serumu primaoca izazvati hemaglutinine protiv eritrocita davaoca (Gorer i Boyse, 1959.b; i Vlahović i sur., 1965.), primjenili smo test hemaglutinacije. Detekcija hemaglutinina, međutim, često ovisi o osjetljivosti upotreb- ljene metode. Zato je predložen čitav niz testova (PVP, sinergistički test itd.), u kojima se primjenjuju tvari koje "olakšavaju" hemaglutinaciju. Jedna od tih tvari je i

dekstran, kojega smo i mi primijenili u testu olakšane hemaglutinacije. Upotrebljavali smo serološku mikrometodu (Rubinstein i sur., 1964.), sa 2 % dekstrana ("Intradex" salt free, Glaxo Lab., Greenford, England mol. tež. 135.000) u fiziološkoj rastopini i 6 % bovinim serum albuminom (BSA , Fatty acid poor B grade, "Calbiochem") u fiziološkoj rastopini. Za 6 % rastopinu BSA odlučili smo se zbog toga, što je koncentracija proteina u serumu oko 7 %, pa kada se prave razrijeđenja ispitivanog seruma u BSA, onda se praktički koncentracija bjelančevina neće mijenjati, što je također povoljno za manifestiranje vidljivih reakcije kompleksa antigen-antitijelo.

U kontrolnom pokusu aglutinacije eritrocita štakora, bez imunog seruma, 2 % dekstran i 6 % BSA, maksimalne su koncentracije ovih rastopina, koje još ne daju "lažne" pozitivne rezultate (sljepljivanje eritrocita i stvaranje rulo formacija).

Test se izvodi u seriji staklenih epruveta (50 x 4 mm). Prve dvije epruvete su kontrolne (bez ispitivanog seruma), treća ima nerazrijeđeni ispitivani serum, a ostale progresivna razrijeđenja ispitivanog seruma u BSA (do razrijeđenja 1 : 512) U sve epruvete, osim u treću, stavi se 1 volumen 6 % BSA. Po jedan volumen ispitivanog seruma stavi se u treću i četvrtu epruvetu. Iz četvrte epruvete, nakon što se promiješa sadržaj, uzme se 1 volumen i prebaci u slijedeću epruvetu. Ovaj se postupak dalje ponavlja do desete epruvete i tako se priređe progresivna razrijeđenja ispitivanog seruma u BSA. Zatim se u svaku epruvetu doda po 1 volumni dio a) 2 % rastopine dekstrana, b) fiziološke rastopine i c) 2 % suspenzije eritrocita u fiziološkoj

rastopini. Tako svaka epruveta ima 4 volumne jedinice. Epruvete se pažljivo promućakaju i stave u termostat na 37° C, kroz 1 sat. Nakon inkubacije, sadržaj se iz epruvete stavlja na predmetno stakalce i reakcija očitava pod mikroskopom (povećanje 50 x). Rezultate smo ocjenjivali prema kriteriju koji je opisan kod Rubinsteina i sur. (1964.).

III 1.H. Odvajanje seruma

Štakoru u površnoj eterskoj narkozi, škarama se odsijeće vršak repa i pusti krv da slobodno kapa u sterilnu epruvetu od 10 ml. Epruveta se ostavi jedan do dva sata na sobnoj temperaturi. Koagulum se odvoji od stijenki epruvete sterilnim staklenim štapićem, a zatim centrifugira 5 minuta na 1500 okretaja. Tako odvojeni serum prebaci se u serološke epruvetice. Serum se do konačne upotrebe pohrani u hladioniku, na temperaturi od oko -25° C.

III 1.H. Statističke metode

U obradi rezultata upotrebljavali smo slijedeće statističke metode: "Student-ov" t-test, probit regresiju i izračunavanje koeficienta korelacije.

Za određivanje srednjeg vremena preživljavanja kožnog kalema (median survival times - angloameričkih autora) upotrebljavali smo metodu probit regresije, koju su predložili

Billingham i sur. (1954.b). Cilj je metode pretvaranje sigmoidne krivulje odbacivanja kalema u pravac i smanjivanje utjecaja ekstremnih vrijednosti, na srednju vrijednost. Mi smo primjenili postupak opisan u "Biological Standardization" (Bum i sur.,1952.).

Jednadžbu pravca računali smo prema formuli :

$$y = \bar{y} + b (x - \bar{x}).$$

Median vremena preživljavanja (m) dobije se na slijedeći način :

$$m = \bar{x} + \frac{5 - y}{b}.$$

Standardnu devijaciju predstavlja recipročna vrijednost od b

$$SD = \frac{1}{b} .$$

pri čemu je b koeficijent regresije, a dobije se iz jednadžbe :

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} .$$

Upoređivanje dviju grupa vršili smo "Student-ovim" t-testom (Fisher,1958.;Petz,1964.), a umjesto aritmetičkih sredina unosili smo vrijednosti mediana izračunatog probit regresijom.

Koeficijent korelacije računali smo prema metodi ne-grupiranih rezultata (Petz,1964.),

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

a linearni pravac korelacije prema jednadžbi (Vranić - Serdar, 1960.) ,

$$y' = ax + b.$$

pri čemu je :

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

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

Kod nekih rezultata, koje nismo uspoređivali statističkim metodama, umjesto aritmetičke sredine prikazan je položaj centralne vrijednosti (medijan) uz raspon rezultata.

III 2. ANALIZA HOMOLOGNE BOLESTI

III 2. A. Materijal i metode

U ovim pokusima upotrijebili smo mladunčad iz 13 legala. Broj mladih u jednom leglu kretao se između 5 i 11. Unutar 48 sati po okotu mladih su injicirani intraperitonealno splenocitima odraslog mušjaka (starosti 4 - 5 mjeseci). Jedan štakor uvijek je bio davalac splenocita za svu mladunčad u leglu. Kontrolnim životinjama injicirali smo isti volumen (0,2 ml) puferirane Ringerove rastopine. Nakon injiciranja praćena je tjelesna težina mladih i njihov klinički izgled. U prva dva tjedna mladi su vagani svaki drugi dan, a nakon toga svaka 3 - 4 dana. Životinje koje su pokazivale znakove bolesti kržljanja vagane su svakodnevno, da bi se utvrdila njihova težina neposredno prije ugibanja.

Registrirana je svaka promjena u općem izgledu oboljelih životinja i praćen je razvoj bolesti.

III 2. B. Rezultati

Opći pregled rezultata injiciranja novorođenih štakora splenocitima prikazuje Tablica I. Mladunčad je prikazana po leglima, jer je svako leglo injicirano stanicama samo jednog davaoca. U svakom leglu, osim u leglu br. 2, nekoliko je mladih injicirano puferiranom Ringerovom rastopinom (kolona 4.). Doze injiciranih splenocita kretale su se u rasponu od 4 - 150 milijuna stanica. Broj injiciranih stanica znatno je varirao kako između

legala, tako i unutar pojedinog legla. Od 88 štakora injiciranih splenocitima 12 je uginulo unutar prva 4 dana po okotu (13 %), dok su od 30 kontrolnih (injiciranih Ringerovom rastopinom) uginula 2 (7 %). Teško je vjerovati, da bi se ova rana smrt mogla pripisati nekom specifičnom mehanizmu. Stoga, ako takve životinje (kolona 7.) isključimo iz ukupnog broja štakora injiciranih splenocitima (kolona 5,), onda je od bolesti kržljanja obolilo 29 štakora ili oko 38 % (kolona 8.). Ringerovom rastopinom injicirano je ukupno 30 novookoćenih štakora (kolona 4.). Ni u jednom slučaju nije primijećena bolest kržljanja, ako se isključe 2 slučaja rane smrti (legla 1 i 5). Doze stanica koje su izazvale kržljanje prikazane su u koloni 9. Najmanja doza koja je izazvala bolest kržljanja, iznosi 8 milijuna splenocita. U mnogim leglima maksimalne doze nisu dovele do kržljanja (napr. legla 1 i 3), dok su i višestruko manje doze dovele do razvoja bolesti. U leglima 8 i 9 od 14 mladih injiciranih sa relativno visokim dozama stanica (34 - 68 milijuna) niti jedan ne pokazuje znakove bolesti. Dva štakora iz legla 2 i 6 (injicirana sa 53, odnosno 20 milijuna splenocita), nakon početnog razvoja bolesti ne završavaju letalno, već se oporavljaju i kasnije pokazuju normalan klinički izgled.

Tablica II pokazuje utjecaj doze splenocita na učestalost bolesti i vrijeme ugibanja. Postotak kržljavih pri različitom broju injiciranih stanica znatno se razlikuje i povećava se uz porast doze do oko 25 milijuna stanica. Pri daljnjem povećavanju broja injiciranih splenocita, međutim, ne zapaža se nikakva pravilnost u kretanju postotka oboljelih.

TABLICA II

UTJECAJ DOZE SPLENOCITA NA UČESTALOST BOLESTI KRŽLJANJA I VRIJEME UGIBANJA

STANICA	BROJ INJICIRANJE	BROJ INJICIRANJE	BROJ KRŽLJAVIH	% KRŽLJAVIH	POJAVLJIVANJE PRVIH SIMPTOMA	DAN UGIBANJA	TRAJANJE BOLESTI
/u milijun./					/ dani /		/ dani /
4 - 10	8 (4) ^{xx}	1	12,5	8	14	6	
11 - 15	5 (3)	1	20	11	18	7	
16 - 20	11 (7)	4 ^x	36	13,15,23,15 ^x	17,20,31	4,5,8	
21 - 25	8 (5)	4	50	8,12,15,20	13,16,27,30	5,4,12,10	
26 - 30	8 (3)	2	25	13,23	22,33	9,10	
31 - 40	13 (7)	4	30	2x13,14,18	18,20,21,27	5,2x7,9	
51 - 60	16 (6)	5 ^x	31	2x13,16,17,27 ^x	2x19,22,24	3x6,7	
61 - 75	13 (3)	2	15	16,17	24,27	8,10	
110 - 150	6 (2)	6	100	4x12,2x17	17,3x18,20,25	5,3x6,3,8	

Raspon : 8 - 27 13 - 33 3 - 12

Medijan : 14 20 6

x = oporavak od kržljanja

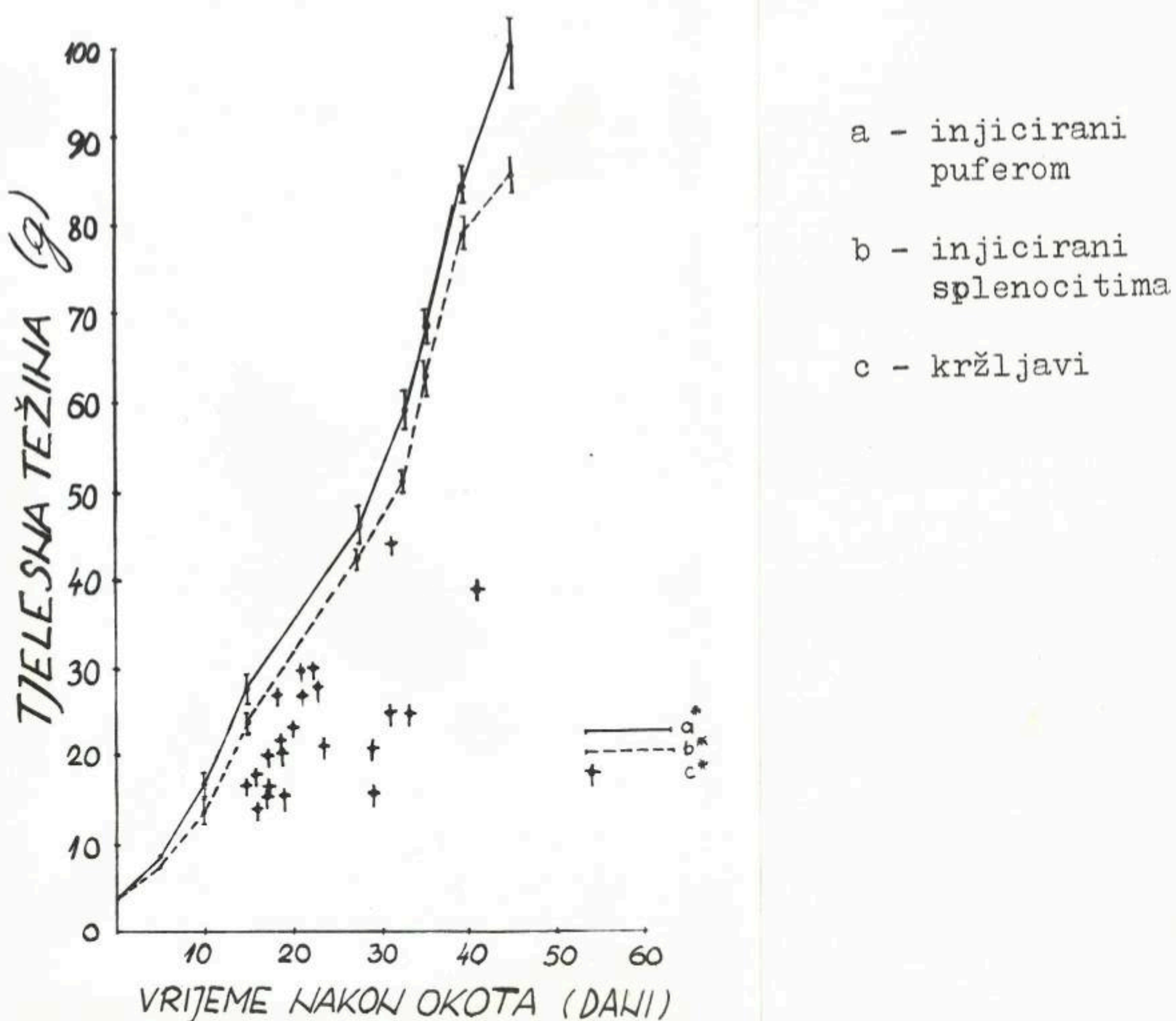
xx = broj legala

Izuzetak čine vrlo visoke doze injiciranih splenocita (110 - 150 milijuna) kod kojih su svi injicirani štakori oboljeli i uginuli. Uz broj injicirane novorođenčadi, pri određenim dozama stanica, prikazan je i broj legala iz kojih potiču mladi. Na Tablici I bilo je vidljivo, da u nekim leglima ni relativno visoke doze ponekad ne dovode do razvoja bolesti. Naprotiv, ako se uzmu u obzir (kao na Tablici II) mladi iz svih legala, onda vidimo, da se nakon injiciranja bilo kojeg broja stanica bolest ipak pojavljuje u nekom postotku.

U posljednje tri kolone Tablice II prikazano je pojavljivanje prвих simptoma bolesti, dani ugibanja, i periodi od pojave prvih simptoma do letalnog ishoda, tj. kliničko trajanje bolesti.

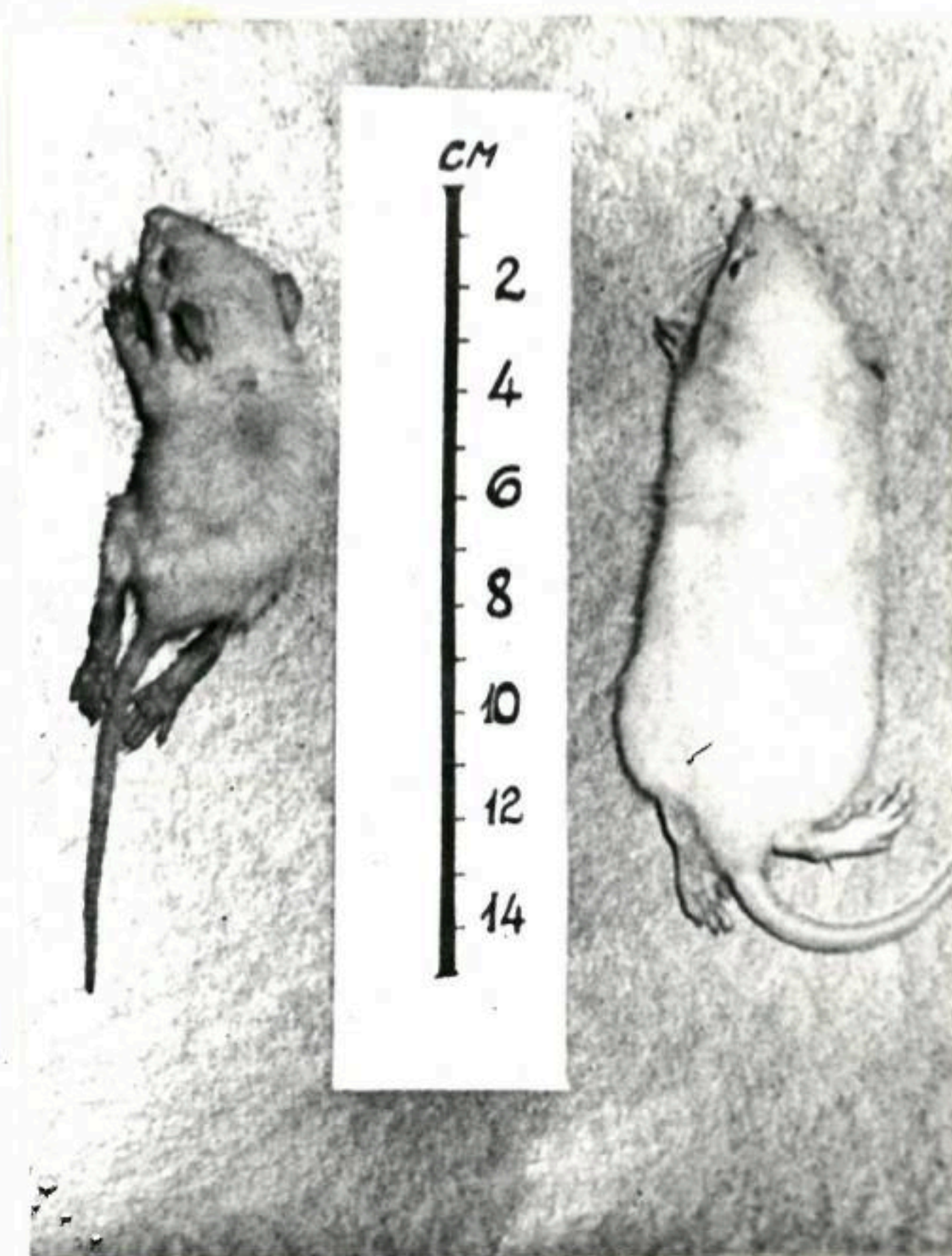
Iz Tablice II vidi se da trajanje bolesti nije u direktnom odnosu sa dozom injiciranih stanica. Slika je prilično šarolika, a nešto je ujednačenija tek kod vrlo visokog broja stanica (110 - 150 milijuna)

Slika br.1 prikazuje kretanje tjelesnih težina štakora injiciranih puferom i injiciranih stanicama. Iz grupe injiciranih stanicama posebno su izdvojeni štakori koji su pokazali znakove bolesti kržljanja, pa je prikazana njihova tjelesna težina samo na dan ugibanja. Kontrolni štakori (injicirani puferiranom Ringerovom otopinom) pokazuju brži prirast tjelesne težine čak i u odnosu na štakore injicirane stanicama, koji nisu pokazali znakove bolesti. Štakori koji su oboljeli od bolesti kržljanja, često su, neposredno pred ugibanje, višestruko zaostajali po težini iza obiju grupa injiciranih štakora.



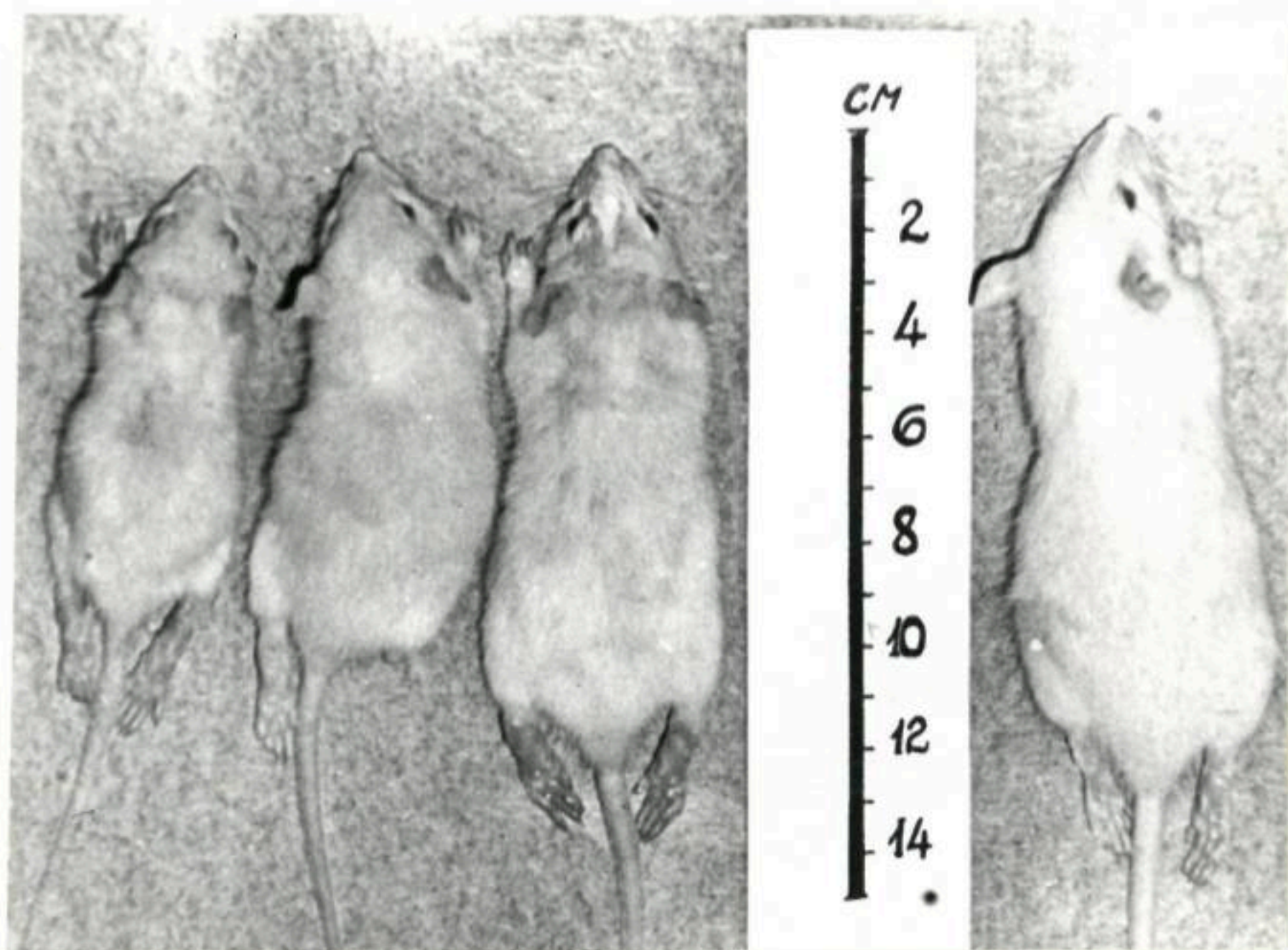
Slika 1. Utjecaj injekcije alogenih splenocita na tjelesnu težinu novorođenih štakora.

Osim zaostajanja prirasta tjelesne težine izraženo je i zaostajanje u rastu oboljelih životinja. To se najbolje vidi ako se oboljela životinja uporedi sa injiciranom iste starosti, ali bez znakova kržljanja (Slika 2.). Što je životinja ranije obolila od bolesti kržljanja, to je veće zaostajanje u rastu.



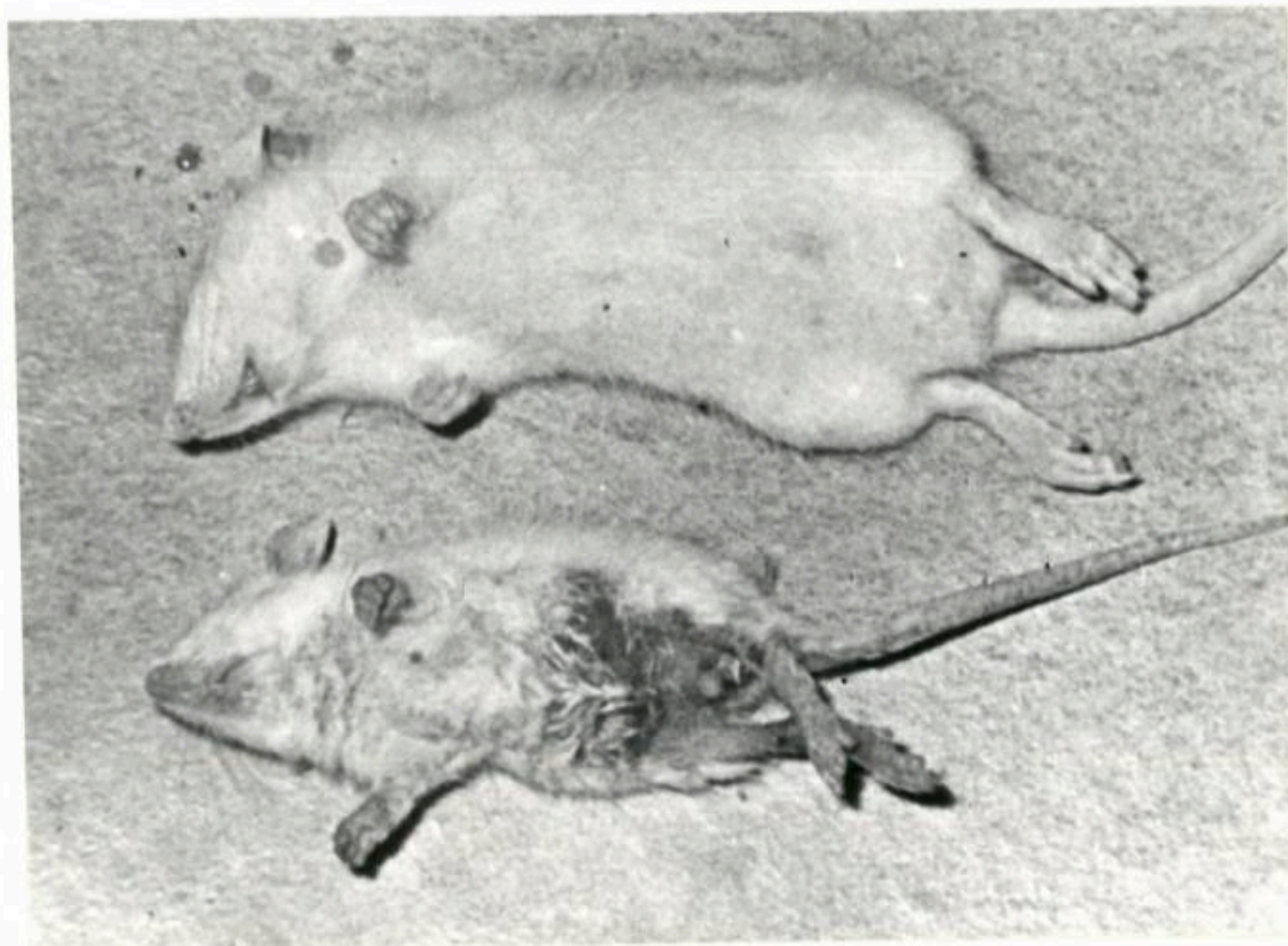
Slika 2. Zaostajanje u rastu i kožne promjene u štakora oboljelog od bolesti kržljanja. Desno je injicirani štakor iz istog legla, bez znakova bolesti.

Na slici br. 3 prikazana su sa lijeve strane mjerila tri štakora iz istog legla u različitim fazama bolesti. Najmanji je počeo najprije kržljati, pa je njegovo zaostajanje u rastu izrazitije u odnosu na druga dva oboljela. Sa desne strane mjerila prikazan je štakor iz istog legla, koji je injiciran stanicama, ali ne pokazuje znakove oboljenja.



Slika 3. Prikazana su tri štakora iz istog legla, u različitim fazama bolesti. Desno je injicirani štakor, iz istog legla, bez znakova bolesti.

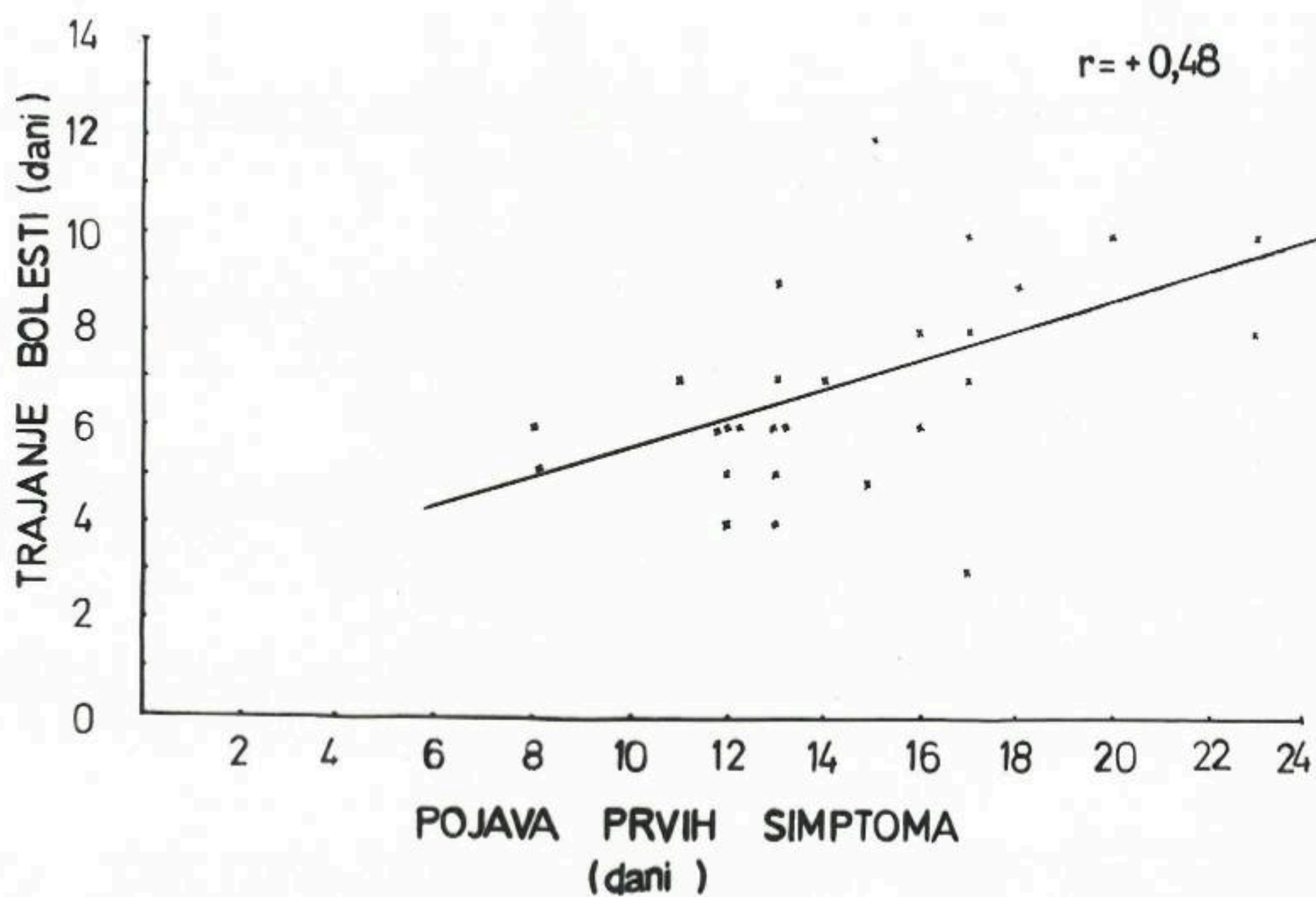
U kontroli razvoja bolesti kržljanja važnu ulogu igra praćenje kliničke slike. Prve se promjene javljaju na koži i počinju iza uški. Koža postaje sve tanja, masna i vremenom slična pergamentu. Često dolazi i do ispadanja dlaka. Uporedo nastaje eritem na uškama i prednjim stranama nogu. Nakon par dana prevalira ekfolijacija, koja se sa tih mjesta širi po čitavom tijelu, posebno abdomenu. Pojavljuju se i kruste (hiperkeratoza), koje imobiliziraju ekstremitete (slika 4.).



Slika 4. Promjene na koži abdomena, ekstremiteta i repa u štakora oboljelog od bolesti kržljanja. Desno je injicirani štakor iz istog legla, bez znakova bolesti.

Prvi se simptomi bolesti (Tablica II) javljaju između 8 i 27-og dana starosti sa medijanom od 14 dana. Životinje koje pokazuju simptome bolesti ugibaju pri starosti od 13 - 33 dana, sa medijanom od 20 dana. Medijan trajanja bolesti iznosi 6 dana, a raspon 3 - 12 dana.

Slika br. 5 prikazuje odnos između pojave prvih simptoma i trajanja bolesti. Postoji statistički značajna korelacija između ovih veličina ($r = + 0,48$; $p < 0,02$). Što bolest u injiciranoj životinji počne kasnije, ako se ocjenjuje pojavom prvih vidljivih simptoma, to će njeno trajanje biti duže.



Slika 5. Odnos između trajanja bolesti i pojave prvih simptoma "kržljanja".

III 2. C.

Diskusija

Homologna bolest detaljno se proučavala na genetski čistim sojevima miševa i štakora. Obzirom da su genetski odnosi u takvim kombinacijama definirani i ujednačeni, većina promatranih parametara bolesti nalazi se u proporcionalnoj ovisnosti od broja injiciranih stanica. Međutim, u populaciji genetski nesrodnih štakora, kao što je naša, ova je ovisnost slabije izražena. To ponovno naglašava najvažniju ulogu koju u transplantaciji stanica i tkiva igraju genetski odnosi.

Rana smrt nastupa unutar prva četiri dana po okožu. S obzirom na vrlo kratki interval, teško je vjerovati da letalni ishod u tom slučaju nastaje kao posljedica djelovanja unesenih stanica, tim više, što se i u grupi štakora injiciranih sa puferiranom Ringerovom rastopinom (2 slučaja) također pojavila rana smrt. Smrt nastupa vjerojatno zbog unašanja relativno velikog volumena tekućine i stanica (Billingham i sur., 1962,; Siskind i Thomas, 1959.a). Treba uzeti u obzir i dodatnu mogućnost utjecaja traumatizacije eksperimentalnom procedurom.

Pod našim eksperimentalnim uvjetima oboljelo je od "prave" bolesti kržljanja 29 štakora (38 %). Treba naglasiti da je davalac unutar jednog legla bio isti, pa je moguće pretpostaviti različitu reaktibilnost stanica davaoca prema pojedinim primaocima u istom leglu, s obzirom na njihovu genetsku nehomogenost. Stanice davaoca, stimulirane su na reprodukciju i imunološko djelovanje genetskom razlikom između njih i primaoca, pa će i njihovo djelovanje biti to jače, što su ove razlike

veće (Cock i Simonsen, 1958.). Ovim se može objasniti i pojavu kržljanja pri injiciranju vrlo različitog broja stanica. U nekim slučajevima i minimalna doza, ako se radi o jakim histokompatibilnim razlikama, dovesti će do bolesti, jer će se unesene imunokompetentne stanice brže reproducirati i tako u samom domaćinu povećavati svoj broj. Važno je misliti na ovu činjenicu, jer mnogi autori smatraju broj injiciranih stanica kritičnim faktorom u izazivanju i tolerancije i bolesti kržljanja. Ovo nam ujedno ukazuje i na relativnu važnost broja injiciranih stanica, jer se on može u samom domaćinu znatno povećati, ako se radi o izuzetno inkompatibilnim kombinacijama, odnosno ostati skoro nepromijenjen u relativno kompatibilnijim kombinacijama. Iz naših pokusa ne može se tačno odrediti kakvi su imunogenetski odnosi između davaoca i pojedinih primalaca, međutim, o njima se može zaključivati iz dobivenih rezultata. Razlika u dinamici i učestalosti bolesti unutar jednog legla, kao i između različitih legala, upućuje na razlike u histokompatibilnosti.

Ako su genetski odnosi isti (kao kod upotrebe genetski čistih sojeva), učestalost bolesti funkcija je doze injiciranih stanica (Egdahl i sur., 1958.). Naši rezultati ne pokazuju takvu pravilnost (Tablica II), što se opet može tumačiti genetskom nehomogenošću naše populacije. Billingham (1958.) nije mogao izazvati u genetski vrlo srodnim kombinacijama miševa bolest kržljanja, ali je zato dobio visok postotak tolerantnih . Teško je očekivati u većem omjeru ovakvu sliku u

našoj populaciji, ali se ona može pretpostaviti u izuzetno povoljnim kombinacijama. Takve kombinacije predstavljaju nam legla 8 i 9 (Tablica I) u kojima je 14 mladih injicirano sa visokim brojem stanica (34 - 68 milijuna), a niti jedan nije pokazivao znakove bolesti kržljanja. Iz ovog primjera ne možemo zaključiti ništa o genetskim razlikama između primalaca, ali možemo pretpostaviti da su razlike u histokompatibilnosti između davaoca i svakog primaoca relativno slabe.

Iz daljnje analize legala možemo zaključiti da se pojedini štakori iz istog legla dosta razlikuju, s obzirom na gene koji određuju histokompatibilnost, pa su jedni više, a drugi manje kompatibilni sa davaocem. Tako napr. u leglu br. 10 (Tablica I), od 6 injiciranih novorođenih štakora sa jednakom vrlo visokom dozom od 61 milijun stanica, samo je jedan pokazivao znakove bolesti kržljanja i uginuo 27. dana nakon okota i injekcije splenocita. Razlike među primaocima još su uočljivije ako analiziramo leglo br. 1. Mladunče iz ovog legla, koje je injicirano sa 8 milijuna splenocita, razvilo je već 8-og dana kliničku sliku bolesti i uginulo 13-og dana. Unutar ovog legla bilo je, međutim, štakora koji su injicirani sa skoro tri puta većom dozom splenocita istog davaoca, a ni jedan nije pokazivao znakove bolesti. Može se očekivati da u nekom leglu histokompatibilni odnosi između davaoca i primalaca budu tako nepovoljni, da će dovesti do ugibanja većine injiciranih štakora. U leglu br. 7 (Tablica I) od 4 injiciranih štakora sva su 4 uginula. Bolest su izazvale doze od 27 do 59 milijuna splenocita.

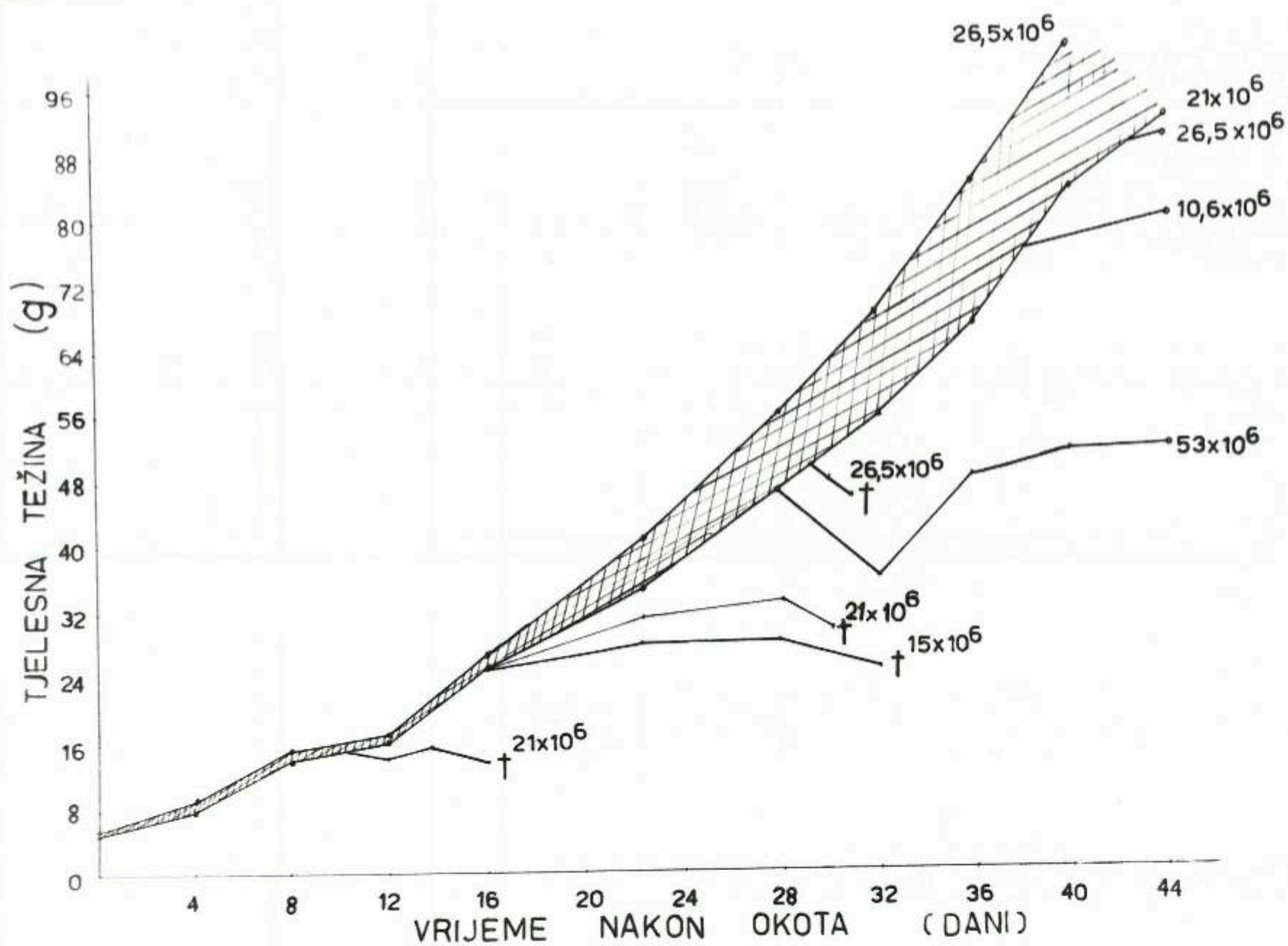
Iako je u drugim leglima bilo mladih koji su injicirani istim ili i većim dozama stanica, mnogi od njih nisu obolili. U našem primjeru primaoci su se vjerojatno znatno razlikovali od davaoca po histokompatibilnim svojstvima što je dovelo do fatalnog ishoda.

U nehomogenoj populaciji štakora, kao što je naša, teško je očekivati povećanu incidenciju bolesti paralelno s povećanjem broja injiciranih splenocita. Ipak naši rezultati ukazuju, da se kod vrlo visokih doza injiciranih stanica može i u genetski nekontroliranim uvjetima očekivati visoka incidencija bolesti kržljanja. Tako na pr. 100 % učestalost bolesti kržljanja, među štakorima injiciranim sa 110 - 150 milijuna stanica, ukazuje na značaj doze i u našim uvjetima. Ovaj efekt postaje još izraženiji kad se uzme u obzir da su sve životinje iz ove grupe injicirane tek drugi dan po okotu, pa se može očekivati slabljenje aktivnosti unesenih stanica zbog sazrijevanja reaktivnosti injiciranog mladunčeta. Nakić (1968.) smatra, da je visok broj injiciranih stanica neophodan, da bi one pod višim "tlakom" uspjele naći "uporište" u limfatičkom aparatu domaćina i dovesti do tolerancije, odnosno bolesti kržljanja. Kapacitet mlade životinje za prijem stanica, maksimalno može biti ograničen na 500,000 do milijun, pa bi injiciranje velikog broja (100 i više milijuna) stanica samo pomoglo da se što veći broj stanica smjesti na povoljna mjesta u domaćina. Na temelju naših rezultata moglo bi se očekivati, da će 100 ili više milijuna alogenih splenocita čak i u nehomogenoj populaciji, kao što je naša, izazvati bolest u većine

životinja.

Bolest kržljanja manifestira se mnogim simptomima koje je moguće klinički pratiti. Injicirane imunokompetentne stanice davaoca, slijedeći svoj instinkt "udomljenja" ("homing"), naseljavaju limfatički aparat domaćina na kojem se i javljaju i prve promjene. Međutim, njihovo djelovanje odražava na cijelom organizmu i narušava normalnu homeostazu. Osim imunološkog aparata, dolazi do poremećaja i drugih sistema, posebno endokrinog i metaboličkog, čemu se u zadnje vrijeme pridaje sve to veća pažnja (Heim i sur., 1966.). Kao rezultat ovako kompleksnog poremećaja, dolazi do promjena na koži i unutarnjim organima, a posebno upada u oči zaostajanje u rastu i u tjelesnoj težini.

U kombinaciji genetski čistih sojeva, povećanjem doze injiciranih stanica - do određene granice smanjuje se proporcionalno veličina do koje životinja naraste. Kako bolest postaje intenzivnija tako se usporuje i prirast tjelesne težine, a ponekad dolazi i do opadanja. To se događa tako pravilno, da se na osnovu kretanja tjelesne težine može prilično tačno utvrditi početak i pratiti tok bolesti kržljanja (Russell, 1962.a). Rezultati na slici 1. pokazuju, da je zaostajanje tjelesne težine oboljelih životinja, u odnosu na kontrolne, to veće, što je nastup smrti kasniji. Ove je promjene mnogo lakše pratiti analizom pojedinog legla. Takvu analizu pokazuje slika br. 6, gdje je prikazano kretanje tjelesnih težina 9 neonatusa iz legla br. 2 (Tablica I).



Slika 6. Utjecaj i.p. injekcije alogenih splenocita jednog davaoca na kretanje tjelesnih težina 9 štakora iz istog legla.

Od injiciranih štakora 4 su uginula od bolesti kržljanja, a 5 ih je preživjelo. Štakori koji su uginuli imali su različito trajanje bolesti. Štakor injiciran sa 26,5 milijuna splenocita uginuo je 30-og dana sa intenzivnim kliničkim znacima kržljanja, nakon vrlo kratke bolesti (svega 3 dana). S obzirom na kratak tok bolesti, zaostajanje njegove težine bilo je najmanje u odnosu na ostalih 5

injeciranih bez znakova bolesti. Obrnuto, novorođenče injicirano sa 15 milijuna stanica imalo je najduže trajanje bolesti, pa je i njegova težina u vrijeme ugibanja (oko 24 g) bila mnogo manja, ako je uporedimo sa težinom životinja bez znakova bolesti (50 - 65 g). Od dvojice kržljavih, koji su injicirani sa 21×10^6 splenocita, jedan zaostaje u težini već 10-og dana, a ugiba 16-og dana, dok drugi tek 16-og dana počinje zaostajati u težini i konačno ugiba 30-og dana. Štakor injiciran najvećim brojem stanica (53 milijuna) počeo je oko 25-og dana gubiti na težini, sa kliničkim znacima bolesti. Međutim, već 32-og dana nastupio je oporavak, a oko 40-og dana nisu više bili vidljivi klinički simptomi bolesti.

Ovi nam podatci daju pravo, da i u našim eksperimentalnim uvjetima govorimo o zaostajanju tjelesne težine kao važnom kriteriju za otkrivanje bolesti i njeno praćenje. Uzrok ove pojave nije u smanjenom rastu unutrašnjih organa, već u depleciji masnog tkiva i zaostajanju rasta skeletnih tkiva (Billingham i sur. 1962).

Kožne promjene, koje se javljaju kod gotovo svih oboljelih životinja, posljedica su specifičnog imunološkog procesa koji se, vjerojatno, očituje u infiltraciji mononuklearnih stanica davacca. Dokaz za to dali su Billingham i suradnici (1962). Oni su pokazali u životinja oboljelih od bolesti kržljanja infiltraciju spomenutih stanica u transplantirani singeni kalem. Infiltracija je, međutim, izostala u istodobno transplantiranom alogenom kalemu koji potječe od davaca splenocita.

Bolest kržljanja počinje vjerojatno mnogo prije pojave prvih kliničkih znakova, jer se u, na prvi pogled, normalnoj životinji mogu naći jake promjene na limfatičkom aparatu. Ovaj period latencije, od injiciranja do pojave vidljivih znakova bolesti, vremenski znatno varira. Međutim, i klinički tok bolesti može biti kraći ili duži. Naši rezultati pokazuju da bolest to duže traje, što se kasnije manifestiraju prvi simptomi. Dulje trajanje bolesti u životinja u kojih se kasnije pojave znaci kržljanja moglo bi se eventualno pripisati njihovoj većoj otpornosti i funkcionalnoj zrelosti.

Aktivnost stranih imunokompetentnih stanica možemo smatrati teškim stresom za mladu individuu. Ovakav stres doводи do aktivacije svih odbrambenih mehanizama organizma, među kojim vidnu ulogu ima osovina hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Ova je osovina u ranom postnatalnom periodu maksimalno angažirana u adaptaciji novorođenčeta na uvjete vanjske sredine, što predstavlja snažni stres - stimulus (Milković i Milković, 1959). Može se pretpostaviti da je dodatna stimulacija primoca, imunokompetentnim stanicama davaoca, u inkompatibilnim kombinacijama, toliko snažna da brzo "iscrpi" kapacitet osovine, što bi omogućilo brže propadanje nezrele individue. U kompatibilnijim kombinacijama, međutim, osovina bi kroz duže vrijeme mogla kompenzirati nepovoljne učinke na organizam. Reaktivnost raste sa starošću i dostiže normalnu reaktivnost odrasle individue negdje oko 28-og dana nakon oketa, tj. u vrijeme prestanka dojenja i osamostaljenja mla-

dunčeta. Moglo bi se pretpostaviti da je dulje trajanje bolesti kod starijih životinja posljedica "normaliziranja" funkcije ne samo ovog, već i drugih homeostatskih mehanizama, pri čemu naročitu pažnju treba obratiti sazrijevanju imunološkog sistema.

III 3. PRIJENOS TRANSPLANTACIJSKOG IMUNITETA SA MAJKE NA ČEDO

III 3. A. Materijal i metode

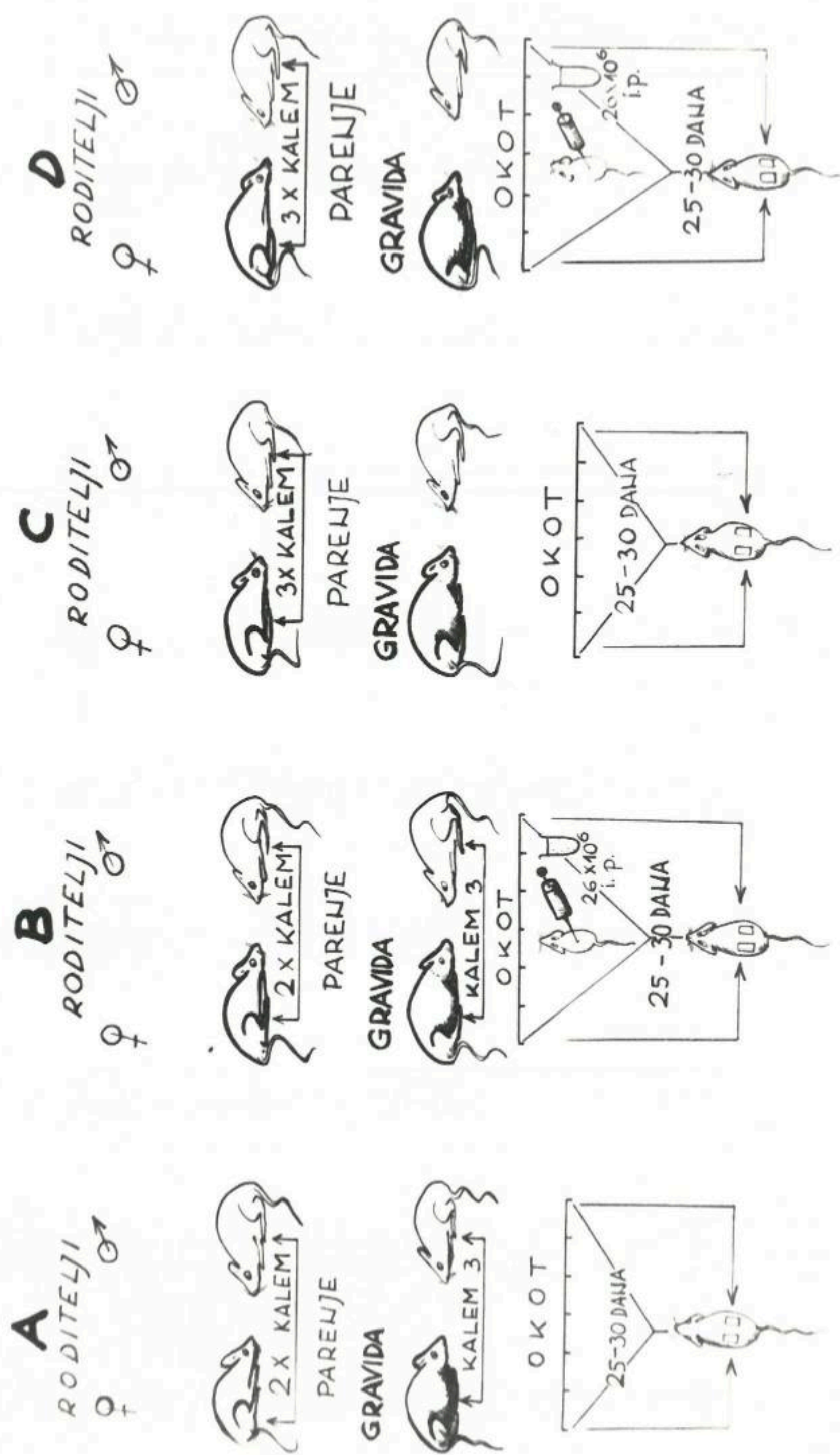
III 3.A.a. Izbor životinja

U pokusima smo upotrijebili 26 parova štakora, budućih roditelja. Roditeljske smo parove odabirali slučajnim izborom mužjaka i ženki, starosti 2 do 3 mjeseca. Nakon izvršene senzibilizacije izmjenom kalema između budućih roditelja, prema eksperimentalnom protokolu, životinje su stavljane u odvojene kaveze na rasplod. Mužjak je odvajan od ženke kada je sigurno utvrđen graviditet.

III 3.A.b. Plan pokusa

Plan pokusa sa 4 pokusne grupe, označene slovima A, B, C i D, prikazan je na slici 7. Postupak sa budućim roditeljima bio je identičan za grupe A i B, odnosno C i D.

U grupama A i B izmijenjena su po 2 kalema između budućih roditeljskih partnera, prije stavljanja na rasplod. Pri kraju trudnoće, 3 - 4 dana prije okota, izmijenjen je među roditeljima i treći kalem. Roditeljski parovi u grupama C i D senzibilizirani su kalemom kože na sličan način, s tom razlikom, što su sva tri unakrsna kalema transplantirana prije stavljanja na rasplod. Opisana trokratna senzibilizacija



Slika 7. Plan pokusa sa 4 pokusne grupe. Prikazan je način senzibilizaci-
je roditelja i postupak sa njihovom mladunčadi.

roditeljskih parova, kožnim kalemom, obavljena je unutar mjesec dana, s tim što je slijedeći kalem (drugi ili treći) transplantiran uvijek nakon što je predhodni kalem bio odbačen. Pri tome, evidentirano je i vrijeme odbacivanja.

Unutar 48 sati po okotu injicirali smo intraperitonealno mladunčad iz grupa B i D sa 26×10^6 splenocita oca (senzibilizirani na kožni kalem majke). Mladunčad iz svih grupa, 25-30 dana po okotu, kalemili smo kožom oba roditelja. Pratili smo zatim vrijeme odbacivanja roditeljskih kalema. Krvne uzorke, za određivanje titra hemaglutinina, uzimali smo nakon što je kalem odbačen, odnosno 30-og dana nakon kalemljenja u "tolerantnih" životinja.

III 3.A.c. Kontrolne grupe

Osim opisanih pokusnih grupa upotrijebili smo i dvije kontrolne grupe (Kontrola I i Kontrola II). Kontrola I, daje nam uvid u normalno vrijeme odbacivanja roditeljskih kalema od strane mladih. U ovom slučaju nisu bili prethodno senzibilizirani ni roditelji (kožnim kalemom) ni njihova mladunčad (očevim splenocitima). Istovremeno, 25-30 dana nakon okota, bili su međusobno kalemljeni i roditelji, da bi se dobio uvid u odnose histokompatibilnosti među njima. Nakon odbacivanja kalema uzimali smo od mladih serum za test hemaglutinacije. I u ovoj grupi mladunčad smo kalemili u starosti od 25 - 30 dana.

Kontrola II, odnosi se na pokusne grupe B i D, injicirane i-

munim stanicama oca. Prije stavljanja u rasplod senzibiliziran je samo mužjak trokratnim kalemljenjem sa kožom ženke. Na ženki, dakle, nije vršena nikakva intervencija. Novookoćenu mladunčad injicirali smo unutar 48 sati po okotu sa 26×10^6 očevih splenocita senzibiliziranih na kožne antigene majke. Pratili smo zatim razvoj bolesti kržljanja, a preživjelu mladunčad kalemili smo pri starosti od mjesec dana kožom oba roditelja.

III 3.A.d. Kategorizacija stupnja tolerancije roditeljskih kalema

Prema medianu vremena preživljavanja (MVP) kožnog kalema roditelja, u odnosu na Kontrolu I, sve smo životinje podijelili u 3 grupe : a/ netolerantne, b/ djelomično tolerantne i c/ tolerantne.

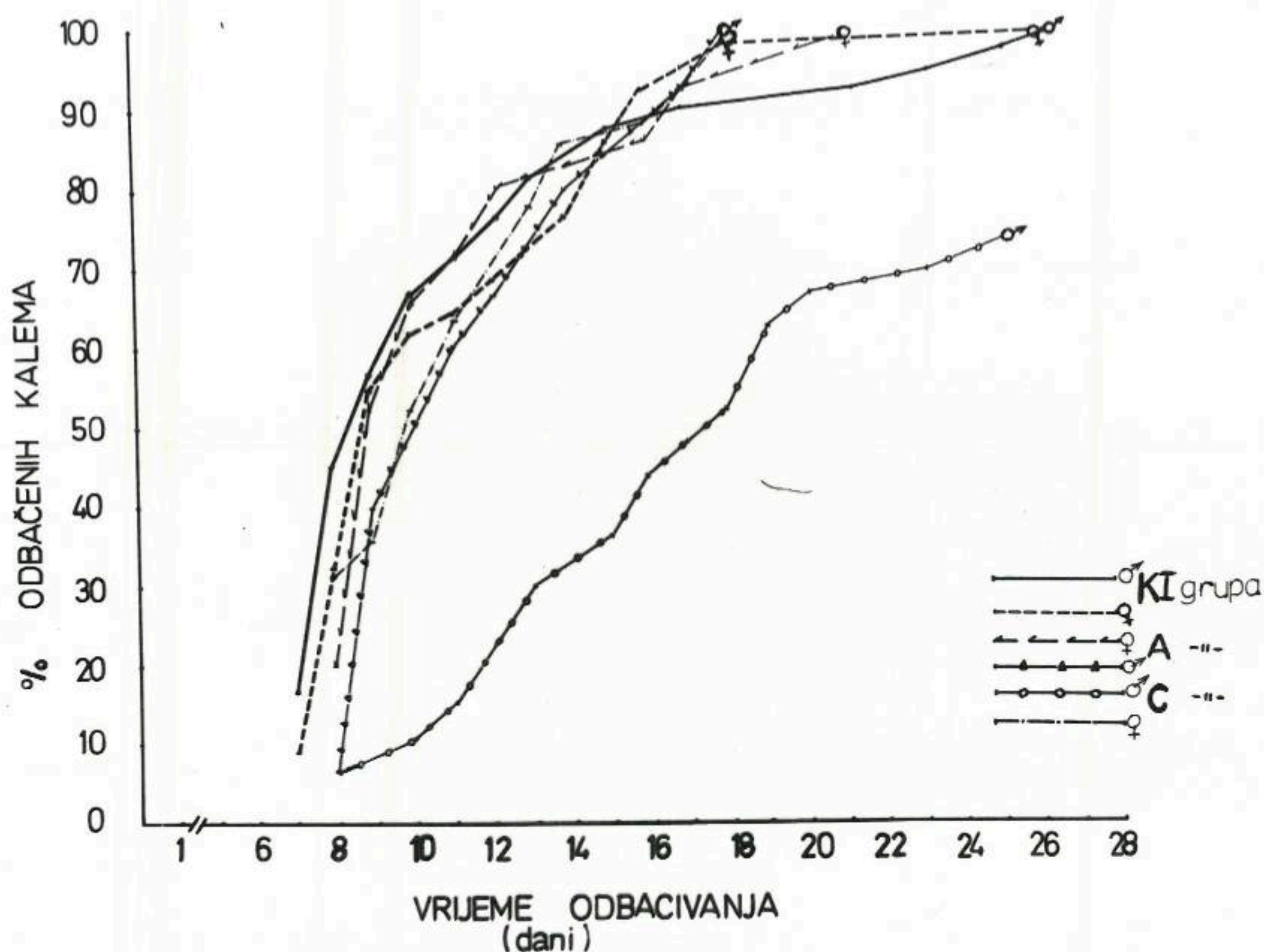
a/ Netolerantne.. U ovu smo grupu svrstali životinje čije je vrijeme preživljavanja kožnog kalema roditelja bilo ispod vrijednosti MVP + 3 SD (median vremena preživljavanja + trostruka standardna devijacija) kontrolnih životinja.

b/ Djelomično tolerantne. Ovoj grupi pripadaju sve životinje kod kojih je preživljavanje kožnog kalema roditelja duže od MVP + 3 SD, a manje od trostruke vrijednosti MVP za kontrolne životinje.

c/ Tolerantne. Među tolerantne ubrajali smo sve životinje kod kojih je roditeljski kalem preživio duže od trostruke vrijednosti MVP roditeljskog kalema kontrolnih štakora.

III 3. B. Rezultati

Dinamika odbacivanja roditeljskih kalema u mladunčadi, od roditelja koji nisu prethodno tretirani, prikazana je krivuljama na slici 8 i ponovljeno na slici 9 (Kontrolna grupa I). Jedna krivulja prikazuje vrijeme odbacivanja i postotak odbačenih očevih kalema, a druga majčinih kalema. U kontrolnoj grupi (Kontrolna grupa I) nalazilo se ukupno 42 mlada štakora iz 8 legala. Svaki je štakor istovremeno kalemljen sa kalemima oba roditelja. Krivulje odbacivanja očevog kalema i majčinog kalema, u ovoj grupi, pokazuju dosta sličnosti. Neke životinje počinju sa odbacivanjem već 7-og dana nakon transplantacije, Ovom ranom odbacivanju više podliježu očevi kalemi nego majčini. U prvoj fazi (do 13-og dana nakon kalemljenja) krivulja odbacivanja očevog kalema je strmija nego krivulja odbacivanja majčinog kalema, a od 13-og do 18-og dana, naprotiv, brže se odbacuju kalemi majke. 18-og dana odbačeno je 98% kalema majke i svega 90% očevih kalema. Zanimljivo je, međutim, da se odbacivanje svih kalema u ovoj grupi završava istog, tj. 26-og dana nakon transplantacije. Median vremena preživljavanja(MVP) za kalem majke iznosi $9,7 \pm 1,4$ dana, a za kalem oca $8,8 \pm 1,6$ dana.

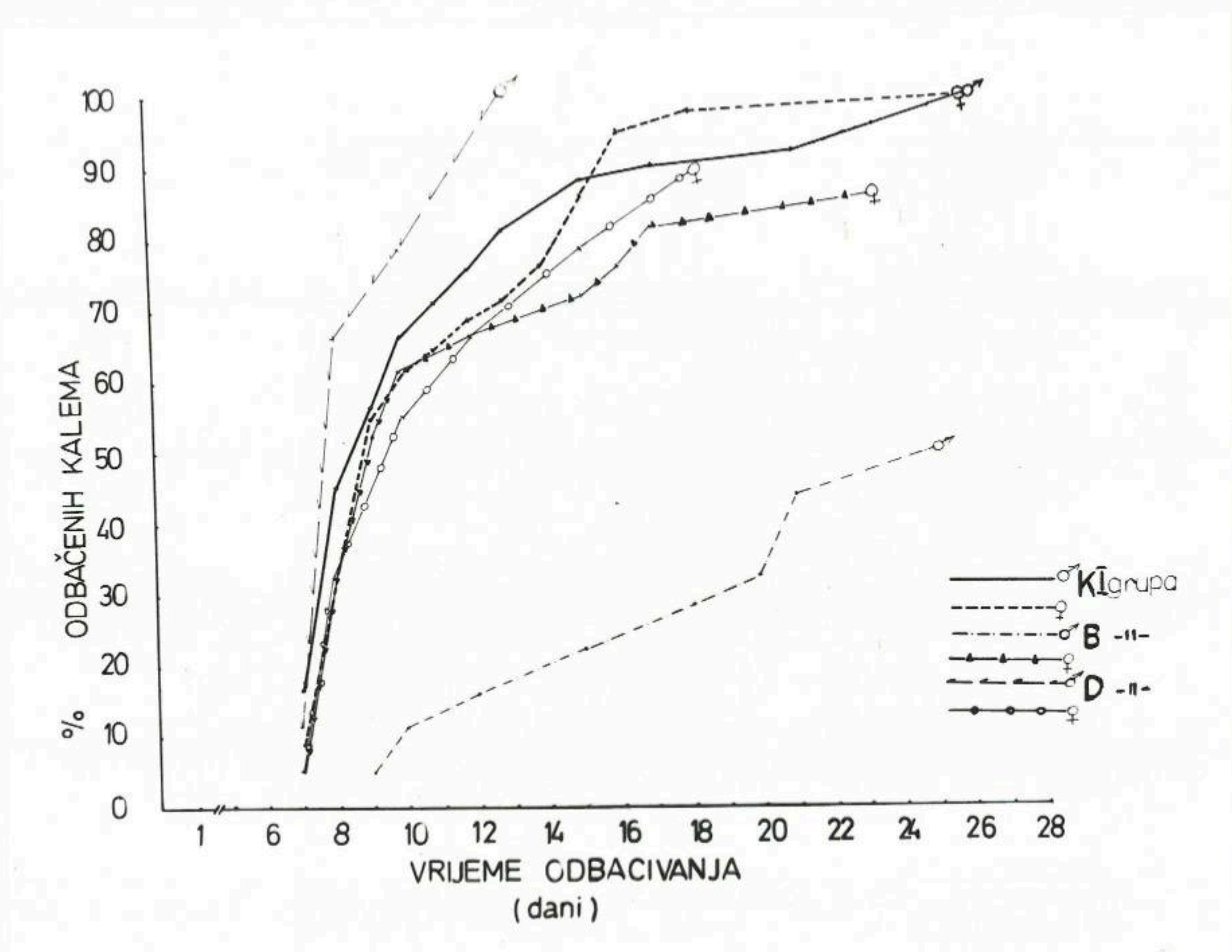


Slika 8. Odbacivanje roditeljskih kalema kože u mladunčadi senzibiliziranih majki.

Iako se veći broj očevih kalema duže prihvaća, njihov median vremena preživljavanja kraći je nego za majčin kalem, zbog toga što se većina očevih kalema odbacuje u prvoj fazi brže, nego kalemi majke.

Krivulje koje se odnose na odbacivanje kalema u mladunčadi senzibiliziranih roditelja prikazane su na slici 8 (pokusne grupe A i C). Odbacivanje kalema kože koji potječu također

od senzibiliziranih roditelja, u mladunčadi koja je injicirana splenocitima oca, prikazano je krivuljama na slici 9 (pokusne grupe B i D).



Slika 9. Efekt očevih splenocita na odbacivanje roditeljskog kalema kože u mladunčadi senzibiliziranih majki.

Mladi iz grupe A (slika 8) odbacuju kalem roditelja slično kao i kontrolne životinje. Odbacivanje očevog kalema završava doduše nešto ranije (18-og dana), a 23-eg dana

odbačen je i posljednji kalem majke.

Pokusna grupa C (slika 8) pokazuje znatne razlike u odnosu na prethodne grupe. Unutar same grupe upadljiva je razlika između krivulje odbacivanja očevog i majčinog kalema. U ovoj grupi već 8-og dana odbačeno je 32% majčinih kalema, a daljnji tok krivulje vrlo je strm. Odbacivanje završava 18-og dana. Krivulja odbacivanja očevog kalema pokazuje postepeni uspon, a 8-og dana odbačeno je tek 7% kalema. Oko 26-og dana odbačeno je samo 74% očevih kalema transplantiranih na mlade. Ostale grupe životinja prikazane na slici 8, odbacile su već u to vrijeme sve kaleme, bilo jednog bilo drugog roditelja.

Efekt intraperitonealne injekcije očevih splenocita na odbacivanje roditeljskih kalema prikazan je na slici 9. Majke su senzibilizirane na očev kalem, a mladi su injicirani očevim splenocitima, koji su pak imunizirani kalemom majke. U odnosu na prethodne grupe (A i C) razlika se sastoji samo u tome što su mladi injicirani intraperitonealno sa 26×10^6 splenocita. Krivulje odbacivanja kalema kontrolnih životinja prikazane su ponovno na slici 9 radi lakše usporedbe.

U pokusnoj grupi B vidi se razlika u dinamici odbacivanja između očevog i majčinog kalema. Mladi počinju odbacivati očev kalem tek 9-og dana nakon transplantacije (svega 5%), a krivulja pokazuje vrlo blagi uspon. Trećina ukupnog broja kalema odbačena je tek 20-og dana, a 26-og dana polovina. Kalem majke mladi počinju odbacivati već 7-og dana (5%), a zatim krivulja poprima vrlo strmi tok do 10-og dana, kada je odbačeno već 62% kalema. Do 23-eg dana odbacivanje je izrazito uspo-

reno, i odbacuje se ukupno 86% kalema.

U grupi D mladunčad odbacuje očev kalem ranije nego kontrolna grupa i bilo koja pokusna grupa. Već 13-og dana odbačeni su svi očevi kalemi, nakon vrlo strmog toka krivulje odbacivanja. Kalemi majke sporije se odbacuju, a odbacivanje počinje 8-og dana (33 %), za razliku od očevog kalema kojeg mladi odbacuju već 7-og dana. 18-og dana odbačeno je 89 % majčinih kalema (jedan od 9 mladih nije odbacio kalem u pomenutom periodu).

Incidencija tolerancije na roditeljski kalem u sve 4 pokusne grupe prikazana je posebno za kalem majke (Tablica III) i kalem oca (Tablica IV). Na Tablici III opisana je reaktivnost svih mladih štakora na kožni kalem majke uspoređivanjem postotka netolerantnih, djelomično tolerantnih i tolerantnih životinja.

Medijan vremena preživljavanja (MVP) za kalem majke, u kontrolnih životinja, iznosi $9,7 \pm 1,4$ dana. U grupu netolerantnih spadaju svi štakori koji odbacuju kalem majke do 14-og dana nakon transplantacije. Djelomično tolerantni štakori odbacuju kalem majke u periodu od 15-og do 29-og dana, a tolerantni nose kalem preko 29 dana.

Prema ovom kriteriju, kako se vidi iz Tablice III,^u Kontrolni I nema uopće tolerantnih štakora, dok je postotak netolerantnih vrlo visok (76 %). U grupama A i C mladunčad reagira na kožni kalem majke gotovo isto kao i kontrolne životinje. U tim grupama, također nema tolerantnih. Izvjesna odst-

TABLICA III

REAKTIVNOST MLADIH ŠTAKORA NA KOŽNI KALEM MAJKE

GRUPA	PROJ MLADIH	NETOLERANTNI	DJELOMIČNO TOLERANTNI	TOLERANTNI
Kontrola I	42	32 (76 %)	10 (24 %)	0
A	15	12 (80 %)	3 (20 %)	0
B	21	14 (67 %)	4 (19 %)	3 (14 %)
C	28	23 (82 %)	5 (18 %)	0
D	9	6 (67 %)	2 (22 %)	1 (11 %)
Kontrola II	8	8 (100 %)	0	0

TABLICA IV

REAKTIVNOST MLADIH ŠTAKORA NA KOŽNI KALEM OCA

GRUPA	BROJ MLADIH	NETOLERANTNI	DJELOMIČNO TOLERANTNI	TOLERANTNI
Kontrola I	42	34 (81 %)	8 (19 %)	0
A	15	12 (80 %)	3 (20 %)	0
B	18	3 (17 %)	6 (33 %)	9 (50 %)
C	27	8 (30 %)	12 (44 %)	7 (26 %)
D	9	9 (100 %)	0	0
Kontrola II	8	8 (100 %)	0	0

panja nalazimo tek u grupama B i D, gdje se tolerantni pojavljuju u 14, odnosno 11 % kalemljenih. Postotak djelomično tolerantnih u ove dvije grupe gotovo je isti ili nešto niži nego u ostalim grupama. Netolerantni štakori zastupljeni su nižim postotkom nego u ostalim grupama i to otprilike toliko nižim koliko je viši postotak tolerantnih.

Štakori iz Kontrolne grupe II injicirani splenocitima očeva, koji su prethodno trokratno kalemljeni kalemom majke, pokazuju najveće odstupanje od ostalih grupa. Svi štakori iz ove grupe odbacuju kalem majke^{de} 14-og dana, pa nema niti djelomično tolerantnih.

Medijan vremena preživljavanja (MVP) za očev kalem, u grupi kontrolnih štakora (Kontrola I) iznosi $8,8 \pm 1,6$ dana. Prema tome, u netolerantne spadaju štakori koji odbacuju kalem do 14-og dana, a u djelomično tolerantne oni koji odbacuju kalem između 15-og i 27-og dana. Svi štakori koji nose kalem duže od 27 dana spadaju u tolerantne životinje.

U grupi kontrolnih štakora (Kontrola I) nema tolerantnih, a postotak^{ne} tolerantnih iznosi 81 % (Tablica IV). U pogledu incidencije tolerancije grupa A se ne razlikuje bitno od Kontrole I. U grupama D i Kontroli II, svi štakori spadaju u grupu netolerantnih. Naprotiv, grupe B i C pokazuju u tom pogledu znatne razlike prema ostalim grupama. Ne samo da se u ovim grupama pojavljuju tolerantne životinje, nego je i postotak takvih, naročito u B grupi, relativno visok. Treba istaći i to, da je i postotak netolerantnih u ove dvije grupe

relativno nizak i to 17 % u B grupi i 30 % u C grupi.

Iz uporedbe reaktivnosti mladih štakora, u pogledu stupnja tolerancije na kožni kalem oca i majke, vidi se da se najviši stupanj tolerancije postiže u pokusnim grupama B i C, na kalem oca. Da bi odredili značajnost ovog zapažanja posebno smo prikazali medijane vremena preživljavanja (MVP) roditeljskih kalema u svim pokusnim i kontrolnim grupama, ne uzevši u obzir tolerantne štakore. Tablica V pokazuje da se upravo grupe B i C značajno razlikuju od svih ostalih pokusnih grupa.

Da bi što potpunije odredili reaktivnost mladih u opisanim pokusnim grupama, osim incidencije tolerancije i određivanja medijana vremena preživljavanja kožnog kalema, pratili smo i titar serumskih aglutinina protiv eritrocita oca i majke. Nakon što su kalemi odbačeni, odnosno kod tolerantnih životinja, 30-og dana nakon tarsplantacije kože, određivani su serumski hemaglutinini, a njihova aktivnost izražavana je kao \log_2 titra.

Rezultati hemaglutinacijske reaktivnosti krvnog seruma mladunčadi prikazani su na Tablici VI. Iz Tablice se vidi da je u svim pokusnim grupama, pa i kontrolnoj, titar hemaglutinina nešto viši protiv eritrocita majke, nego protiv eritrocita oca. Nadalje, vrlo je niska vrijednost titra u grupi D na eritrocite oba roditelja, a u grupi C posebno na eritrocite oca.

TABLICA V

MEDIAN VREMENA PREŽIVLJAVANJA RODITELJSKIH KALEMA TRANSPLANTIRANIH
NA MLADE (TOLERANTNI ŠTAKORI NISU PRIKAZANI)

GRUPA	KALEM MAJKE	KALEM OCA	p
Kontrola I	9,7 _± 1,4	8,8 _± 1,6	
A	9,2 _± 1,5	10,5 _± 1,3	$\sigma^2 (B : D) < 0,01; \sigma^2 (B : A) < 0,05$
B	9,1 _± 1,5	14,9 _± 1,5	$\sigma^2 B : Q B < 0,01; \sigma^2 (B : KII) < 0,01$ $\sigma^2 (B : KI) < 0,01$
C	9,8 _± 1,4	14,1 _± 1,4	$\sigma^2 (C : D) < 0,01; \sigma^2 (C : A) < 0,05$ $\sigma^2 C : Q C < 0,01; \sigma^2 (C : KI) < 0,01$ $\sigma^2 (C : KII) < 0,01$
D	9,02 _± 1,5	8,1 _± 1,2	
Kontrola II	8,1 _± 0,6	8,9 _± 0,8	

TABLICA VI

SREDNJA VRIJEDNOST TITRA HEMAGLUTININA (\log_2) U SERUMU
MLADIH NAKON ODBACIVANJA RODITELJSKOG KALEMA

ERITROCITI	KONTROLA I	S	E	R	U	M
		A	B	C		D
OCA	2,3	3,6	2,2	0,39		0,44
MAJKE	3	4,1	3,4	1,7		0,66

U svim grupama, u kojima su injicirani očevi splenociti, pojavila se i bolest kržljanja, pa su neki od štakora od nje i ugibali. Tako je u grupi B uginulo 8 od 29 injiciranih štakora (28 %), a u grupi D dva od 13 injiciranih štakora (15 %). Najveću incidenciju (55 %) letalnih ishoda od bolesti kržljanja primijetili smo u kontrolnoj grupi II, u kojoj je uginulo 10 štakora od ukupno 18 injiciranih.

U dva slučaja pokušali smo predvidjeti koji od mladih, nakon injekcije senzibiliziranih očevih splenocita, ima najviše izgleda da oboli od bolesti kržljanja. Zato smo iz dva legla iz grupe B žrtvovali po jednog kržljavogⁱ testirali njegov serum sa eritrocitima oca. Oba su pokazala odsustvo hemaglutinacijskih antitijela protiv eritrocita oca.

TABLICA VII

ODNOS IZMEĐU HEMAGLUTINACIJSKIH ANTITIJELA I
BOLESTI KRŽLJANJA

Titar hemaglutinina (\log_2) u serumu kržljavih protiv eritrocita oca	
l e g l o 1	l e g l o 2
0	0

Titar hemaglutinina (\log_2) u serumu oca protiv eritrocita mláduńčadi		
Mladunčę broj	l e g l o 1	l e g l o 2
1	8 (kržljavi)	6 (kržljavi)
2	5	4
3	7	7
4	1	7
5	6	
6	7	
7	9	
8	0	
9	5	

Napomena : Titar hemaglutinina (\log_2) u serumu oca
protiv eritrocita majke ;

leglo 1 = 9

leglo 2 = 7

Serum oca, koji je imuniziran kožnim kalemom na majku, pokazivao je gotovo istu aktivnost protiv eritrocita majke, kao i protiv eritrocita mladih (Tablica VII). Međutim, u oba legla bilo je mladih (napr. broj 6 iz legla 1 i broj 2 i 3 iz legla 2), protiv čijih je eritrocita serum oca pokazivao i veću aktivnost, ali očevi splenociti u njima nisu doveli do bolesti kržljanja.

III 3.C.

Diskusija

Iako je organizam majke imunološki zreo, on ipak pokazuje neke posebne karakteristike u trudnoći i u periodu nakon poroda. Poznato je, naime, da imunološka reaktivnost majke na transplantacijske stimule, u ovoj dobi, može biti znatno izmijenjena. Tako napr. majka može biti djelomično tolerantna na alokalem mužjaka sa kojim je više puta dala potomstvo. Štoviše, majka može duže nositi i kalem mužjaka sa kojim je više puta bila samo parena, bez naknadne trudnoće (Hašek i sur., 1962.). Umjesto očekivanog imuniteta dobija se, u ovom slučaju, prividno paradoksalan efekt smanjenja reaktivnosti na antigene mužjaka. Medawar i Sparow (1956.) ističu da ovaj efekt ovisi o specijes. No, i unutar jedne specijes, spomenuti efekt se ne mora redovito očitovati, što ovisi o kombinaciji sojeva.

U nastojanju da protumače mehanizam ove pojave Breyer i Barrett (1960.) navode da bi prolaz fetalnih stanica mogao desenzibilizirati majku i prema mužjaku i prema mladunčetu.

Te potvrđuju i eksperimentalni podaci prema kojima i majka i njeno mladunče, u štakora i pasa, pokazuju uzajamnu toleranciju neposredno poslije okota. (Anderson, 1965.). Prema tome, ovakva tolerancija u majke na kalem mladunčeta, inducirana je u odraslom organizmu prirodnim putem, što je razlikuje od aktivno stečene imunološke tolerancije. Ovo stanje podsjeća na primjere tolerancije u heterozigotnih blizanaca čovjeka i goveda (Owen, 1945.; Woodruff i Lennox, 1959.).

Na temelju iznesenog može se smatrati da između majke i čeda dolaze više do izražaja mehanizmi koji olakšavaju kompatibilnost, nego oni koji induciraju imunitet.

Slični su odnosi i između ljudskog novorođenčeta i majke, jer majka tolerira kalem čeda (Peer i sur., 1958.). Peer (1958.) je presađivao i kožne kaleme roditelja na njihovu djecu, pa je također primijetio duže preživljavanje samo majčinog kalema. Ovaj nalaz Peer tumači prethodnim izlaganjem čeda antigenima majke, što rezultira u indukciji nekog stupnja tolerancije. Slične je rezultate dobio i Rogers sa suradnicima (1960.), u pokusima sa novočkoćenim štakorima.

III 3.C.a. Preživljavanje roditeljskih kalema. Uvjete slične opisanim imali smo i u našim pokusima i to u grupi Kontrola I, u kojoj su kalemi roditelja presađeni na mladunčad. Prema našoj kategorizaciji stupnja tolerancije nismo našli ni jedno tolerantno mladunče, bilo prema kalemu oca ili majke (Tablice III i IV). Ipak,

treba spomenuti da je postotak djelomično tolerantnih bio nešto veći prema kalemu majke (24 %), nego prema kalemu oca (19 %). I median vremena preživljavanja također ukazuje na male razlike, jer je MVP za kalem majke $9,7 \pm 1,4$ dana, a za kalem oca $8,8 \pm 1,6$ dana. Međutim, ove razlike nisu statistički značajne pa protivno podacima iz literature, čini se da u našim eksperimentalnim uvjetima nema razlike u odbacivanju roditeljskih kalema.

Međutim, dok mladunčeta u vrijeme testiranja sa kožnim kalemima roditelja vjerojatno može, u tom pogledu, imati odlučan utjecaj. Naime, životinja stara mjesec dana imunološki je već prilično zrela, a većina spomenutih autora dobila je duže preživljavanje kalema majke, u eksperimentalnih životinja, samo ako su kalemljenje vršili kratko vrijeme po rođenju mladunčadi. U kasnijoj fazi ovaj efekt se gubi, jer mladunče dostiže punu imunološku reaktivnost.

Iako u kontrolnih životinja nema razlike u vremenu odbacivanja očevog i majčinog kalema, takve se razlike ipak nalaze u nekim od pokusnih grupa u kojima je majka prethodno kalemljena kožom mužjaka, a mladunče nije prethodno ničim tretirano. Tako u grupi C očev kalem preživljava značajno duže nego majčin kalem, a također duže i od očevog kalema kontrolnih životinja (slika 8 i Tablica V).

Produženje života očevog kalema, u grupi C, očituje se i u incidenciji tolerancije na očev kalem (Tablica IV). Naime, broj netolerantnih životinja iznosi svega 30 % (prema 81 % u

Kontroli I), djelomično tolerantni 44 %, a tolerantnih 26 %. Ovo produženje života očevog kalema možemo pripisati samo trokratnom kalemljenju majke sa kožom oca, jer je to i jedina razlika u tretmanu životinja pokusne grupe C, prema Kontroli I.

Interesantno je, međutim, da mladunčad u grupi A ne pokazuju ovakav efekt, iako su majke ovih štakora također trokratno kalemljene kožom oca. Rezultati prikazani na Tablicama III i IV pokazuju da je isti postotak netolerantnih i djelomično tolerantnih (80 %, odnosno 20 %) na kaleme oca i majke. Ujedine su ovi podaci skoro potpuno identični sa rezultatima za kontrolne životinje. Nešto veći MVP za kalem oca, nije statistički značajan (Tablica V).

Iz Tablice V vidi se i to da očev kalem presađen na mladunčad u grupi C preživljava i značajno duže, nego očev kalem u mladunčadi grupe A, iako su majke mladunčadi obiju grupa bile trokratno kalemljene kalemom oca.

Čini se da je za opisanu pojavu odgovorno vrijeme ušivanja trećeg kalema majci, jer je to i jedina razlika između pokusnih grupa A i C. Naime, u obje grupe majke su trokratno kalemljene kožom mužjaka, ali su u grupi C sva tri kalema stavljana prije rasploda, dok je u grupi A treći kalem ušiven pri kraju trudnoće (slika br. 7). Prema tome, može se govoriti o vremenu stavljanja trećeg kalema kao "kritičnom" faktoru koji bitno utječe na sudbinu očevog kalema presađenog mladunčetu.

Sličan eksperimentalan model, kao naš u pokusnoj grupi A, upotrijebio je i Stastny (1965.). Međutim, on je treći kalem na majku stavljao u različito vrijeme u toku trudnoće. Ako je treći kalem stavljao u periodu od 4 - 10 dana prije okota, onda je mladunčad ubrzano odbacivala isti kalem. Stavljanje trećeg kalama u trudnoći prije ili poslije ovog vremena nije imalo nikakvog utjecaja na reaktivnost mladunčadi. Naši rezultati u grupi A, u kojoj je majka treći put kalemljena 3 - 4 dana prije okota, također ukazuje da nema znatnijih odstupanja u brzini odbacivanja očevog kalema, u usporedbi sa kontrolnim životinjama.

Ubrzano odbacivanje alokalema kože očevog soja, u mladunčadi štakora čije su majke bile prethodno senzibilizirane kožom istog davaoca, Stastny (1963., 1965.) smatra aktivnom reakcijom mladunčeta, a ne prijenosom imuniteta sa majke. Naime, i mladunčad majki tolerantnih na tkivo davaoca daje isti, ubrzani odgovor. Do aktivnog odgovora mladunčeta došlo bi zato, što transplantacijski antigeni oslobođeni iz kalema, presađenog na majku, mogu proći placentarnu barijeru i ući u organizam čeda. Da mladunče može biti aktivno imunizirano potvrđuju i drugi autori (Howard i Michie, 1962.; Billingham i sur., 1965.).

Prijenos transplantacijskog imuniteta sa majke na čedo dokazali su Halasz i Orloff (1963.) i u kunića. Što je bila jača senzibilizacija majke, to je jača i reaktivnost čeda na kožni alokalem. Ubrzano odbacivanje kalema, u mladunčadi senzibiliziranih majki, pokušavaju tumačiti prijenosom sesilnih,

obično za limfocite vezanih, antitijela. Prema njihovom mišljenju ova bi se antitijela mogla odvojiti od limfocita majke, proći kroz placentarnu barijeru i vezati na limfocite čeda, a ujedno bi bila i odgovorna za odbacivanje specifičnog kalema presađenog na mladunče.

Međutim, mnogo je teže objasniti produženo preživljavanje očevog kalema u našoj pokusnoj grupi C, u kojoj su majke trokratno kalemljene prije stavljanja na rasplod. U prilog ovog opažanja govore i rezultati Gorer-a (1962.). On je također primijetio da se prethodnim kalemljenjem majke, alogenim kalemom kože, osigurava duže preživljavanje istog kalema u mladunčadi. Voisin (1962.) smatra da se ovaj nalaz Gorera može objasniti jedino imunološkom facilitacijom, koja bi zbog prijelaza facilitacijskih antitijela iz majke kondicionirala čedo za dulje nošenje specifičnog kožnog kalema. Tome je u prilog i činjenica da facilitacijska antitijela zadržavaju svoju aktivnost tjednima (Voisin, 1962.). Čini se da noviji ^{nalazi} imunokemijski idu u prilog Voisin-ovoj hipotezi. Ustanovljeno je, naime, da tzv. "enhancement" (facilitacijska) antitijela po svojoj kemijskoj građi pripadaju antitijelima tipa 7S (Tokuda i McEntee, 1967.), tj. antitijelima koja lakše prolaze kroz placentarnu barijeru. I opažanje da se imunološka facilitacija lakše i uniformnije postiže pasivnom nego aktivnom imunizacijom (Kaliss, 1962.), u skladu je sa predloženom koncepcijom o specifičnom kondicioniranju mladunčeta.

Radi cjelovitije analize mogućnosti nastanka imunološke facilitacije u mladunčetu, vrijedno je istaći i mišljenje Kaliss-a (1966.) da je imuni odgovor domaćina na alogene tkive bifazičan. U prvoj fazi (1 - 2 tjedna od stavljanja kalema) prevladava "celularni" odgovor, a u drugoj humoralni, koji dostiže maksimum u periodu od drugog do četvrtog tjedna, a tada je celularni odgovor već bitno oslabljen.

Usporedimo li na temelju ovoga, naše rezultate dobivene različitim intervencijama na majkama A i C grupe, mogli bi sa sigurnošću reći da je stavljanje trećeg kalema pri kraju trudnoće presudan faktor koji može preinačiti utjecaj imuniteta majke na imunološku reaktivnost čeda. Štoviše, rezultati i zaključci pomenutih autora sugeriraju i objašnjenje za mehanizam nastanka opisanih pojava. Možda treći kalem, stavljen pri kraju trudnoće (A grupa), "veže" humoralna antitijela stvorena prethodnim kalemljenjem u cirkulaciji majke i tako smanjuje mogućnost njihovog prijenosa na čedo.

Lako je predočiti si, da su na sličan način mogla biti uklonjena i facilitacijska antitijela, pa da zbog toga, možda, izostaje specifično kondicioniranje mladunčeta. Ovaj se efekt dakako ne bi mogao očitovati u slučaju kad je majka imunizirana sa sva tri kalema prije trudnoće (C grupa), a prema Kaliss-ovoj (1966.) interpretaciji bilo bi dovoljno vremena da se u majke, u tom slučaju, potpuno i nesmetano razvija humoralni imunitet.

Mnogo su kompliciraniji odnosi u pokusnim grupama B i D, jer su mladunčad senzibiliziranih majki (na isti način kao i u grupama A i C), još i injicirana ^{imunim} splenocitima oca . Prema dobivenim rezultatima u grupi B očev kalem preživljava značajno duže nego kalem majke (Tablica V), dok takvu razliku ne nalazimo u grupi D. S obzirom na način senzibilizacije majke trokratnim kalemljenjem, razlike u rezultatima između pokusnih grupa B i D su upravo suprotne opisanim razlikama između grupa A i C. Moramo zaključiti, prema tome, da ovaj obrat odnosa u grupama B i D treba pripisati efektu naknadno injiciranih očevih splenocita mladunčadi.

Razlike u vremenu preživljavanja očevog kalema, u mladunčadi grupa B i D, statistički su značajne (Tablica V). Te su razlike još izrazitije ako se razmotre i rezultati na Tablici IV, koja nam prikazuje učestalost tolerancije. Od svih pokusnih grupa, B grupa pokazuje najizraženiju tendenciju produženja života očevog kalema (50 % tolerantnih, a svega 17 % netolerantnih), dok naprotiv sve životinje iz grupe D spadaju u netolerantne. Već 13-og dana nakon kalemljenja svi su očevi kalemi u grupi D odbačeni, što se vidi na slici broj 8. Ako uporedimo sve krivulje koje prikazuju dinamiku odbacivanja roditeljskih kalema (slike br. 7 i 8), vidi se da krivulje za grupe B i D predstavljaju ekstreme, jer su sve ostale krivulje odbacivanja roditeljskih kalema smještene između njih. Tako nam tok krivulje za grupu D ilustrira znatno viši stupanj imuniteta na očev kalem, nego li tok svih ostalih krivulja, a posebno krivulje za grupu B.

Mladi su u obadvije grupe tretirani identično, ali potječu od majki koje su različito senzibilizirane (u grupi B treći je kalem stavljen pri kraju trudnoće, dok su u grupi D sva tri kalema ušivana prije stavljanja životinje na rasplod).

Za prethodno naglašeni obrat u vremenu preživljavanja očevog kalema, između ovih grupa, te grupa A i C, objašnjenje moramo tražiti u injiciranju očevih splenocita, jer je to i jedina razlika. Usporedimo li, međutim, rezultate preživljavanja očevog kalema u mladunčadi grupa B i D, mogli bi sa sigurnošću smatrati da je i u ovim grupama vrijeme stavljanja trećeg kalema na majku presudan faktor. Tako, treći kalem ušiven pri kraju trudnoće može, u ovom slučaju, preinačiti reaktivnost očevih splenocita injiciranih mladunčetu.

U objašnjenju ovog kombiniranog efekta trećeg kalema, ušivenog na majku pri kraju trudnoće i očevih splenocita injiciranih mladunčetu, čini se najprihvatljivije upotrijebiti saznanja o imunološkoj facilitaciji. Već je prije istaknuto da se nakon kalemljenja alogenim tkivom u cirkulaciji mogu naći humoralna antitijela različitih vrsta, kao napr. hemaglutinini, hemolizini, citotoksini (Hildemann, 1957.; Gorer i Boyse, 1959.a), pa čak i antitijela koja facilitiraju preživljavanje kalema (Kaliss, 1957.). Mišljenje je Kaliss-a (1966.), da ova antitijela dostignu maksimalnu koncentraciju u periodu od 2 - 4 tjedna nakon kalemljenja. Ovaj se period otprilike poklapa sa vremenskim intervalom od stavljanja prva dva kalema u grupi B, odnosno sva tri

kalema u grupi A, na majku, i okota mladunčadi ovako senzibiliziranih majki. Nadalje, mnogi autori smatraju, da nakon unosa alogenih stanica, većina unijetih stanica podlegne, već u krvi, djelovanju cirkulirajućih antitijela (Amos i Day, 1957.; Loutit i Micklem, 1962.).

Ako na temelju iznesenog analiziramo naše rezultate u pokusnim grupama B i D, onda bi mogli ponovno zaključiti da će treći kalem ušiven pri kraju trudnoće (grupa B) vezati na sebe dobar dio humoralnih antitijela, pa će ih manje i ostati za prijenos u čedo u zadnjoj fazi trudnoće. Weisin (1962.) smatra, međutim, da pasivno prenesena facilitacijska antitijela mogu djelovati čak ako su prisutna i u malim količinama, a svoju aktivnost u novom domaćinu zadržavaju tjednima. Kako je mladunčad u grupi B injicirana imunim očevim splenocitima, neposredno po rođenju, može se pretpostaviti da je nivo citotoksičkih i drugih antitijela u mladunčadi bio nizak, dok su se, međutim, facilitacijska antitijela, makar prenesena i u malim količinama, mogla vezati na očeve splenocite i dovesti do njihove facilitacije. Naprotiv, citotoksička antitijela ne bi mogla, zbog malih prenesenih količina, bitnije oštetiti splenocite. Vezivanje facilitacijskih antitijela moglo bi osigurati preživljavanje splenocita pa, u ovisnosti o histokompatibilnim odnosima između njih i čeda, dovesti ili do tolerancije ili do bolesti kržljanja. I doista, u grupi B našli smo najveću incidenciju tolerancije (50 %), ali i relativno visok postotak (28 %) mladunčadi oboljele od bolesti kržljanja.

Suprotan nalaz u grupi D može se također objasniti na osnovi predloženog mehanizma,. Naime, trokratnim kalemljenjem majke prije trudnoće omogućeno je humoralnim antitijelima, različitih vrsta, da nesmetano prolaze placentarnu barijeru, pa njihov nivo u mladunčetu može biti relativno visok. Visok nivo humoralnih antitijela, koja su stvorena prethodnim kalemljenjem majke sa očevom kožom, može zbog prisutnosti nesmanjene količine citotoksičnih antitijela izazvati ugibanje očevih splenocita. Slično su mišljenje izrazili, na osnovu nešto drugačijih pokusa, Siskind i Thomas (1959.).

Međutim, za objašnjenje rezultata govore o skraćenom vremenu preživljavanja očevog kalema u grupi D, navodimo mišljenje Howard i Michie-a (1962.). Oni smatraju da bi mali broj, eventualno preživjelih splenocita, mogao prije djelovati u smislu izazivanja imuniteta na očev kalem, nego u smislu izazivanja tolerancije ili bolesti kržljanja.

Iz rezultata koji prikazuju median vremena preživljavanja roditeljskih kalema presađenih na mladunčad (Tablica V), vidi se da se statistički značajno produženje života roditeljskog kalema postiže u dvije pokusne grupe (B i C), i to samo na očev kalem. Naprotiv MVP za kalem majke ne pokazuje takva odstupanja kakva su primijećena u nekim grupama za očev kalem. Ipak, vrijedno je spomenuti, da jedino u grupi Kontrola II nije nađena ni jedna životinja, koja bi bila makar i djelomično tolerantna prema majčinom kalemu (Tablica III). Tolerantne životinje, iako u niskom postotku, pojavljuju se samo u B i D grupi. Teško je ocjeniti pravo

značenje ovog nalaza, jer broj netolerantnih i djelomično tolerantnih ne odstupa bitno od vrijednosti nađenih u Kontroli I.

III 3.C.b. Incidencija bolesti kržljanja. U svim životinjskim grupama, koje su bile injicirane očevim splenocitima, neke su životinje uginule od bolesti kržljanja. Broj uginulih bio je najveći u grupi Kontrola II (55 %), u kojoj su injicirani imuni očevi splenociti u mladunčad normalnih, tj. prethodno netretiranih majki. U pokusnim grupama B i D, u kojima su majke bile prethodno trokratno kalemljene očevim kalemom, broj uginulih je dosta niži (28 %, odnosno 15 %). Ovaj se nalaz također mora pripisati specifičnom tretmanu majki u ovim grupama. Kao što smo u prethodnim razmatranjima istaknuli, humoralna antitijela stvorena u majci, na očevo tkivo, mogla bi nakon prelaska kroz placentu, vezati se za očeve splenocite i tako umanjiti njihovu aktivnost prema mladunčetu. Takvu mogućnost potvrđuju i nalazi Siskind-a i Thomas-a (1959.a), koji su uspjeli zaštititi mladunčad od fatalne bolesti kržljanja, ako su im injicirali imuni serum, ili ako su majku prije trudnoće imunizirali na antigene davanja splenocita.

Razlike u postotku uginulih štakora od bolesti kržljanja, između pokusnih grupa B i D, vjerojatno bi se i u ovom slučaju trebale pripisati razlikama u vremenu stavljanja trećeg očevog kalema na majku. Mehanizam kojim se pokušavaju objasniti navedene razlike detaljno je diskutiran u prethod-

hodnom djelu teksta.

Obzirom da smo naše pokuse izvodili na populaciji genetski nesrodnih štakora, interesiralo nas je da li možemo predviđjeti koje mladunče, unutar jednog legla, ima najviše izgleda da oboli od bolesti kržljanja, ako mu injiciramo očeve splenocite. U pregledu literature smo istakli, da se bolest kržljanja javlja to pravilnije, što su razlike u histokompatibilnosti između primocca i davoca veće. Pokušali smo se orijentirati o razlikama u histokompatibilnosti, koristeći se hemaglutininima (Vlahović i Vlahović, 1966.), koji u našim uvjetima nastaju u serumu muškog roditeljskog partnera nakon odbacivanja kožnog kalema ženskog roditeljskog partnera. Eritrocite mladunčadi testirali smo prema tome sa serumom oca, jer se u njemu nalaze hemaglutinini^{kn} stvoreni na kalem majke. Naime, pretpostavljali smo da će eventualno jače aglutinacijske reakcije, seruma oca protiv eritrocita neke od mladunčadi u leglu, ukazivati i na jače razlike u histokompatibilnosti. U oba legla iz kojeg potječu kržljavi (Tablica VII) , bilo je mladunčadi protiv čijih je eritrocita serum oca doista pokazivao i jače hemaglutinacijske reakcije. Međutim, očevi splenociti nisu u njima doveli do razvoja bolesti kržljanja. Naši rezultati ukazuju da postoje znatne razlike između distribucije hemaglutinogena i transplantacijskih antigena, pa se na ovaj način ne može predviđati razlike u histokompatibilnosti. U serumu mladunčadi oboljele od bolesti kržljanja nismo mogli otkriti hemaglutinine protiv eritrocita oca, što su primijetili i drugi (Eichwald, 1963.).

III 3. C.c. Hemaglutinacijska reaktivnost krvnog seruma mladunčadi.

Da bi upotpunili sliku imunološke re-

aktivnosti mladunčadi u perinatalnoj dobi, prikazali smo i rezultate koji se odnose na hemaglutinacijska svojstva krvnog seruma mladunčadi. Poznato je da se nakon transplantacije kožnog alokalema u serumu primaoca stvaraju hemaglutinini protiv eritrocita davaoca (Vlahović i sur., 1965.). Trekratnim kalemljenjem majki, kožom mužjaka u našim pokusima, trebalo je očekivati i u majčinom serumu visoki titar hemaglutinina. To se očekivanje i potvrdilo. Hemaglutinini su se također pojavili i u serumu mladunčadi, nakon odbacivanja roditeljskih kalema.

U razmatranju hemaglutinacijske reaktivnosti mladunčadi prvo ćemo se osvrnuti na rezultate u pokusnim grupama A i C. U ovim grupama mladi pokazuju različitu hemaglutinacijsku aktivnost prema eritrocitima roditelja, nakon odbacivanja njihovih kalema. Relativno nizak titar hemaglutinina našli smo u grupi C, posebno na eritrocite oca. U grupi A titar prema oba roditelja bio je sličan i mnogo viši nego u grupi C. Ove razlike su vjerojatno opet posljedica različitog postupka sa roditeljima. Naime, dok je u grupi C majka trokratno kalemljena kožom mužjaka prije stavljanja na rasplod, treći je kalem u grupi A ušiven na majku tek 3 - 4 dana prije okota mladunčadi. S obzirom na pokazane razlike, između ovih grupa, vjerojatno je vrijeme stavljanja trećeg očevog kalema na majku presudno i za hemaglutinacijsku reak-

tivnost mladunčeta.

Čini nam se da objašnjenje za ovakav nalaz treba tražiti u promjenama koje nastaju u majci nakon kalemljenja sa očevim kalemom. Već spomenuti visok titar hemaglutinina u majci, stvoren kalemljenjem kože, mogao bi u grupi C suprimirati hemaglutinacijski odgovor mladunčeta na isti stimal. Slični su odnosi poznati iz eksperimentalnih i kliničkih radova o prijenosu humoralnih antitijela sa majke na čedo. Prenesena humoralna antitijela općenito imaju veliku važnost za čedo, jer mu osiguravaju pasivnu zaštitu, dok ne sazrije njegova imunološka reaktivnost. Međutim, antitijela prenesena sa majke mogu i utjecati na razvoj aktivne imunološke reaktivnosti mladunčeta. Tako je poznato, da ova antitijela mogu znatno oslabiti imunološki odgovor čeda, ili se on uopće ne javlja, na antigen kojim je majka bila imunizirana (Butler i sur., 1954.; Reilly i sur., 1961.). Čak i ponovljeno injiciranje antigena nakon godinu dana, kada su majčina antitijela iz organizma mladunčeta već odstranjena, daje vrlo slab odgovor. Lepow i sur. (1961.) smatraju da se ovaj efekt pravilno javlja samo onda, ako je titar majčinih antitijela visok.

Na osnovu iznesenog moglo bi se pretpostaviti da će treći očev kalem, stavljen na majku pri kraju trudnoće (grupa A), "pokupiti" nešto od hemaglutinacijske aktivnosti majke, pa će tako u fazi najživljeg prijenosa antitijela u mladunče prijeći manje hemaglutinina. Manja količina hemaglutinina mogla bi izazvati i manju supresiju reaktivnosti mladun-

četa. Naprotiv, prijenos veće količine hemaglutinina sa majke u čedo, u pokusnoj grupi C, doveo bi do supresije hemaglutinacijske reaktivnosti mladunčeta, nakon odbacivanja očevog kalema. S obzirom da je u mladunčeta snižen titar i protiv eritrocita majke, čini se da preneseni hemaglutinini općenito smanjuju hemaglutinacijsku reaktivnost mladunčeta.

Važnost vremena ušivanja trećeg očevog kalema na majku očituje se i u grupama B i D, u kojim je mladunčad injicirana očevim splenocitima. Naime, i u ovim se grupama pokazuje da je razlika u vremena stavljanja trećeg očevog kalema na majku dovela do analognih razlika u visini titra hemaglutinina, kako je to opaženo i u grupama A i C.

Tačan mehanizam kojim majčina antitijela suprimiraju imunološki odgovor mladunčeta nije još poznat, ali se pretpostavlja da bi se moglo raditi o interakciji majčinih antitijela i specifičnog antigena na koji su stvorena. Uhr i Baumann (1961.) misle da se radi o blokiranju efektornih mjesta na antigenu sa molekulama antitijela, dok Wilson i Miles (1955.) smatraju, da se antigen brže eliminira iz cirkulacije i organizma mladunčeta.

IV ZAKLJUČNI PREGLED

S obzirom na rezultate dobivene vlastitim istraživanjima, mogli bi istaći neke zaključke. Prikazat ćemo ih onim redoslijedom kojim su opisani i pokusi u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

ANALIZA HOMOLOGNE BOLESTI

U pogledu učestalosti bolesti kržljanja i njenih kliničkih manifestacija postoje neke analogije, ali i neke bitne razlike, između životinja koje pripadaju čistim sojevima i životinja koje potječu iz genetski nesrodne populacije.

1. U genetski nesrodnoj populaciji štakora opazili smo iste kliničke znake bolesti kržljanja, kakvi su opisani i među životinjama različitih, genetski čistih sojeva. Zaostajanje tjelesne težine oboljelih životinja, predstavlja i u našim uvjetima važan znak za otkrivanje bolesti i njeno praćenje.

2. S obzirom da nam nisu poznate genetske razlike među našim štakorima, ne može se ni predviđati kakav će biti konačni ishod injekcije nekog broja splenocita. U nekim kombinacijama životinja ni visok broj injiciranih stanica nije doveo do bolesti kržljanja, dok se u drugim kombinacijama bolest razvija i na mali broj unesenih stanica. Na osnovu ovog može se zaključivati o odnosima u histokompatibilnosti između primaoca i davaoca. U populaciji genetski nesrodnih štakora, za raz-

liku od kombinacija čistih sojeva, nema pravilnog povećanja učestalosti bolesti s povećanjem broja injiciranih stanica.

3. Maksimalnu učestalost bolesti (oko 100% oboljelih), u uvjetima naših pokusa, može se očekivati tek nakon injiciranja vrlo visokog broja splenocita (više od 100 milijuna).

4. Usprkos genetski različitim odnosima postoji, prema našim pokusima, statistički značajna korelacija između pojave prvih kliničkih znakova bolesti i njenog trajanja ($r = 0,48$; $p < 0,02$). Što se kliničke manifestacije bolesti pojave kasnije, to je trajanje bolesti duže.

PRIJENOS TRANSPLANTACIJSKOG IMUNITETA SA MAJKE NA ČEDO

A. Preživljavanje roditeljskih kalema

1. U mladunčadi stare oko mjesec dana, koja potječe od nesenzibiliziranih majki, nema razlike u vremenu odbacivanja očevog i majčinog kalema.

2. Ako se majka prije parenja trokratno kalemi kožom budućeg oca mladunčadi, onda mladunčad značajno duže nosi očev kalem. Ušivanje trećeg očevog kalema na majku, pri kraju trudnoće, ukida spomenuti efekt produženog nošenja očevog kalema presađenog na mladunčad. Prema tome, vrijeme

stavljanja trećeg oćevog kalema predstavlja "kritični" moment, koji bitno utjeće na sudbinu oćevog kalema presađenog mladunćetu. Ova pojava tumači se specifičnim facilitacijskim efektom antitijela.

3. Ukoliko se injiciraju u mladunćad oćevi splenociti, poništava se facilitacijski efekt stavljanja trećeg kalema majci prije trudnoće. Ako se treći kalem kože ušije majci pod kraj trudnoće, tada nakon injiciranja mladunćadi oćevim splenocitima dolazi do značajnog produženja nošenja oćevog kalema.

B. Incidencija bolesti kržljanja

1. Prethodnim trokratnim kalemljenjem majke smanjuje se učestalost bolesti kržljanja, koja nastaje zbog injiciranja oćevih splenocita mladunćadi. Postotak kržljave mladunćadi, nakon injiciranja imunih splenocita oca, najmanji je ako se treći kalem ušije majci prije trudnoće. Ovaj je zaključak u skladu sa zaključkom pod A.3., što upućuje na suštinsku istovjetnost procesa indukcije specifične imunološke tolerancije i bolesti kržljanja.

2. Razlike u pogledu histokompatibilnosti, između oca i njegove mladunćadi, ne mogu se predviđati na osnovu titra hemaglutinina stvorenog u serumu oca na kožni kalem majke.

C. Hemaglutinacijska reaktivnost krvnog seruma
mladunčadi

1. Vrijeme ušivanja trećeg oćevog kalema na majku općenito je presudno za hemaglutinacijsku reaktivnost mladunčeta. Ako se majka prije parenja trokratno kalemi oćevom kožom, onda je titar hemaglutinina u serumu mladunčadi niži, nego ako se treći kalem stavi na majku pri kraju trudnoće. Analogne razlike nalazimo i u grupama u kojim je mladunčad injicirana oćevim splenocitima.

V L I T E R A T U R A

- AMOS D.B. i E.D. DAY, 1957, Ann. New York Acad.Sci., 64: 851
- ANDERSON J.M., 1965, Nature, 206: 786
- ARCHER O.K., W.D. KELLY, B.W. PAPERMASTER i R.A. GOOD, 1963a,
Federation Proc., 22: 599
- ARCHER O.K., D.E.R. SUTHERLAND i R.A. GOOD, 1963b, Nature, 200: 337
- BALL W.D. i R. AUERBACH, 1960, Exptl.Cell.Res., 20: 245
- BARNES A.D. i P.L. KROHN, 1957, Proc.Roy.Soc., B, 146: 505
- BATCHELOR J.R., 1965, Brit.Med.Bull., 21: 100
- vanBEKKUM W.D., O. VOS, i W.W.H. WEYZEN, 1959, J.Nation.Canc.Inst.,
23: 75
- BILLINGHAM R.E., 1957, Recherches sur la réaction contre le rece-
veur de cellules de tissu lymphoid homologue injectées,
u La biologie des homogreffes(Colloque Intern. du C.N.
R.S.), Paris 8-10 VII, str. 183-199
- BILLINGHAM R.E., 1958, Ann. New York Acad.Sci., 73: 782
- BILLINGHAM R.E., 1961a, Free skin grafting in mammals, u Transplan-
tation of tissues and cells, izd. Billingham i Silvers,
The Wistar Inst. Press, str 1-26
- BILLINGHAM R.E., 1961b, The induction of tolerance of homologous
tissue grafts, ibid. str. 87-106
- BILLINGHAM R.E. i L. BRENT, 1959, Phil.Trans.Roy.Soc., London, B,
242: 439
- BILLINGHAM R.E., L. BRENT, J.B. BROWN i P.B. MEDAWAR, 1959,
Transplant.Bull., 6: 410
- BILLINGHAM R.E., L. BRENT i P.B. MEDAWAR, 1953, Nature, 172: 603

- BILLINGHAM R.E., L. BRENT i P.B. MEDAWAR, 1954a, Proc.Roy.Soc.,B, 143: 58
- BILLINGHAM R.E., L.BRENT, P.B. MEDAWAR i E.M.SPARRROW, 1954b, Proc. Roy.Soc., B, 143: 43
- BILLINGHAM R.E., J.B. BROWN, V. DEFENDI, W.K. SILVERS i D. STEINMULLER, 1960, Ann. New York Acad.Sci., 87: 457
- BILLINGHAM R.E., V. DEFENDI, W.K. SILVERS i D.STEINMULLER, 1962, J.Nation.Canc.Inst., 28: 365
- BILLINGHAM R.E., J. PALM i W.K. SILVERS, 1965, Science, 147: 514
- BILLINGHAM R.E. i A.S. PARKES, 1955., Proc.Roy.Soc.;B., 143:550
- BILLINGHAM R.E. i W.K. SILVERS, 1959, Transpl.Bull., 6: 399
- BILLINGHAM R.E. i W.K. SILVERS, 1960, J.Immunol., 85: 14
- BILLINGHAM R.E. i W.K. SILVERS, 1962, Quantitative studies on the induction of tolerance of skin homografts by inoculation of newborne mice and rats with homologous cells of different types, u Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 21-30
- BILLINGTON W.D., 1965, J.Reprod.Fertil., 10: 343
- BIOZZI J.G., J.G. HOWARD, C. STIEFEL i D. MOUTON, 1964, J.Reticuloendothel.Soc., 1: 18
- BISHOP D.W. i D. GUMP, 1961, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 106: 24
- BOYD W.C., 1956, Fundamentals of immunology, Intersc.publ.inc., New York, str. 379-452
- BRAMBELL F.W.R., 1961, Proc.Roy.Soc.Med., 54: 922
- BRENT L. i G. GOWLAND, 1961, Nature, 192: 1265
- BRENT L. i G. GOWLAND, 1962, Quantitative analysis of tolerance induction in mice, u Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 237-243

- BREYERE E.M. i M.K. BARETT, 1960, Ann. New York Acad.Sci.,
87: 112
- BRIDGES R.A., R.M. CONDIE, S.J. ZAAK i R.A. GOOD, 1959, J.Lab.
Clin.Med., 53: 313
- BUM J.H., D.J. FINNEY i L.G. GOODWIN, 1952, "Biological Stan-
dardization", Oxford Univ.Press, sec.ed.
- BURNETT F.M., 1960, Panel discussion on the clonal selection
theory of antibody formation, u Ciba found. symp. on
cellular aspects of immunity, izd. Wolstenholme i O'
Conor, Churchill, London, str. 157-158
- BURNETT F.M. i F. FENNER, 1949, The production of antibodies
(Monograph of the Walter and Eliza Hall institute, Mel-
bourn), MacMillan&comp., Melbourn
- BUTLER N.R., M. BARR i A. T. GLENNY, 1954, Brit.Med.J., 1: 476
- COCK A.G. i M. SIMONSEN, 1958, Immunology, 2: 103
- CONVERSE J.M. i F.T. RAPAPORT, 1956, Ann.Surg., 143: 306
- DAVIES A.J.S. i S.M.A. DOAK, 1960, Nature, 187: 610
- DAWKINS M.J.R., 1963, Quart.J.Exp.Physiol., 48: 265
- DINEEN J.K., 1961, Nature, 189: 680
- DOUGLAS G.W., L. THOMAS, M. CAAR, N.M. CULLEN i R. MORRIS
1959, Am.J.Obst.Gynecol., 78: 960
- EBERHARDT P., N. AVDALOVIĆ i D. RUKAVINA, 1965, Zbornik radova
IV Kongresa Jugoslav. fiziologa, Ljubljana, str. 18
- EGDAHL R.H., 1957, citirano po: GOOD R.A. i W.B. PAPERMASTER,
1964, Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity, u
Advances in Immunology, vol. 4, izd. Dixon i Humphrey,
Academic Press, New York, str. 35

- EGDAHL R.H. , F.R.ROLLER, R.L. SWANSON i R.L. VARCO, 1958, Ann. New York Acad.Sci., 73: 842
- EICHWALD E.J., 1963, Tissue Transplantation, u Advances in Biological and Medical Physics, izd. Lawrence i Gofman, Academic Press, str. 94-190
- EICHWALD E.J., B. WETZEL i E. LUSTGRAAF, 1966, Transplantation, 4: 530
- FINK C.W., W.E. MILLER jr., B. DORWARD i J. LoSPALLUTO, 1962, J.Clin.Invest., 41: 1422
- FISHER R.A., 1958, Statistical methods for research workers, Hafner Publ.Comp., New York
- FOWLER R.jr., W.K. SHUBERT i C.D. WEST, 1960, Ann. New York Acad. Sci., 87: 403
- FOX M., 1966, Transplantation, 4: 11
- GALTON M., 1960, Lancet, 1: 494
- GIBSON T. i P.B. MEDAWAR, 1943, J.Anat., London, 77: 299
- GOOD R.A. i PAPERMASTER B.W., 1964, Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity, u Advances in Immunology, vol. 4, izd. Dixon i Humphrey, Academic Press, New York, str. 1-115
- GORER P.A., 1942, J.Pathol.Bacteriol., 54: 51
- GORER P.A., 1960, Ann. New York Acad.Sci., 87: 604
- GORER P.A., 1962, citirano po: Voisin G.A., 1962, u Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 444

- GORER P.A. i E.A. BOYSE, 1959a, Some reactions observed with transplanted reticulo-endothelial cells in mice, u Biological problems of grafting, vol. 1, izd. Albert i Medawar, Blackwell Scient. Publ., Oxford, str 193-204
- GORER P.A. i E.A. BOYSE, 1959b, Immunol., 2: 182
- GORER P.A., J.F. LOUTIT i R.S. MICKLEM, 1961, Nature, 189: 1024
- GOWANS J.L., 1962, Ann. New York Acad. Sci., 99: 432
- GOWLAND G., 1965, Brit. Med. Bull., 21: 123
- GREGOIRE A., 1957, C.R. Acad. Sci. (Paris), 244: 237
- HALASZ N.A. i M.J. ORLOFF, 1963, J. Exp. Med., 118: 353
- HANSEN R.G. i P.H. PHILLIPS, 1949, J. Biol. Chem., 179: 523
- HAŠEK M., 1953, Českoslov. Biol., 2: 25
- HAŠEK M., V. HAŠKOVA, A. LENGEROVA i M. VOJTIŠKOVA, 1962, Mother-foetus immunological relationship as an exceptional homograft model, u Ciba found. symp. on transplantation, izd. Wolstenholme i Cameron, Churchill, London, str. 118-128
- HAŠEK M., T. HRABA i J. HOST, 1958, Ann. New York Acad. Sci., 73: 570
- HAŠEK M., A. LENGEROVA i T. HRABA, 1961, Transplantation immunity and tolerance, u Advances in Immunology, vol. 1, izd. Taliaferro i Humphrey, Academic Press, New York, str. 1-67
- HEIM L.R., R.A. GOOD i C. MARTINEZ, 1966, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122: 107
- HILDEMANN W.H., 1957, Ann. New York Acad. Sci., 64: 775
- HILDEMANN W.H. i R. HAAS, 1962, Developmental changes in leucocytes in relation to immunological maturity, u Mechanisms of Immunological Tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 35-49

- HOWARD J.G. i D. MICHIE, 1962, *Transplant.Bull.*, 29: 1
- HOWARD J.G., D. MICHIE i M.F.A. WOODRUFF, 1962, *Transplantation tolerance and immunity in relation to age*, u Ciba found. symp. on transplantation, izd. Wolstenholme i Cameron, Churchill, London, str. 138-153
- IVANYI P. i D. IVANYI, 1961, *Folia Biol.*, 7: 369
- JACQUOT R., 1959, *J.de Physiol.*, 51: 655
- JANKOVIĆ B.D., B.H. WAKSMAN i B.G. ARNASON, 1962, *J.Exptl.Med.*, 116: 159
- JUTILA J.W. i R.S. WEISER, 1962, *J.Immunol.*, 88: 621
- KALISS N., u *La biologie des homogreffes*, vol. 1, izd. C.N.R.S., Paris, str. 225
- KALISS N., 1962, *The induction of the homograft reaction in the presence of immunological enhancement to tumor homografts*, u *Mechanisms of immunological tolerance*, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 413-429
- KALISS N., 1965, *Federation Proc.*, 24: 1025
- KALISS N., 1966, *Ann. New York Acad.Sci.*, 129: 155
- LALEZARI P.M., M. NUSSBAUM, S. GELMAN i T.H. SPAET, 1960, *Blood*, 15: 236
- LANMAN J.T., J. DIRNSTEIN i S. FIKRIG, 1962, *Ann.New York Acad. Sci.*, 99: 706

- LAWRENCE H.S., 1957, Ann. New York Acad.Sci., 64: 826
- LAWRENCE H.S., 1960, Physiol.Rev., 11: 207
- LEDERBERG J., 1960, Panel discussion on the clonal selection theory, u Ciba found. symp. on cellular aspects of immunity, izd. Wolstenholme i O'Conor, Churchill, London, str. 159-161
- LEJEUNE G., 1962, Induced tolerance to skin homografts in man, u Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. ^{173 - 174} 413-429
- LEPOW M.L., R.J. WARREN, N. GRAY, V.G. INGRAM i F.C. ROBBINS, 1961, New Engl.J.Med., 264: 1071
- LOUTIT J.F., 1959, u Lectures on the Scientific Basis of Medicine, Athlone Press, London, 5: 439
- LOUTIT J.F. i H.S. MICKLEM, 1961, Brit.J.Exp.Pathol., 42: 577
- MATHÉ G. i J.L. AMIEL, 1962, Defenses de l'organisme contre le greffes incompatibles, u "La greffe", Masson&Cie, Paris, str. 33-54
- MCCARTHY E.F. i E.I. McDOUGALL, 1953, Biochem.J., 55: 177
- McKHANN C.F., 1962, Diskusija, u Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 66-67
- MEDAWAR P.B., 1945, J.Anat., London, 79: 157
- MEDAWAR P.B., 1960, Theories of immunological tolerance, u Ciba found.symp. on cellular aspects of immunity, izd. Wolstenholme i O'Conor, Churchill, London, str. 134
- MEDAWAR P.B., 1962, Introduction, u Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 17-20

- MEDAWAR P.B. i P.S. RUSSELL, 1958, *Immunology*, 1: 1
- MEDAWAR P.B. i E.M. SPARROW, 1956, *J.Endocrinol.*, 14: 240
- MEDAWAR P.B. i M.F.A. WOODRUFF, 1958, *Immunology*, 1: 27
- MICHIE D. i M.F.A. WOODRUFF, 1962, *Proc.Roy.Soc.*, B, 156: 280
- MILKOVIĆ K. i S. MILKOVIĆ, 1959, *Endocrinology*, 37: 301
- MILLER J.F.A.P., 1961, *Lancet* II: 748
- MITCHISON N.A., 1959, Blood transfusion in fowl: an example of immunological tolerance requiring the persistence of antigen, u *Biological problems of grafting*, izd. Albert i Medawar, Blackwell, Oxford, str. 239-259
- MOLLISSON P.L., *Blood transfusion in clinical medicine*, 1964, Blackwell, Oxford, str. 596-670
- MOLLER G., 1963, *J.Nat.Canc.Inst.*, 30: 1153
- NAKIĆ B., 1962, *Ann. New York Acad.Sci.*, 99: 689
- NAKIĆ B., 1968, usmeno saopćenje
- NAKIĆ B., A. KAŠTELAN i N. AVDALOVIĆ, 1962, Induction of specific tolerance in adult rats by the method of parabiosis, u *Ciba found. symp. on transplantation*, izd. Wolstenholme i Cameron, Churchill, London, str. 328-343
- NAKIĆ B. i V. SILOBRČIĆ, 1962, Specificity of tolerance following short-term parabiosis between immunologically mature albino rats, u *Mechanisms of immunological tolerance*, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 337-343

- OSBORN J.J., J. DANCIS i J.F. JULIA, 1952a, Pediatrics, 10: 328
OSBORN J.J., J. DANCIS i J.F. JULIA, 1952b, Pediatrics, 9: 736
OWEN R.D., 1945, Science, 102: 400
- PALM J., 1961, Immunogenetic aspects of tissue transplantation,
u Transplantation of tissues and cells, izd. Billingham i
Silvers, Wistar Inst.Press, str. 113-130
- PAPERMASTER B.W. i R.A. GOOD, 1962, Nature, 196: 838
PEER L.A., 1958, Ann. New York Acad.Sci., 73: 584
PEER L.A., W. BERNHARD, i J.C. WALKER, 1958, Amer.J.Surg., 95: 239
PETZ B., 1964, Osnovne statističke metode, Zagreb
POPP D.M., 1967, Transplantation, 5: 300
PORTER K.A., 1960, Nature, 185: 789
PORTER K.A., 1962, Fate of labelled lymphoid cells after injection into newborne rats, u Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 51-54
- REILLY C.M., J. STOKES jr., E.B. BUYNAC, H.GOLDNER i M.R.HILLEMANN,
1961, New England J.Med., 265: 165
ROGERS B.O., A.P. RAISBECK, D.L. BALLANTYNE jr. i J.M. CONVERSE,
1960, Trans.Intern.Soc.Plant.Surg.; 421
RUBINSTEIN P.A., A. PUZA, Š. VLAHOVIĆ i J.W. FERREBEE, 1964,
Folia Biol., 10: 36
RUKAVINA D. i P. EBERHARDT, 1966, Acta fac.med. Fluminensis,
1: 117
RUSSELL P.S., 1962a, Means of modifying runt disease in mice, u
Mechanisms of immunological tolerance, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 55-64

- RUSSELL P.S., 1962b, Modification of runt disease in mice by various means, u Ciba found. symp. on transplantation, izd. Wolstenholme i Cameron, Churchill, London, str. 350-383
- RUSSELL P.S. i A.P. MONACO, 1965, The biology of tissue transplantation, izd. Little, Brown i Comp., Boston
- SCHINCKEL P.G. i K.A. FERGUSON, 1953, Austral.J.Biol.Sci., 6: 533
- SCHRECK R., 1958, Arch.Path., 66: 569
- SCOTHORNE R.J., 1958, Ann. New York Acad.Sci., 73:673
- SIMONSEN M., 1960a, Ann. New York Acad.Sci., 87: 382
- SIMONSEN M., 1960b, Identification of immunologically competent cells, u Ciba found. symp. on cellular aspects of immunity, izd. Wolstenholme i Cameron, Churchill, London, str. 122-131
- SIMONSEN M. i E. JENSEN, 1959, The graft versus host assay in transplantation chimaeras, u Biological problems of grafting, izd. Albert i Medawar, Blackwell, Oxford, str. 214-236
- SINKOVICS J.G. i C.D. HOWE, 1964, Texas Rep.on Biol.Med., 22: 591
- SISKIND G.W., L. LEONARD i L. THOMAS, 1960, Ann. New York Acad. Sci., 87: 452
- SISKIND G.W. i L. THOMAS, 1959a, Studies on the runting syndrome in newborn mice, u Biological problems of grafting, izd. Albert i Medawar, Blackwell, Oxford, str. 176-185
- SISKIND G.W. i L. THOMAS, 1959b, J.Exp.Med., 110: 511
- SMITH R.T., 1960, Response to active immunization of human infants during the neonatal period, u Ciba found. symp. on cellular aspects of immunity, izd. Wolstenholme i O'Conor, Churchill, London, str. 348-368

- SMITH R.T., 1961, Immunological tolerance of nonliving antigens, u *Advances in immunology*, vol. 1, izd. Taliaferro i Humphrey, Academic Press, N.Y. i London, str. 67-129
- SNELL G.D., 1964, *Transplantation*, 2: 655
- STASTNY P., 1963, *Federation Proc.*, 22: 273
- STASTNY P., 1965, *J.Immunol.*, 95: 929
- STETSON C.A. i E. JENSEN, 1960, *Ann. New York Acad.Sci.*, 87: 249
- STONE H. i sur., 1965, *Science*, 148: 1335
- TOKUDA S. i P.F. McENTEE, 1967, *Transplantation*, 5: 606
- TURK J.L., 1967, *Transplantation*, 5: 952
- UHR J.W. i J.B. BAUMANN, 1961, *J.Exp.Med.*, 113: 935
- VAHLQUIST B., 1958, *Advan.Pediat.*, 10: 305
- VLAHOVIĆ V., *Suvremeni aspekti imunoglobulina*, predano za štampu
- VLAHOVIĆ V., O.BELEZNAY i M. JURETIĆ, 1968, *Vox Sang.*, 15: 59
- VLAHOVIĆ Š. i D. RUKAVINA, 1968, u pripremi za štampu
- VLAHOVIĆ Š. i V. VLAHOVIĆ, 1966, *Testiranje histokompatibilnosti*, Simpozijum iz imunologije i transplantacije, održan pod pokroviteljstvom Jugoslavenske Akademije znanosti i umjetnosti, Zagreb 4-5 X
- VLAHOVIĆ Š., V. VLAHOVIĆ i N. LEMPert, 1965, *Folia Biol.*, 11: 452
- VOISIN G.A., 1962, Immunological tolerance to living cells, homologous disease and immunological facilitation (enhancement phenomenon), u *Mechanisms of immunological tolerance*, izd. Hašek, Lengerova i Vojtiškova, Prag, str. 435: 455

VOS O., M.J. DeVRIES, J.C. COLLENTEUR i D.W. vanBEKKUM, 1959, J.

Natl.Canc.Inst., 23: 53

VRANIĆ-SERDAR, 1960, Statističke metode, Zagreb

WILSON G.S. i A.A. MILES, 1955, u Topley & Wilson's principle of
bacteriology and immunity, 4th ed., Arnold, London, str.1273

WOLFE H.R., A.P. MUELLER, J. NEES i C. TEMPELIS, 1957, J.Immunol.,
79: 142

WOODRUFF M.F.A., 1960, Transplantation of tissues and organs,
C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, str.118-137

WOODRUFF M.F.A. i B. LENNOX, 1959, Lancet, 2: 476