

SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

BŐR- ÉS NEMIKÓRTANI KLINIKA

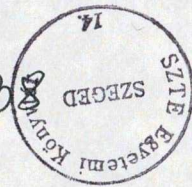
AZ EGÉR VÖRÖSVÉRTEST KÖTŐ RECEPTORT
HORDOZÓ LIMFOCITÁK FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA

KENDERESSY SZABÓ ANNA

SZEGED 1985



B 513



E 3.406



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Megtisztelő kötelességem, hogy e helyen is köszönetet mondjak Dr Simon Miklós egyetemi tanár urnak, aki munkámat mindig támogatta és a kísérletek elvégzéséhez a kedvező feltételeket biztosította.

Külön köszönöm Dr Dobozy Attila docensnek, hogy aktivan közreműködött az értekezés elkészítésénél, valamint Dr Hunyadi János adjunktus és Dr Csató Miklós tanársegédnek önzetlen segítségét.

RÖVIDÍTÉSEK

ANAE	= savanyu α -naftil-acetát eszteráz
BERF sejtek	= birka eritrocitákkal rozettát formáló sejtek
Con-A	= Concanavalin-A
EV ⁺ sejtek	= egér vörösvértesteket kötő receptort hordozó sejtek
HTLA	= humán timusz limfoid antigén
Ki	= kemotaxis index
LDCF	= limfociták által termelt kemotaktikus faktor
LIF	= leukocita gátló faktor
Mi	= migrációs index
MIF	= migráció gátló faktor
PBS	= Nair puffer
PHA	= Phytohaemagglutinin M
PPD	= tisztított tuberkulin fehérje
TdT	= terminális deoxinukleotidil transzferáz

TARTALOMJEGYZÉK

ELŐSZÓ	4.
1. BEVEZETÉS	5.
2. LABORATÓRIUMI VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK	9.
2.1. <u>Anyagok, reagensek</u>	9.
2.2. <u>Sejtszeparálás</u>	9.
2.2.1. Fehérvérsejt szeparálás	9.
2.2.2. Limfocita szeparálás	10.
2.2.3. Granulocita szeparálás	11.
2.3. <u>A limfocita szubpopulációk megoszlásának vizsgálatára szolgáló in vitro módszerek</u>	11.
2.3.1. A birka eritrocitákkal történő spontán rozetta képzés vizsgálata	11.
2.3.2. Birka vörösvértestekkel rozettát formáló limfociták dúsítása	13.
2.3.3. Tisztított T limfocita szuszpenzió előállítása	13.
2.3.4. Az egér eritrocitákkal történő spontán rozetta képzés vizsgálata	15.
2.3.5. Az egér vörösvértestekkel rozettát képző limfociták dúsítása	16.
2.3.6. Tisztított B limfocita szuszpenzió előállítása	16.
2.4. <u>A limfocita szubpopulációk funkcionális vizsgálata in vitro módszerekkel</u>	16.

2.4.1.	Limfocita transzformációs teszt . . .	16.
2.4.2.	A sejtmigráció gátlás vizsgálata . .	20.
2.5.	<u>A granulociták funkciójának mérésére</u> <u>szolgáló in vitro módszerek</u>	24.
2.5.1.	A kemotaxis mérése	24.
2.5.2.	Kemotaktikus faktorok	29.
2.6.	<u>Limfokin indukálása</u>	30.
2.6.1.	Limfokin indukálása limfocita kultu- rában egér vörösvértest hozzáadásával	30.
2.6.2.	Limfokin indukálása T sejttenyésze- tekben egér vörösvértestekkel rozettát formáló sejtek hozzáadásával	31.
3.	CÉLKITÜZÉSEK	32.
4.	BREDMÍNYEK	35.
4.1.	<u>Egér vörösvértestet kötő receptor hor- dozó limfociták hatása a T sejtek kemo- taktikus faktor és migráció gátló fak- tor termelésére</u>	35.
4.2.	<u>Az egér vörösvértestet kötő receptor és az egér vörösvértestek közötti kötés kölcsonhatása</u>	37.
4.2.1.	Az EV ⁺ sejtek hozzáadásának hatása a limfocita kulturák ³ H-timidin inkorporációjára	37.
4.2.2.	Az egér vörösvértestek hatása a lim- fociták migráció gátló termelésére .	40.

4.2.3. Egér vörösvértetek hozzáadásának hatása a limfocita kulturák kemo- taktikus faktor termelésére	40.
5. MEGBESZÉLÉS	45.
6. ÖSSZEFOGLALÁS	50.

IRODALOM

ELŐSZÓ

Az elmúlt évtizedben az immunológiai jelenségekről, az immunrendszerről és annak feladatairól alkotott elképzeléseink megváltoztak és kibővültek. Világossá vált, hogy az immunrendszer nem csupán az infekciós betegségekkel szembeni védekezésben és a szervezet integritásának megőrzése terén tölt be központi szerepet, hanem bizonyos betegségek patomechanizmusában is fontos szerepet játszik azáltal, hogy a fiziológiásan lejátszódó immuntörténések /immun-elimináció, immunkomplex képződés, keresztreakciók, stb. / súlyosbítják vagy fenntartják a kórfolyamatot.

Az egér vörösvértest-kötő receptort hordozó limfociták feltehetően patológiai jelentőséggel bírnak, mivel Stathopoulos és Elliott kimutatták, hogy krónikus limfoid leukémiában szenvedő betegeknél az egér vörösvértestekkel rozztát formáló sejtek aránya lényegesen emelkedik.

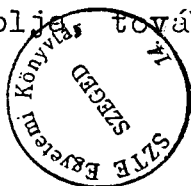
1. BEVEZETÉS

Az 1970-es évek elején elkezdett, a keringő limfociták sejtfelszíni membrántulajdonságaival foglalkozó vizsgálatok során, jelentősen bővültek és egyuttal bonyolódtak is az e sejtpopulációról alkotott ismereteink. A vizsgálatok során ismeretessé vált, hogy a humán perifériás T limfociták birka vörösvértestekkel rozettát képeznek /Jondal 1972/. Ezeket a sejteket osztályozták azon rokon tulajdonságaik alapján, hogy IgM /T μ / vagy IgG /T γ / kötésére alkalmas Fc receptorral rendelkeznek /a T μ sejtek helper aktivitásuk, míg a T γ sejtek szuppresszor funkciót fejtenek ki/. Megismerésre kerültek továbbá IGA Fc /T α / receptorokkal, HTLA /human thymus limfoid antigén/, ANAE /acid α -naphtyl acetate esterase/, hisztamin és TdT /terminal deoxynucleotidyl transferase/, receptorokkal rendelkező szubpopulációk is.

A keringő B limfociták membrántulajdonságairól megtudtuk, hogy felszínükön immunglobulint hordoznak, Fc és C3 receptorokkal rendelkeznek. Noha a felületi immunglobulin és az Fc receptor coepping-je figyelhető meg, ha a B sejteket anti IgG F(ab)₂ fragmentummal kezelik, a két membránstruktúra bizonyosan

nem azonos. A vizsgálatok kimutatták, hogy a B sejtek Fc receptorait proteolitikus enzimekkel szembeni fokozott érzékenysége különbözteti meg a T-sejtektől.

1974-ben ismertette Stathopoulos és Elliott azon megfigyelését, hogy a keringő humán limfociták kis százaléka az egér vörösvértestekkel rozettát képez. Ezen egér vörösvértest kötő receptorral rendelkező limfocitákról a későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy felszíni immunglobulint hordoznak, Fc és C3 receptorokkal rendelkeznek, azaz B limfociták. Ezt bizonyítja az a megfigyelésünk is, amely szerint anti B sejt savóval a rozetta képzés gátolható. Az egér vörösvértest kötő receptort, e receptornak egyéb felszíni B sejt markerekhez való viszonyát tisztázandó, napjainkig részletesen vizsgálták. Így ismeretessé vált, hogy a receptor erősen tripszin érzékeny és független egyéb felszíni B sejt markerektől. Ez utóbbira utalnak azok a megfigyelések, melyek szerint a B limfociták Fc, C3 és egér vörösvértest kötő receptorai a shedding folyamán disszociálnak és a felülszorból külön-külön távolíthatók el. Az egér vörösvértest kötő receptor a C3 receptorhoz vagy hasonló, vagy annak közelében helyezkedik el. Erre utalnak azok a megfigyelések, amelyek szerint a limfociták C3b-vel való előinkubálása azok egér vörösvértestekkel történő rozetta képzését is gátolja, továbbá, hogy a C3 receptor



működését gátló tripán kék az egér vörösvértestekkel való rozetta formálást is gátolja. Hogy a két receptor nem azonos, azt a már fent említett, a shedding során bekövetkező disszociáción túlmenően bizonyítja az a megfigyelés, hogy a Chronicus lymphoid leukaemiára jellemző malignus transzformáció során egymástól függetlenül változik meg, illetve marad változatlan az egér vörösvértestekkel való, illetve a komplementtel fedett zimuzan partikulumokkal történő rozetta formálás tripán kék érzékenysége. Míg az egér vörösvértestekkel való rozetta formálás festékérzékenysége a B sejtes limfoproliferatív betegségekben változatlan marad, addig a zimuzan rozetta képzés tripán kékkel való előinkubálás után lényegesen csökken. Ugyancsak e két receptor független, de mindenesetre nem identikus voltának bizonyítéka az a Gupta és Good által tett megfigyelés, hogy a primer immundeficienciában szenvedő betegek perifériás vérében egymástól függetlenül változik a C3 és az egér vörösvértesteket kötő receptor pozitív limfociták aránya.

Korábbi vizsgálataink során ismeretessé vált az is, hogy a limfociták egér vörösvértestet kötő receptorukat 37°C-on történő inkubálás során már 10 perc alatt levedlik, és a korábban rozettát képező sejteknek csupán 10 %-a alkot rozettát. Ugyanakkor

például a T sejtek birka vörösvértestekkel történő rozetta képzése 30 percig tartó 37°C-on történő inkubálás után is alig változik.

Az előzőekben felsorolt, az egér vörösvértest kötő receptor strukturájára és egyéb B sejt markerekhez való viszonyára vonatkozó ismeretekkel szemben aránytalanul kevés az az ismeretanyag, amely az egér vörösvértest receptort hordozó limfociták funkcionális viselkedésével kapcsolatos.

Ebben az értekezésben az egér vörösvértest kötő receptort hordozó limfociták funkcionális viselkedésével foglalkozó vizsgálataink eredményeit foglaljuk össze. Ismertetjük azokat a megfigyeléseinket is, amelyeket ismert limfocita funkciók /LIF, LDCF termelés, ³H-timidin inkorporáció/ egér vörösvértestek hozzáadásával és az egér vörösvértesteket kötő receptor specifikus stimulációjával való befolyásolhatóságára, megismerhetőségére tettünk.

2. LABORATÓRIUMI VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK

2.1. Anyagok, reagensek

PHA /Phytohaemagglutinin M DIFCO/

Ficoll-Uromiro oldat: 9,56 g Ficoll /PHARMACIA, Uppsala/
20,0 ml Uromiro /BRACCO, Milano/
130,4 ml desztillált víz

PPD: Liofilizált, tisztított tuberkulin fehérje

Foszfát puffer: /PBS/ pH 7.2 Nairn-féle puffer:

8,5 gr NaCl,

1,07 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

ad 1000.0 ml desztillált víz

Hemolizáló oldat: 1 rész 0,02 g%-os EDTA oldat

9 rész 0,83 g%-os NH_4Cl oldat

Polyglukin oldat: 6 %-os dextrans oldat "Medexport CCCP"

Zimosan A: Sigma Chemical Company

2.2. Sejtszeparálás

2.2.1. Fehérvérsejt szeparálás

Vizsgálatainkhoz a fehérvérsejteket vénás vérből izoláltuk. Alvadásgátlóként izotóniás nátrium citrátot alkalmaztunk.

Az eritrocitákat és a fehérvérsejteket 1 g- s szedimentációval, szobahőmérsékleten választottuk el. A 45 fokos szögben megdöntött citrátos vért tartalmazó kémcső felüluszóját 30-60 perces ülepitést követően szivtuk le. Az így nyert fehérvérsejt szuszpenziót használtuk a limfocita transzformációs valamint - hemolízis után - a leukocita migrációs teszthez.

2.2.2. Limfocita szeparálás

A fenti, fehérvérsejteket tartalmazó plazmából Boyum, valamint Perper és Mickelson által leirt módon izoláltuk a limfocitákat /4, 26/. Hegyes centrifuga csőben /10x100 mm/ 2 ml Ficoll-Uromiro oldatra 0,5-0,8 ml fehérvérsejt tartalmu plazmát rétegeztünk, 20 percig 800 g-vel centrifugáltuk. A centrifugálás után a granulociták, a szedimentáció után visszamaradt vörösvértetek és a monociták többsége az üledékbe jutott, míg a limfociták az interfázisban maradtak. Az interfázist leszivtuk és a sejteket PBS-ben mostuk. Az így nyert sejtsuszpenzió 88-97 % tripánkéssel nem festődő, élő limfocitát tartalmaz.

Az ilyen módon szeparált limfocitákat használtuk a birka vörösvértetekkel, valamint az egér vörösvértetekkel végzett spontán rozetta képzés meghatározásokhoz.

2.2.3. Granulocita szeparálás

A granulocitákat dextrános ülepitéssel szeparáltuk. 16 ml, friss, heparinnal alvadásgátolt, vénás vérhez 4 ml dextránt mértünk /Polyglucinum, Medexport, mol. súly: 60000 /. A csöveket 60 fokban megdőntve, 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. A plazmát folyamatosan leszívtuk. 800 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A vörösvértest szennyeződéstől hipotóniás hemolizissel szabadultunk meg. /A 4 ml hemolizáló folyadék 1 rész 0.02 g%-os EDTA-t és 9 rész 0.83 g%-os NH₄Cl-ot tartalmazott./ A hipotóniás hemolizis 10 percig 4°C-on történő inkubálás alatt történt. Ezután a sejtszuszpenziót kétszer mostuk Parker 199 tápfolyadékban /10 perc, 800 g /, és így a sejtszuszpenzió több, mint 90 %-ban granulocitát tartalmazott, amelyek viabilitása minden esetben meghaladta a 97 %-ot. / A viabilitást tripánkék exklúziós teszttel vizsgáltuk./

2.3. A limfocita szubpopulációk megoszlásának vizsgálatára szolgáló in vitro módszerek

2.3.1. A birka eritrocitákkal történő spontán rozetta képzés vizsgálata

A limfocitáknak a heterológ vörösvértestekkel

történő immunrozetta képzését több mint egy évtizede eredményesen alkalmazzák e sejtek antigénkötő receptorainak vizsgálatára /22, 35/. Az immunrozetta képzésben a T és B sejtek egyaránt részt vesznek /16/.

Brain és munkatársai /5/, valamint Lay és munkatársai /20/ figyelték meg elsőként, hogy a humán perifériás limfociták egy része a birka vörösvértestekkel előzetes szenzibilizáció nélkül is rozettát alkot. A birka eritrocitákkal rozettát formáló /BERF/ sejtek száma nagy mértékben függ az alkalmazott vizsgáló módszerektől, különösen befolyásolják azt az inkubáció körülményei. Ezért különböző laboratóriumok eredményei csak a metódus pontos ismeretében hasonlíthatók össze.

A birka vörösvértestekkel rozettát alkotó limfocitákról a vizsgálatok megállapították, hogy nem hordoznak membránhoz kötött immunglobulint, nincs C3 és Fc receptoruk, tehát nem B sejtek /12, 18/. Ezek, és egyéb vizsgálatok alapján a BERF rozettát alkotó limfociták T sejtek /20/.

A birka eritrocitákat hetente frissen vett, defibrinált vérből nyertük. A vörösvértest szuszpenziót minden vizsgálat során felhasználás előtt ötször mostuk.

A birka vörösvértestekkel rozettát alkotó sejtek arányának meghatározásához a 2.2.2. fejezetben leírt módon szeparált limfocita szuszpenzióból 4.5×10^5 limfocitát, /0.1 ml/ 1×10^7 mosott birka vörösvértestet /0.1 ml/, valamint 0.05 ml borju-savót mértünk Wassermann csőbe. A szuszpenziót centrifugáltuk /400 g, 4 perc, szobahőmérséklet/, majd a T limfociták százalékát 2 órán át 4°C -on történő inkubálás után határoztuk meg mikroszkóp alatt. A csöveket az inkubálás után óvatosan rotáltuk, majd azokat a sejteket számoltuk Bürker kamrába töltve rozettának, amelyek legalább három vörösvértestet megkötöttek /1. ábra/.

2.3.2. Birka vörösvértestekkel rozettát formáló limfociták dúsítása

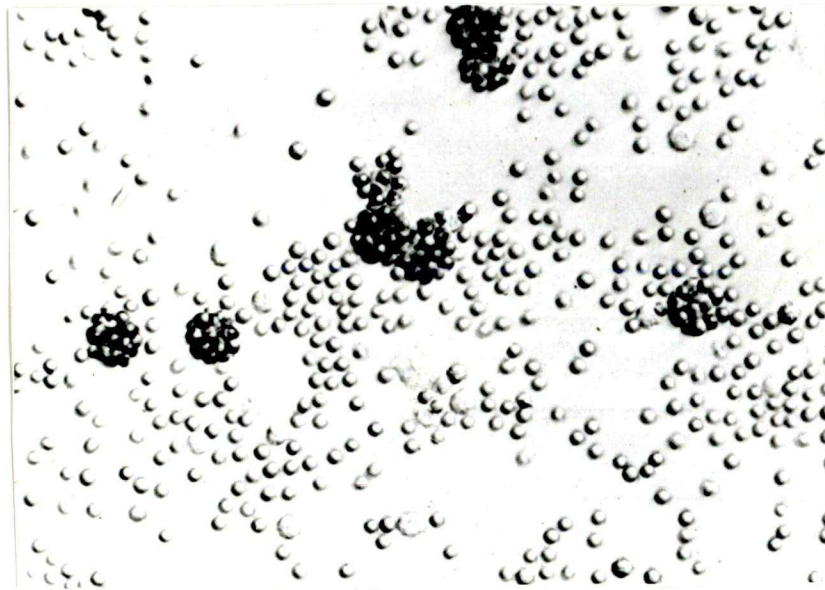
A rozettát tartalmazó limfocita-eritrocita szuszpenziót a 2.1. fejezetben ismertetett Ficoll-Uromiro oldatra rétegezzük, majd centrifugáljuk /1500 g, 20 perc, szobahőmérséklet/. A centrifugálás után a limfociták az interfázisba, a vörösvértetek és a rozetták pedig az üledékbe kerültek.

2.3.3. Tisztított T-limfocita szuszpenzió előállítása

A rozettákat és az eritrocitákat /amelyeket a

1. ábra

Birka vörösvértestekkel rozettát formáló
limfociták



A felvétel a leirt módon elkészített szuszpenzió
fénymikroszkópos értékelésekor készült 400 -szoros
direkt nagyítással.

2.3.2. fejezetben leirt módon nyertünk/ tartalmazó üledékből hemolizissel eltávolítottuk a vörösvértesteket. A hemolizálást a 2.1. fejezetben ismertetett oldattal végeztük, 10 percig, 4°C-on történő inkubálással. Végül poszfát pufferben egyszer mostuk az így nyert T limfocitákat tartalmazó sejt-szuszpenziót.

2.3.4. Az egér eritrocitákkal történő spontán rozetta-képzés vizsgálata

Stathopoulos és Elliott egészséges és Chronicus lymphoid leukaemiás betegek perifériás limfocitáinak egér és birka vörösvértestekkel történő spontán rozetta képzését vizsgálták. Az egészségesek limfocitái birka vörösvértestekkel magas arányban képeztek rozettát, de a sejtek 10-15 %-a egér vörösvértestekkel alkotott rozettát. A leukaemiások limfocitái ellentétesen viselkedtek. Ennek alapján a szerzők úgy vélik, hogy az egér vörösvértestekkel rozettát formáló limfociták B sejtek /32/.

Az egér vörösvértesteket elvéreztetés útján, hetente frissen vett, defibrinált vérből nyertük. Az eritrocita szuszpenziót felhasználás előtt minden alkalommal izotóniás konyhasó oldatban ötször mostuk.

Félkémcsőbe 7.5×10^5 limfocitát /0.25 ml/ és 3×10^7 mosott egér vörösvértestet /0.25 ml/ mértünk, és ehhez 0.05 ml borjuszavót adtunk. A szuszpenziót centrifugáltuk /400 g, 4 perc, szobahőmérséklet/, majd 4°C -on két órán át inkubáltuk. Ezt követően a T rozettához hasonlóan határoztuk meg a rozetta-képző limfociták arányát /2. ábra, 10/.

2.3.5. Az egér vörösvértestekkel rozettát képző limfociták dúsítása

A 2.3.2. fejezetben leirtakhoz hasonlóan jártunk el, de a Ficoll-Uromiro oldat összetétele 9.56 g Ficoll, 60 ml Uromiro, 130,4 ml desztillált viz.

2.3.6. Tisztított B limfocita szuszpenzió előállítása

Hasonló módon történik, mint a 2.3.3. fejezetben ismertetett T limfocita szuszpenzió előállítása.

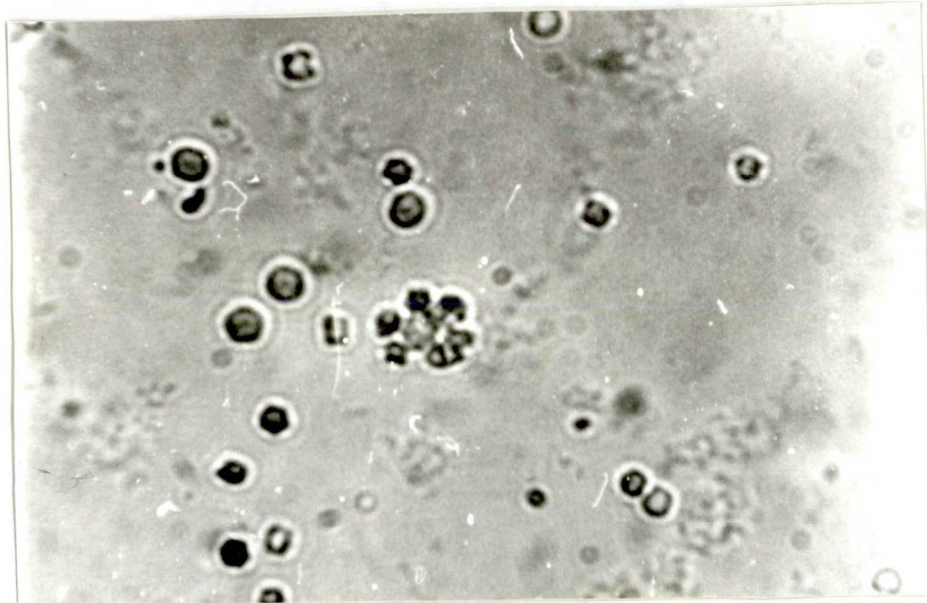
2.4. A limfocita szubpopulációk funkcionális vizsgálata in vitro módszerekkel

2.4.1. Limfocita transzformációs teszt

Régóta ismeretes, hogy a perifériás fehérvér-

2. ábra

Egér vörösvértestekkel rozettát formáló
limfocita



A felvétel a leírt módon elkészített szuszpenzió
fénymikroszkópos értékelésekor készült, 400 -szoros
direkt nagyítással

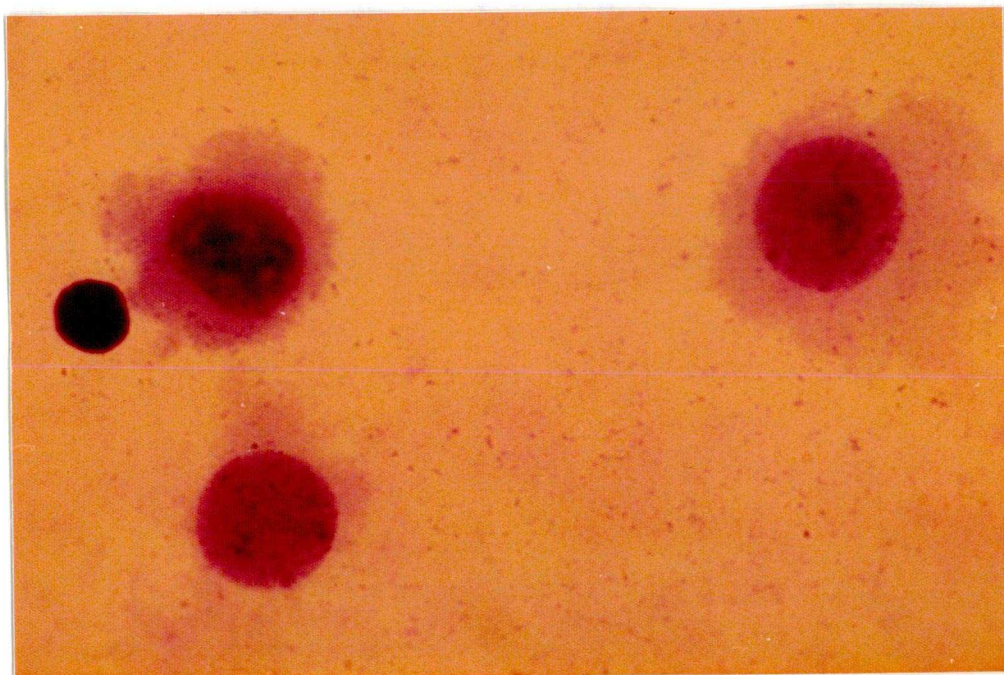
sejteket tápoldatban tenyésztve a neutrofil granulociták gyorsan degenerálódnak, az eozinofileken csak csekély morfológiai változás figyelhető meg, míg a monociták a szöveti makrofágokhoz és hisztiocitákhoz hasonló sejtekké alakulnak. A limfocitáknak - amelyek néhány napos tenyésztés során a legnagyobb számban maradnak életben - a sejtsztruktúrája alig változik. Hungerford és munkatársai /17/, valamint Nowell /23/ figyelték meg elsőként, hogy ha a tenyésztést a Phaseolus vulgêris kivonatának, a phytohaemagglutininnek /PHA/ jelenlétében végzik, akkor a limfociták egyrésze nagymagvu, kifejezett nukleolusokkal rendelkező, az aktív metabolizmus morfológiai jeleit mutató blaszt-tipusu sejtekké alakul, és a tenyésztés 3-4. napján a kulturákban mitotikus sejttalakok is megjelennek /3. ábra/. Ez a blasztikus stimuláció aspecifikus folyamat, a PHA minden immunilógiailag egészséges egyén limfocitáinak egy részében hasonló átalakulást indít meg.

A klinikai gyakorlatban a celluláris immunstátusz vizsgálatára kiterjedten használják a PHA stimuláció mérését /6, 24, 25/.

A 2.2.1. fejezetben leírt módon szeparált, fehérvérsejteket tartalmazó plazmát Parker 199

3. ábra

A stimulált limfocita tenyészetekben előforduló sejt-
tipusok



Három napos phytohaemagglutininnel stimulált limfocita tenyészetből kenetet készítettünk, majd azt May-Grünvald-Gimsa festéssel megfestettük. A felvétel 900 -szoros direkt nagyítással készült.



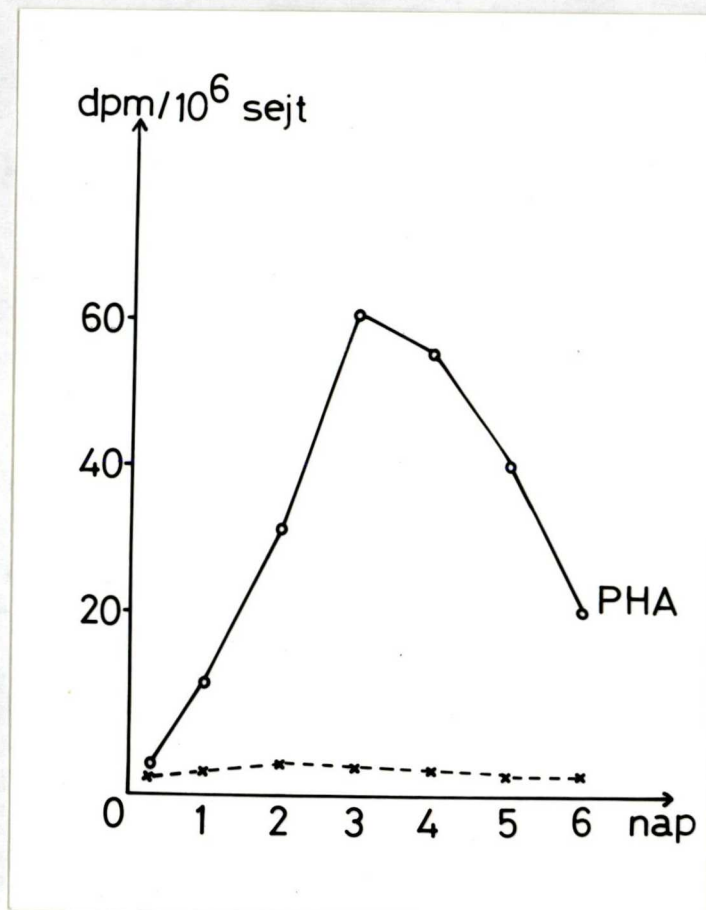
tápfolyadékban úgy szuszpendáltuk, hogy a tápoldat 3×10^7 /ml limfocitát tartalmazzon. Minden esetben 2.5 ml tápoldathoz 0.4 ml-t adtunk a fenti szuszpenzióból / $1,2 \times 10^7$ limfocita/. Tápoldatként 10 % AB RH pozitív humán plazmát és 10 % analóg savót tartalmazó Parker 199 médiumot használtunk. Három-három kulturát kontrollként indítottunk, valamint három-három sejttenyészetet megfelelő módon hígított, 0.1 ml-nyi aspecifikus mitogénnel stimuláltunk. A limfocita kulturák blasztikus átalakulását ^3H -timidin beépülés mérésével határoztuk meg. A tenyészetek leállítására előtt 20 órával minden kulturához 1.0 uCi/ml ^3H -timidint /1.0 Ci/mMol/ adtunk. A leállításakor a sejteket 2 ml 5 %-os triklór-ecetsavval háromszor mostuk, majd 1 ml 5 % triklór-ecetsavban 90°C -on 20 percig hidrolizáltuk. Az így nyert hidrolizátum beütésszámát folyadék scintillációs módszerrel, Tri-Carb készülékkel mértük. Eredményeinket $\text{dpm}/10^6$ limfocita egységben fejeztük ki /4. ábra/. A phytohaemagglutinin /PHA/ esetében 72 órás, Concanavalin-A /Con A/-val stimulált kulturáknál 96 órás tenyésztési időt alkalmaztunk, a stimuláló dózis Phytohaemagglutinin M esetében 0.01 ml PHA/ml volt.

2.4.2. A sejtmigráció gátlás vizsgálata

A sejtmigráció gátlás vizsgálata Rich és Lewis

4. ábra

Limfocita stimuláció PHA hozzáadásával



A limfociták blasztos átalakulása PHA hatására.
A görbék a ^3H -timidin inkorporáció mértékét mutatják PHA-val kezelt és kezeletlen sejtekben.

kísérletein alapszik, akik elsőként figyelték meg, hogy a tuberkulin érzékeny tengeri malacok lépét explantálva a lépdarabkákból a makrofágok sugár irányban kivándorolnak, és ez a migráció tuberkulin hozzáadásával gátolható. Ezzel szemben a tuberkulin hiperszenzitivitást nem mutató állatok lépsejtjeinek migrációját ez az antigén nem befolyásolja /7, 8, 9, 27/. A sejtmigráció gátlást ma leggyakrabban a George és Vaughan által elsőként leírt "kapilláris-technika" segítségével tanulmányozzák. Ennek az egyszerű szemiquantitativ módszernek az a lényege, hogy az előzetesen szenzibilizált állatból vagy személyből származó sejtek kapilláris-csőbe sziva, abból éppennyugy migrálnak, mint a lép-explantátum motilis sejtjei és az ilyen módon létrejött sejt-migráció is gátolható specifikus antigénekkal /14/.

A migráció gátló faktor /MIF/ termelése immun-specifikus folyamat, csak olyan antigének indukálják, amelyekkel szemben a donor szervezet késői tulérzenkységet mutat. A MIF indukcióval szemben a gátló faktor hatása aspecifikus, az egyik speciesz limfocitái által termelt MIF a legtöbb más faj makrofág migrációját is gátolja /19, 33/. Ez tette lehetővé a klinikai vizsgálatok során gyakran alkalmazott indirekt migrációs teszt kidolgozását, amelynek

során a specifikus antigén jelenlétében tenyésztett humán limfoid sejtek tápoldatának MIF tartalmát tengerimalac peritoneális makrofágok segítségével tesztelik /2, 11, 28/.

A leukocita migrációs tesztet a Söborg és Bendixen által leirt és laboratóriumunkban kissé módosított eljárással végeztük /1, 30, 31/.

A 2.2.1. fejezetben leirt módon szeparált leukocita szuszpenzióból hemolizissel eltávolítottuk az ülepités után visszamaradt kis számú vörösvértestet /15/. A hemolizis során az üledéket 2 ml hemolizáló oldatban /2.1. fejezet/ szuszpendáltuk, majd 10 percig 4°C-on inkubáltuk, végül centrifugálás után PBS-ben egyszer mostuk. Ennek során a vörösvértestek hemolizálódtak, míg a fehérvérsejtek között a tripánkékekkel festődő, elhalt sejtek aránya csupán 2-5 %-al fokozódott. A mosott leukocitákat Parker 199 tápoldatban ugy reszuszpendáltuk, hogy a sejtszám $2-3 \times 10^7$ /ml legyen. A sejtsuszpenziót kapilláris csőbe szivtuk, majd annak egyik végét lezártuk és a csövet centrifugáltuk /400 g, 10 perc, szobahőmérséklet/. Ezt követően a kapillárist a folyadék és a sejtréteg határán elvágtuk és a leukocita tartalmu darabkát szilikon zsirral a tenyésztő edény aljára erősítettük. Minden tenyésztő

kamrába kettő kapillárist tettünk, melynek nyílása egymással szemben helyezkedett el. A kamra lezárása után azt 10 % AB RH pozitív kevert humán savót tartalmazó Parker 199 tápoldattal légmentesen feltöltöttük. Az összes vizsgált személynél legalább kétféle kulturát készítettünk, a két-két párhuzamos kultura feléhez antigént adtunk, míg a másik fele kontrollként szolgált. Vizszintes felszínen végzett 20 órás, 37°C-on történő tenyésztés után a sejtek a kapilláris csőből kivándoroltak. A migrált területet állandó körülmények között kivetítettük, körülrajzoltuk, majd planimetriásan mértük. Az antigén okozta migráció gátlást a migrációs index /Mi/ segítségével fejeztük ki, amely az antigén tartalmu és a kontroll tenyészetek migrációjának hányadosa. A migrációgátló hatást akkor tekintettük pozitívnak, ha az Mi 0.85-nél kisebb volt /5. ábra/.

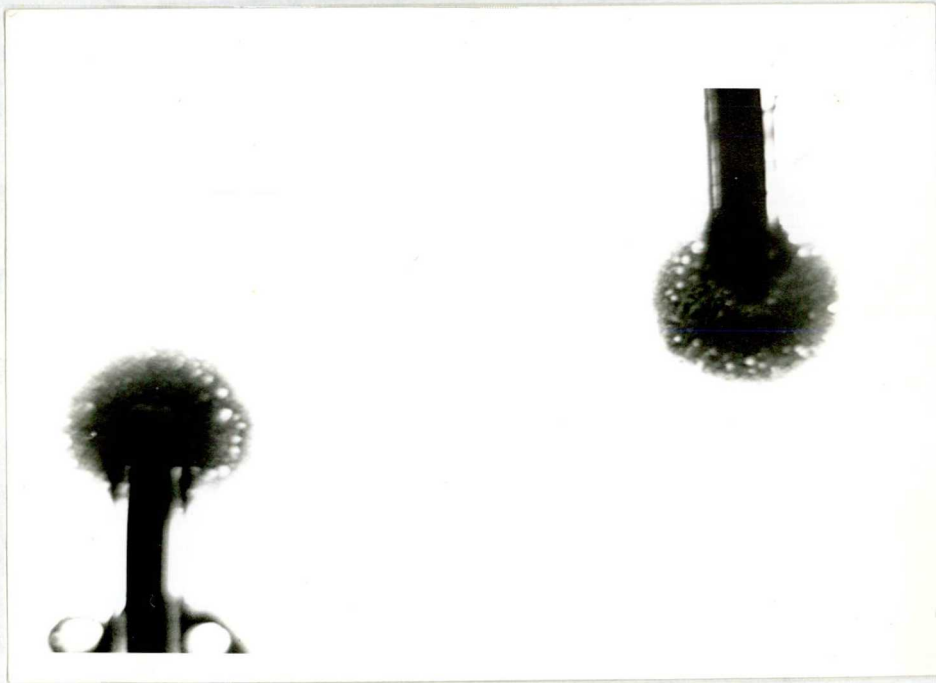
2.5. A granulociták funkciójának mérésére szolgáló in vitro módszerek

2.5.1. A kemotaxis mérése

A sejt mozgása, vándorlása lehet nem orientált, ennek sebességét, frekvenciáját nevezzük kinezisnek.

5. ábra

Sejtmigráció gátlás



A felvétel a leírt módon készített sejtmigráció gátlásról készült 17 órás 37°C -on történt inkubálás után, 25-szörös nagyításban.

A mozgásnak ebben az esetben nincs kitüntetett iránya, illetve kapcsolata valamilyen közvetlen irányító stimulussal. Valamilyen környezeti hatásra bekövetkezett orientált sejtmozgást taxisnak nevezünk. Ha a sejt mozgását és vándorlását kiváltó stimulust kémiai anyag provokálja, kemokinezisről, illetve kemotaxisról beszélünk /34/. A kemotaxis fogalmát először McCuttcheon használta a leukocitákkal kapcsolatban /21/.

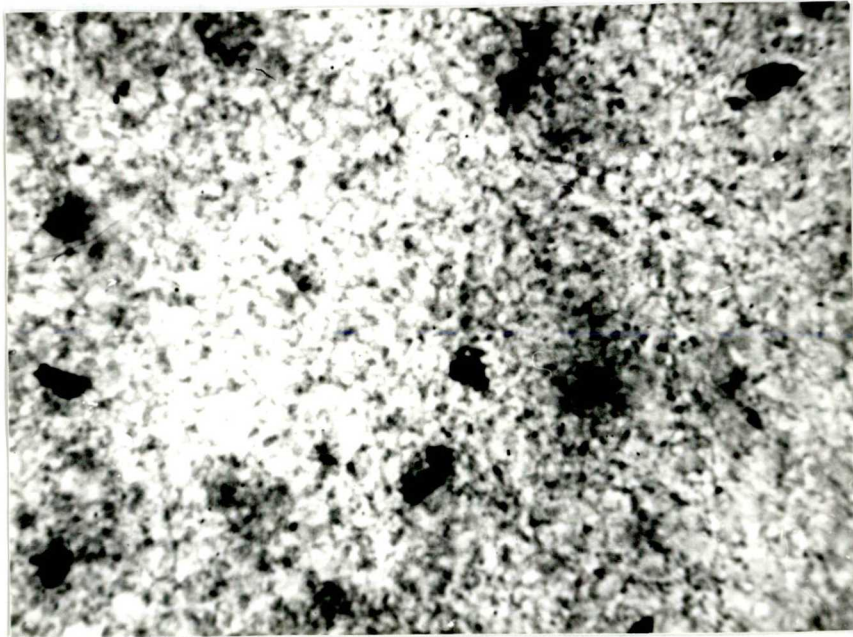
A kemotaxis mérésre Boyden kamrát használtunk. A kamra alsó részébe a hívóanyagból /aktivált zimumbanból, illetve a sejttenyészetek felülszóiából/ mértünk be 200 μ l-t, majd cellulóz nitrát membrán filterrel /Sartorius 3 μ m pórusnagyság/ lefedtük. A kamra felső részébe 400 μ l 10^7 /ml koncentrációju, a 2.2.3. fejezetben ismertetett módon, frissen szeparált granulocita szuszpenziót mértünk. 37°C -on 90 percig tartó inkubálás után a filtert a kamrából kivettük, majd hematoxilinnal festettük /6.ábra/.

A filter alsó felszínének öt, véletlenszerűen kiválasztott területén megszámláltuk az átjutó granulocitákat, és ezek átlagát definiáltuk kemotaktikus indexként.

A filteren véletlenszerűen átjutó, látóterenkénti 1/2-1 granulocitát a kemotaktikus index kiszámításánál nem vettük figyelembe.

6. ábra

A granulociták kemotaxisa



A felvétel az előzőekben leírt módon készített filterről, hematoxilinnel történő festés után, 400-szoros nagyításban készült.

A Boyden-féle technika kidolgozása és bevezetése lehetőséget adott a kemotaxis in vitro vizsgálatára /3/.

A Boyden kamra lényege, hogy vizsgálati folyadékrendszer megfelelő porusnagyságu szűrővel kettéosztott. A vizsgálati tér egyik felébe a kemotaktikus anyag kerül megfelelő koncentrációban, a másik folyadéktérbe pedig a vizsgálati sejtszuszpenzió. Meghatározott időn belül a sejtek a szűrőbe vándorolnak. A szűrőbe vándorolt sejtek száma a megfelelő kontroll rendszerhez viszonyítva a hatásos kemotaktikus anyag esetében jelentősen nagyobb.

A hagyományos, mikroszkópban végzett sejtszámlálás mellett újabban ^{51}Cr -mal jelzett sejteket használnak. Ez fokozza a technika érzékenységét és egyben pontosabb is, mint a mikroszkópos számitással nyert adatok /13/.

A Boyden-féle technikával illetve ennek módosításával végzett vizsgálatokból derült ki, hogy a makrofágok, valamint a különböző polimorfonukleáris leukociták kemotaxisa specifikus kemotaktikus anyagok hatására következik be. A legkiterjedtebb vizsgálatokat a polinukleáris sejtek kemotaktikus faktoraira vonatkozóan végezték.

2.5.2. Kemotaktikus faktorok

1. Exogén anyagok

- a. Bakteriális kemotaktikus faktorok
- b. Szintetikus formyl-methionyl-peptidek
- c. Casein
- d. Lecitinek
- e. Denaturált proteinek

2. Endogén anyagok

a. Humorális

- 1. Komplement faktorok
- 2. Kallikrein
- 3. Leukoagressin
- 4. Fibrin és fibrinogén bomlástermékek
- 5. Fibronektin

b. Celluláris

- 1. Neutrofil granulocitákból felszabaduló faktorok
- 2. Limfocita produktumok: limfokinek
- 3. Mastocitákból felszabaduló faktorok
- 4. Vérlemezkékből felszabaduló faktorok

c. Kötőszöveti kollagén peptidek

2.6. Limfokin indukálása

2.6.1. Limfokin indukálása limfocita kulturában egér vörösvérttest hozzáadásával

A 2.3.4. fejezetben ismertetett módon egér vörösvérttestekkel spontán rozettát készítettünk, és két órán át 4°C -on történő inkubálás után 2.5 ml 10 % borjuszavót tartalmazó Parker 199 tápfolyadékban reszuszpendáltuk. Ugyanattól a betegtől szeparált limfocitákkal, mosott egér vörösvérttestekkel és 0.05 ml borjuszavóval, hasonló mennyiségekkel szuszpenziót készítettünk és centrifugálás nélkül inkubáltuk 2 órát, 4°C -on, majd 2,5 ml 10 % borjuszavót tartalmazó Parker 199 tápfolyadékban szuszpendáltuk. Kontrollként két kulturát indítottunk. Mindkettő 2.5 ml 10 % borjuszavót tartalmazó Parker 199 tápfolyadék volt. Az egyikbe 0.25 ml ugyanattól a betegtől szeparált limfocitát mértünk, a másikhoz 0.25 ml 1 %-os mosott egér vörösvérttestet tettünk. A szeparált limfocitát és az egér vörösvérttest szuszpenziót tartalmazó kulturákat is 2 óráig 4°C -on előinkubáltuk. Minden alkalommal ezt a négy típusu mintát készítettük el, és 24 óráig 37°C -on inkubáltuk. Ezt követően a tenyészeteket lecentrifugáltuk

/2000 g, 5 perc, szobahőmérséklet/, és a felül-
uszót használtuk vizsgálatainkhoz.

2.6.2. Limfokin indukálása T-sejttenyészetekben
egér vörösvértestekkel rozettát formáló sejtek
hozzáadásával

A 2.3.3. fejezetben leirt módon előállított,
tisztított T limfocita szuszpenziót 2,5 ml 10 %
AB RH pozitív humán kevert savót tartalmazó
Parker 199 tápoldatban reszuszpendáltuk. Minden
betegtől négy féle kulturát indítottunk. A: T sejt +
1 E/ml PPD, B: T sejt + 5 % EV⁺ sejt + 1 E/ml PPD,
C: T sejt + 10 % EV⁺ sejt + 1 E/ml PPD, D: T sejt.
Ezeket a kulturákat 24 óráig 37°C-on tenyésztettük,
majd lecentrifugáltuk /2000 g, 5 perc, szobahőmér-
séglet/. A felüluszót használtuk további vizsgá-
latainkhoz.

3. CÉLKITÜZÉSEK

Az egér vörösvértest kötő receptort hordozó limfociták /EV⁺ sejtek/ a keringő limfociták 10-20 %-át alkotják. Az EV⁺ sejtek membrán Ig , C3, és Fc receptor hordozó sejtek, amelyek nem rendelkeznek T limfocita markerekkel. Eddigi ismereteink szerint az EV receptor független a B sejtek egyéb felszíni membrán strukturáitól.

Az EV receptort hordozó B limfociták felszíni sajátosságai jól ismertek, funkcionális tulajdonságairól azonban keveset tudunk. Az értekezésben az EV⁺ sejtek funkcionális tulajdonságaira vonatkozó vizsgálatainkat foglaljuk össze.

Régóta ismeretes, hogy a T limfociták ritkán lépnek közvetlenül reakcióba a szenzibilizáló antigénnel. Az antigéneket - mai tudásunk szerint - a makrofágok veszik fel, bizonyos mértékig módifikálják, majd mintegy "prezentálják" a T limfociták számára. Az antigénprezentáció mechanizmusa azonban ma még kevésbé ismert. Az újabb vizsgálatok szerint, ezért a makrofág funkciójért a makrofágok egy sajátos felszíni strukturája, az ugynevezett Ia antigén lehet a felelős. Ismeretes, hogy a B limfociták is rendelkeznek Ia antigénnel ezért jelen

munkánkban célul tűztük ki annak megállapítását, hogy az egér vörösvértesteket kötő receptorral rendelkező limfociták milyen szerepet játszanak egy tipusos T sejt reakcióban.

Vizsgálandó T sejt reakcióként az in vitro körülmények között könnyen vizsgálható, jól reprodukálható T sejt funkciót, a limfokin termelést választottuk. A T illetve B limfociták szeparálása rozetta technikával történt. Szeparált T limfocita rendszerekben tuberkulin stimulációval limfokin termelést indukáltunk, s ezek egyikének, a kemotaktikus faktornak /LDCF/ az aktivitását határoztuk meg.

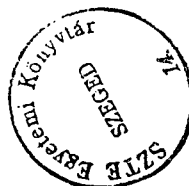
Választ kívántunk kapni arra a kérdésre, hogy 5 illetve 10 % B limfocitának a makrofág mentes T sejttenyészetbe adása mennyiben módosítja a tuberkulin stimulációra bekövetkező kemotaktikus faktor termelést.

Választ kerestünk még arra a kérdésre is, hogy az egér vörösvértestek kapcsolódása a B limfociták egér vörösvértesteket megkötő receptorához létrehoz-e aktiválódást a B sejtekben, és ennek során szabadulnak-e fel limfokin szerű anyagok. Kísérleteink során vizsgáltuk a limfocita-egér vörösvér-

test kötődés során indukálódó DNS-szintézist, mér-
tük az esetlegesen felszabaduló migráció gátló,
illetve kemotaktikus faktor aktivitását is.

Munkánk során a stimulált limfocita tényé-
szetek DNS-szintézisét ^3H -timidin inkorporáció
segítségével, kemotaktikus aktivitást Boyden kam-
rában, a migráció gátló faktor termelést indirekt
eljárással "kapilláriscső technika" segítségével
vizsgáltuk.

Célunk választ kapni arra a kérdésre, hogy
az egér vörösvérttest és a limfocita közötti kötés
valódi receptor-ligand kölcsönhatás-e?



4. EREDMÉNYEK

4.1. Egér vörösvértestet kötő receptort hordozó limfociták hatása a T sejtek kemotaktikus faktor és migráció gátló faktor termelésére

13 vizsgálatot végeztünk, és minden alkalommal négy féle sejttenyészetet vizsgáltunk. A: szeparált T limfocitákat 24 óráig 37°C-on tenyésztettük 1 E/ml PPD jelenlétében. B: Szeparált T limfocitákhoz 5 %-nyi szeparált EV⁺ sejtet adtunk, valamint 1 E/ml PPD-t, és 24 óráig 37°C-on tenyésztettük. C: Szeparált T limfocitákhoz 10 %-nyi szeparált EV⁺ sejtet adtunk, plusz 1 E/ml PPD-t, és 24 órát 37°C-on tenyésztettük. D: Szeparált T limfocitákat 24 óráig 37°C-on tenyésztettük. A kemotaktikus faktor vizsgálatnál pozitív kontrollként zimuzán aktivált komplementet használtunk. Eredményeinket az I. táblázatban foglaltuk össze. Megállapítottuk, hogy 5 illetve 10 % egér vörösvértesteket kötő receptorral rendelkező limfociták /EV⁺ sejtek/ hozzáadására a sejttenyészetek kemotaktikus aktivitása mintegy 25 illetve 35 %-kal megnőtt.

Vizsgálataink eredménye azt mutatta, hogy EV⁺ sejtek hozzáadására minden esetben nőtt a

I. táblázat

EV⁺ sejtek hozzáadásának a T limfociták
kemotaktikus faktor termelésére

	A	B	C	D	E
1.	22	30	34	1	38
2.	27	33	36	1	36
3.	20	23	23	0	41
4.	28	34	37	1	44
5.	25	28	35	2	45
6.	30	32	36	0	40
7.	26	30	34	0	44
8.	25	28	32	1	47
9.	23	26	28	0	34
10.	27	31	33	0	40
11.	24	30	32	1	49
12.	20	34	38	0	43
13.	22	32	34	0	40
átlag	24.54	30.25	33.0	0.54	41.62

A: T sejt + 1 E/ml PPD

B: T sejt + 5 % EV⁺ sejt + 1 E/ml PPD

C: T sejt + 10 % EV⁺ sejt + 1 E/ml PPD

D: Parker 199

E: Zimuzánnal aktivált komplement

kemotaxis index. A statisztikai számítások szerint már 5 % EV^+ sejt szignifikánsan fokozta a kemotaktikus faktor termelést / $p < 0.05$ /.

A PPD-vel stimulált T sejtek migráció gátló faktor termelése is fokozódik már 5 % EV^+ sejt hozzáadására. Amennyiben az EV^+ sejtek aránya a kulturákban még tovább növekszik /10 %/, a kulturák felülszóinak LIF aktivitása is magasabb lesz /7. ábra/.

4.2. Az egér vörösvérttest kötő receptor és az egér vörösvérttestek közötti kötés kölcsönhatása

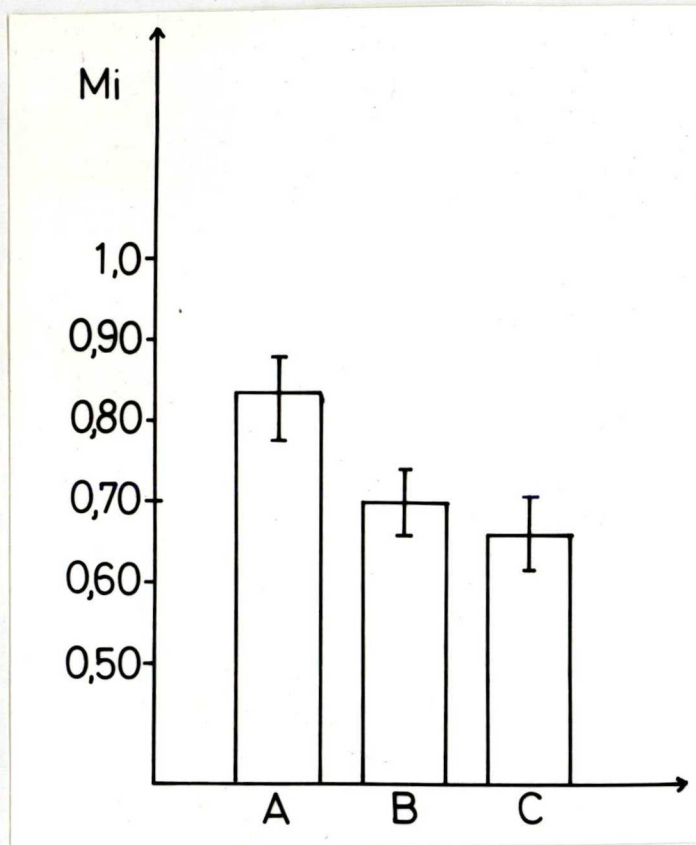
4.2.1. EV^+ sejtek hozzáadásának hatása a limfocita kulturák 3H -timidin inkorporációjára

Vizsgálatainkat 25 immunológiailag egészséges személynél végeztük el. Eredményeinket a 8. ábrán tüntettük fel, amelyből kitűnik, hogy az egér vörösvérttestek és a EV kötő receptor közötti kötés hatására bizonyos mértékű stimuláció jött létre.

Eredményeink szerint a limfocita kulturákban egér vörösvérttestek hozzáadására a 3H -timidin inkorporáció fokozódik, azaz a tenyésztett limfociták enyhe fokú stimulációja következik be. Ez a stimuláció növekedés nem szignifikáns a kontroll csoporthoz viszonyítva, se utal arra, hogy az

7. ábra

5 illetve 10 % EV⁺ sejt hozzáadásának hatása a
szeparált T sejtek PPD hatására termelt migárció
gátló faktorára



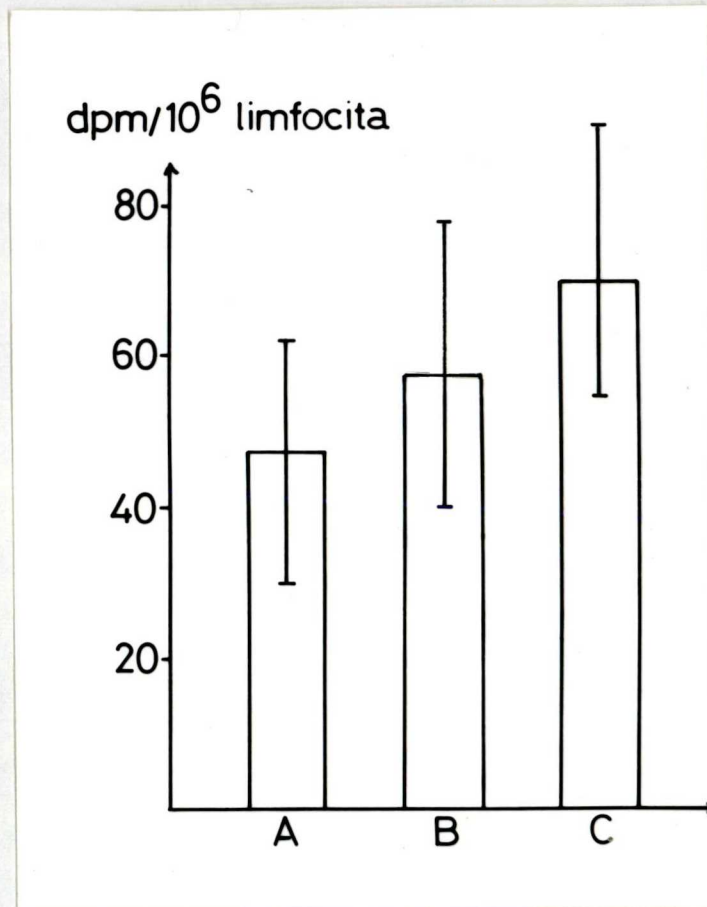
A: Szeparált T limfocita + PPD

B: Szeparált T limfocita + PPD + 5 % EV⁺ sejt

C: Szeparált T limfocita + PPD +10 % EV⁺ sejt

8. ábra

EV⁺ sejtek hozzáadásának hatása a limfocita kulturák ³H-timidin inkorporációjára



A: Szeparált limfocita

B: Szeparált limfocita + mosott egér vörösvérttest + borju savó /rozetta képzés nélkül/

C: Szeparált limfocita + mosott egér vörösvérttest + borju savó /centrifugálás, rozetta képzés/

EV kötő receptor és az egér vörösvértetek között létrejött kötés fokozza a DNS szintézist.

4.2.2. Az egér vörösvértetek hatása a limfociták migráció gátló faktor termelésére

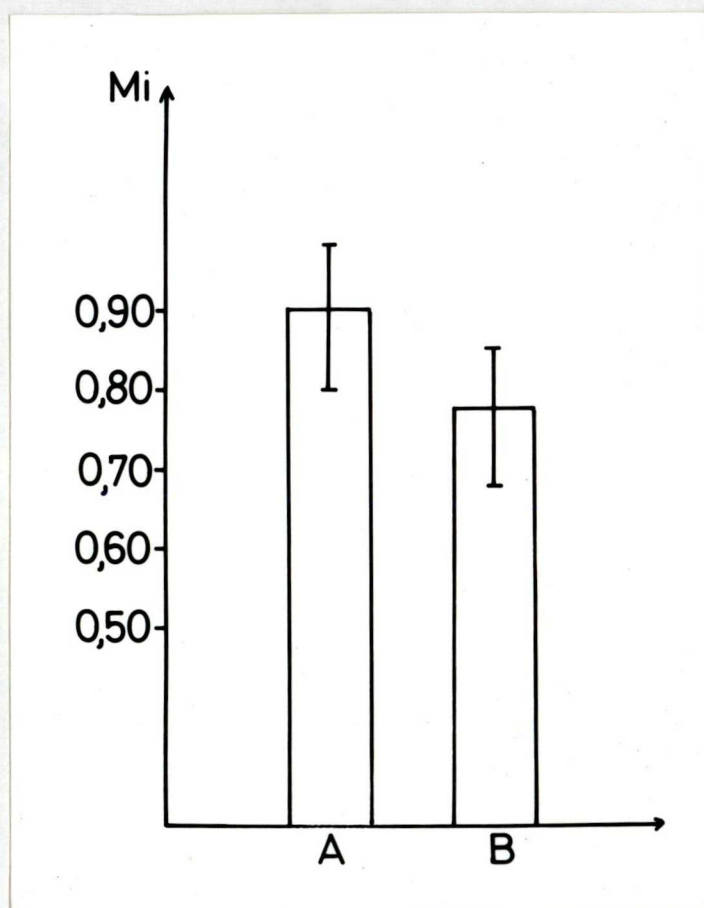
35 esetben végeztük el a vizsgálatot, immunológiailag egészséges személyeknél. 22 esetben 24 óras inkubálási időt alkalmaztunk, míg 13 esetben 12, 24 illetve 48 óra inkubálási időt hagytunk a limfokin szintézisre. Eredményeinket a 9. és 10. ábrán tüntettük fel. Kontrollként mosott egér vörösvértetek felüluszóját használtuk.

Eredményeinkből kitűnik, hogy a limfociták egér vörösvértest jelenlétében tenyésztve nem, míg ha az egér vörösvértestekkel rozettát alkotottak termelnek migráció gátló faktort /9. ábra/. A két csoport átlagos migrációs indexe közötti különbség statisztikailag szignifikáns / $p < 0.05$ /. A 10. ábrán ismertetett vizsgálataink szerint a LIF termelés optimuma a 24 óras tenyésztés. További tenyésztés során a LIF aktivitása a tápoldatban elvész.

4.2.3. Egér vörösvértetek hozzáadásának hatása a limfocita kulturák kemotaktikus faktor termelésére

9. ábra

Egér vörösvértestekkel történő rozetta képző
limfocita kulturák felüluszójának migráció gátló akti-
vitása



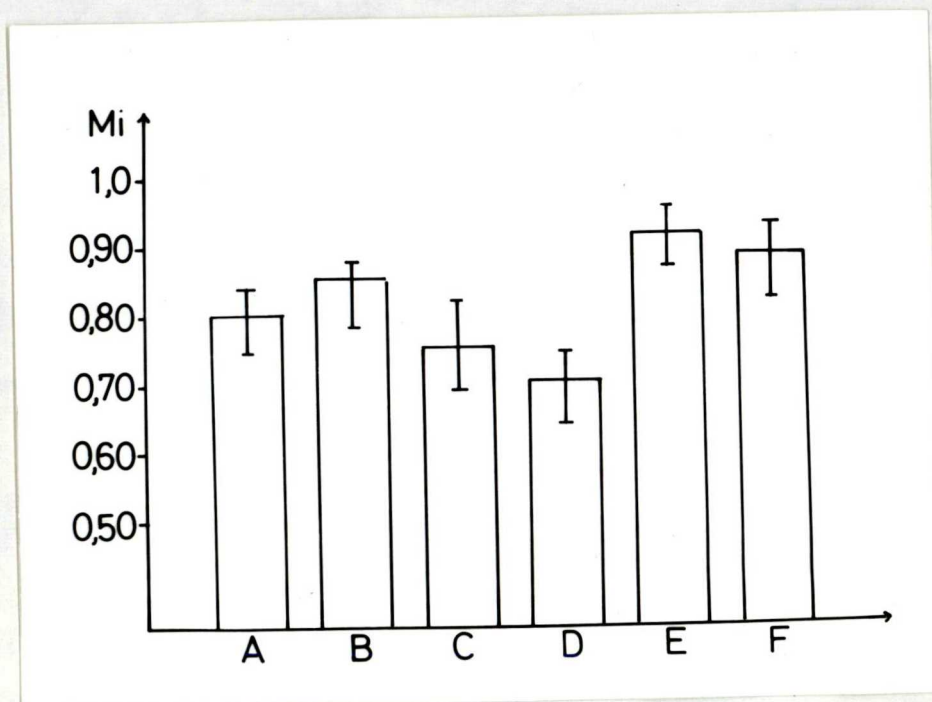
A: Szeparált limfocita + mosott egér vörösvértest +
borju savó /rozetta képzés nélkül/

B: Szeparált limfocita + mosott egér vörösvértest +
borju savó /centrifugálás, rozetta képzés/

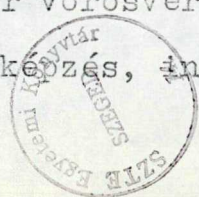
Valamennyi kulturát 24 óráig 37°C-on inkubáltuk.

10. ábra

Egér vörösvérttest receptort hordozó limfociták és az egér vörösvérttestek között létrejött kötés hatására termelődött limfokin migráció gátló hatása 12-, 24-, 48 órás 37°C-on történő inkubálás során



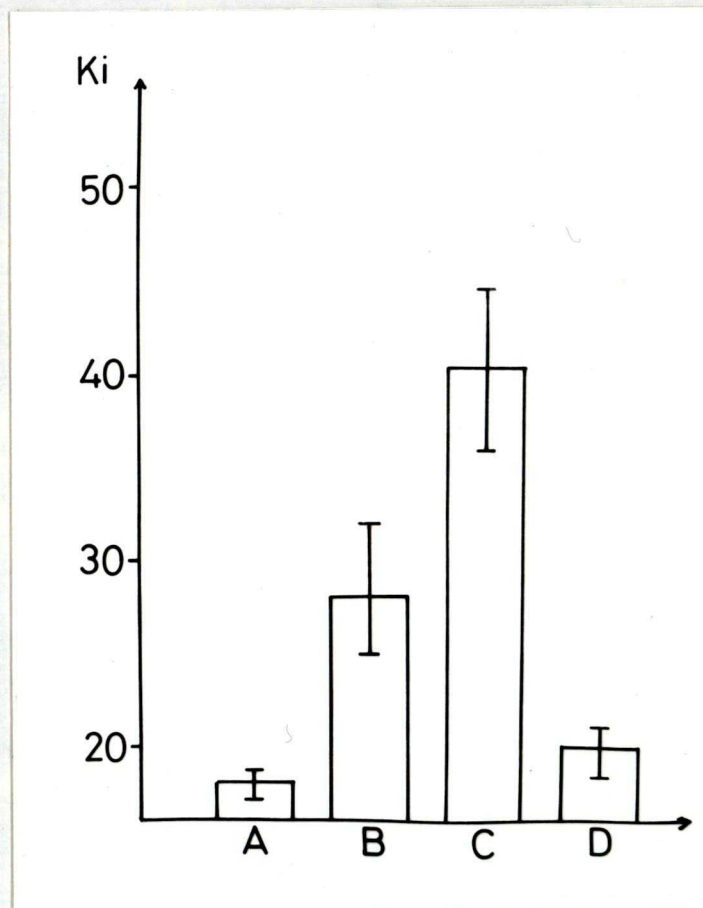
- A: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest + borju savó /rozetta képzés nélkül, inkubálás 12 óra, 37°C/
- B: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest + borju savó /centrifugálás, rozetta képzés, inkubálás 12 óra 37°C/
- C: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest + borju savó /rozetta képzés nélkül, inkubálás 24 óra, 37°C/
- D: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest + borju savó /centrifugálás, rozetta képzés, inkubálás 24 óra 37°C/
- E: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest + borju savó /rozetta képzés nélkül, inkubálás 48 óra, 37°C/
- F: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest + borju savó / centrifugálás, rozetta képzés, inkubálás 48 óra 37°C/



Vizsgálatainkat 10 immunológiailag egészséges személynél végeztük el. Négy féle anyaggal dolgoztunk minden esetben. A: szeparált limfocita 24 óráig 37°C-on történő inkubálás utáni felülszója, B: szeparált limfocita + mosott egér vörösvértest + borju savó, rozetta képzés nélkül, 24 óráig 37°C-on történő inkubálás utáni felülszója, C: szeparált limfocita + egér vörösvértest + borju savó, centrifugálás, rozetta képzés utáni felülszó, D: mosott egér vörösvértestek 24 órás 37°C-on történő inkubálás utáni felülszó. Erdményeinket a 11. ábrán mutatjuk be, amelyen látszik, hogy a rozettát alkotott sejtek tenyészetében kemotaktikus aktivitással rendelkező, limfokin szerű anyag szaporodik fel.

11. ábra

Egér vörösvértestekkel történő rozetta képzés hatása
a limfocita kulturák felüluszójának kemotaktikus
aktivitására



A: Szeparált limfocita

B: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest

C: Szeparált limfocita + egér vörösvérttest + borju savó /centrifugálás, rozetta képzés/

D: mosott egér vörösvérttest

5. MEGBESZÉLÉS

Régóta ismeretes, hogy a szervezet optimális immunválaszának kialakulása többféle immunkompetens sejt kooperációját tételezi fel. Így tudjuk, hogy az immunválaszt elindító antigén nem, vagy csak ritkán kerül direkt kontaktusba változatlan formájában a reakcióban elkötelezett limfocitákkal. A T sejt dependens antigének felismerését és az antigén inger limfociták irányába történő irányítását, azaz prezentálását, csaknem kizárólag nem limfoid sejtek végzik. Korábbi ismereteink szerint ezt a funkciót - az ugynevezett antigén prezentációt - a makrofágoknak tulajdonítottuk. E szerint az antigént a mononukleáris fagocita sejtek veszik fel, és e sejtek továbbítják azt a limfociták felé. Az antigén-inger limfociták felé való továbbításának többféle mechanizmusa lehetséges, illetve ismeretes.

Bizonyos megfigyelések azt látszanak valószínűsíteni, hogy a felvett antigént a makrofágok úgy alakítják át, és hordozzák felszínükön, hogy annak antigenitása erősödik /szuperantigén teoria/. Ez az antigén prezentáció specifikus útja.

Ujabb megfigyelések szerint a makrofágok szolubilis, a T limfocitákat aktiválni képes, azokat

reguláló faktorokat termelnek. Így tudjuk, hogy az antigénnel stimulált makrofágokban interleukin 1 termelése indul meg, és ezen kb. 17 000 dalton molekulás glikoprotein a T limfociták aktiválására képes.

Ma már azt is tudjuk, hogy ezen antigén prezentációs működésért a makrofágok Ia antigénje a felelős.

Ismeretes továbbá, hogy ezen antigén nem csupán a makrofágok sajátja, hanem számos egyéb sejt-féleség felszínén - trombociták, endotel sejtek, Langerhans sejtek, keratinociták, B limfociták - is megtalálhatók. Ezen strukturák és sejtek antigén prezentáló funkció kifejtésére képesek.

Ezek alapján érdemesnek látszott annak vizsgálata, hogy milyen hatással vannak az Ia pozitív B limfociták /egér vörösvértestekkel rozettát képző limfociták/ néhány antigén stimulációra bekövetkező T sejt funkcióra.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy az egér vörösvértestekkel rozettát képző /EV⁺/ limfociták hatására a T sejtek fokozott mértékben termelnek a granulocitákra kemotaktikus hatású faktort /LDCF= lymphocyte derived chemotactic factor/. Már 5 %

EV⁺ sejt hozzáadásának hatására jelentősen fokozódik a T sejttenyészetek kemotaktikus faktor termelése, s ez a B sejtek arányának 10 %-ra történő növelésével még tovább fokozódik. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a T sejtek migráció gátló faktor termelésével kapcsolatban is, nevezetesen EV⁺ sejteknek a T sejtekhez való hozzáadása a PPD-vel stimulált kulturák felüluszóinak LIF aktivitását fokozza. Ezen fokozódás létrejöttéhez már 5 % B sejt jelenléte elegendő.

A LIF-nek makrofág mentes T sejttenyészetben történő termelődését vizsgálva Rocklin és munkatársai 1977-ben szintén azt találták, hogy egér vörösvértestekkel rosettát alkotó limfocitáknak a rendszerhez adása a migráció gátló faktor termelést fokozza. Ők arra következtettek, hogy az egér vörösvértesteket kötő receptorral rendelkező limfociták specifikusan a LIF termelést fokozzák.

Ez a megfigyelésük egybevág a saját, limfokin termelésre vonatkozó tapasztalatainkkal. Mi ugyan valószínűnek tartjuk, hogy e fenti két jelenségért nem valami féle B sejt közvetítette limfokin termelést fokozó hatás a felelős. Sokkal valószínűbbnek tartjuk azt, hogy az EV⁺ sejtek jelenlétében az antigén, nevezetesen rendszerünkben a PPD, T sejtek

irányába való prezentálása válik optimálisabbá. E funkció betöltésére az Ia antigén hordozása teszi alkalmassá az EV^+ limfocitákat.

A további vizsgálataink arra irányultak, hogy ismereteket gyűjtsünk azokról a változásokról amelyek egér vörösvértetek hozzáadásának hatására limfocita kulturákban játszódnak le. Vizsgálatainkat kétfajta kísérleti rendszerben végeztük; 1. az egér vörösvértetek limfocitához való kötődésének nem teremtettünk optimális feltételeket, azaz a limfocitákat a vörösvértetekhez nem közelítettük centrifugálással, 2. az egér vörösvértetek limfocitákhoz való kötődéséhez a feltételeket centrifugálással optimalizálni igyekeztünk. /Ugy jártunk el, ahogy a rozetta képzés vizsgálatánál szoktunk, lásd 2.3.4. fejezet./ Vizsgáltuk az egér vörösvértetek hozzáadásának hatását a kulturák 3H -timidin inkorporációjára és két limfokin, az LDCF és LIF termelésére. /Mindkét limfokin a B sejtek önállóan is termelik./

Azt találtuk, hogy az egér vörösvértetek hozzáadására a limfocita kulturákban 3H -timidin inkorporáció indul meg. Ezen aktiválódás kifejezettebb mértékű akkor, ha az egér vörösvértetek kötődésének feltételei optimálisabban biztosítottak. Az egér vörösvértetek hozzáadására a limfocita kulturákban

ugy LIF, mint LDCF termelés indul meg. Mindkét limfokin termelése, azaz a kulturák felülszóiinak megfelelő aktivitása nagyobb, ha az egér vörösvérttest kötés feltételei optimálisabbak. Megállapítottuk továbbá azt, hogy a limfocita kulturák egér vörösvérttestek hatására bekövetkező LIF termelése maximumát 24 óra múlva éri el, és az inkubációs idő további növelése már nem kedvez a limfokin termelésnek. Ezen utóbbi megfigyeléseink - ^3H -timidin inkorporáció, limfokin termelés - szerint az egér vörösvérttestek limfocitákhoz kötődése feltételeinek optimalizálása az aktiválódás fokozódását eredményezi minden esetben. Így valószínűnek látszik, hogy az észlelt funkcionális változások egy adott limfocita populáció valódi receptor útján történő aktiválásának a következményei, azaz az egér vörösvérttest receptor és az egér vörösvérttestek közötti kötés valódi receptor-ligand kölcsönhatás.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink összességükben arra utalnak, hogy az EV^+ sejtek rendelkeznek olyan felszíni strukturákkal melyek részt vesznek az antigén prezentációban, és e sejtek antigén prezentáló aktivitása kifejezettebb, mint az Ia^+ T limfocitáké. Irodalmi adatok felvetik annak a lehetőségét, hogy ezért a funkcióért az EV^+ sejtek DR antigénje a felelős. Vizsgálataink szerint a B limfociták a EV kötő receptoron keresztül stimulálhatók, azaz egér vörösvértest és a limfocita közötti kötés markerek, és nem felszíni töltés viszonyok passzív következménye; azaz a kölcsönhatás valódi receptor-ligand kölcsönhatásra emlékeztet.

IRODALOM

- 1/ Bendixen, G. and Söborg, M.: Comments on the leukocyte migration technique as an in vitro method for demonstrating cellular hypersensitivity in man.
J. Immunol. 104: 1551, 1970.
- 2/ Bloom, B. R. and Bennett, B.: Migration inhibitory factor associated with delayed type hypersensitivity.
Fed. Proc. 27: 13, 1968.
- 3/ Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes
- 4/ Boyum, A.: One-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 21:97, 1968.
- 5/ Brain, P., Gordon, J. and Willette, E. A.
Rosette formation by peripheral lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 6: 681 1970.
- 6/ Daniels, J. C. Ritzmann, S. E. and Levin, W. C.:
Lymphocytes morphological, developmental and functional characteristics in health, disease and experimental study. An analytical review.
Tex. Rep. Biol. Med. 26: 5 1968.

- 7/ David, J. R.: Lymphocyte mediators and cellular hypersensitivity.
New Engl. J. Med. 288: 143 1973
- 8/ David, J. R.: Delayed hypersensitivity in vitro: Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cellantigen.
Proc. nat. Acad. Sci. /Wash./ 56: 72 1966.
- 9/ David, J. R.: Macrophage migration
Fed. Proc. 27: 6 1968
- 10/ Dobozy, A., S. Husz, J. Hunyadi and N. Simon: Formation of mouse erythrocyte rosettes by human lymphocytes. A B-cell marker.
Clin. exp. Immunol. 23: 382 1976
- 11/ Ford, W. L.: Lymphocyte migration and immune responses.
Prog. Allergy, 19: 1-59 1975.
- 12/ Fröland, S. S. and Natvig, J. B.: Surface-bound immunoglobulin on lymphocytes from normal and immunodeficient humans.
Scand. J. Immunol. 1: 1 1972
- 13/ Gallin, J. I., Wright, D. C., and Schiffmann, E.: Role of secretory events in modulating human neutrophil chemotaxis.
J. Clin. Invest. 62: 1364 1973.
- 14/ George, M. and Vaughan, J. H.: In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity.
Proc. Soc. exp. Biol. 111: 514 1962.

- 15/ Gordon, F. and Schwartz, M.: Preparation of purified lymphocyte suspension using TRIS-NH₄Cl buffer.
Exp. Med. Surg. 29: 1-3 1971
- 16/ Greaves, M. F. and Meller, E.: Studies on antigen-binding cells. The origin of cells.
Cell. Immunol. 1: 372 1970
- 17/ Hungérford, D. A., Donnelly, A. J., Nowell, P.G., Beck, S.: The chromosome constitution of a human phenotypic intersex.
Amer. J. hum. Genet. 11: 215 1953
- 18/ Jondal, M., Holm, G. and Wigzell, H.: Surface markere on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells.
J. exp. Med. 136: 207 1972
- 19/ Lamelin, J. P.: Inhibition of macrophage migration. in: Cell-mediated immunity. In vitro correlates. Ed: Revillard, J. P. Karger, Basel, 1971
- 20/ Lay, W. H., Mendes, N. F., Bianco, C. and Hussenzweig, V.: Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes.
Nature 230: 531 1971

- 21/ McCutcheon, M.: Investigation macrophage chemotaxis
in Pancreatitis
Physiol. Rev. 26: 319 1946
- 22/ Nota, N. R., Liacopoulos-Briot, M., Stiffel, C.
and Biozzi, G.: L'immuno-cytoadhérence:
une méthode simple et quantitative pour
l'étude in vitro des cellules productrices
d'anticorps.
C. R. Acad. Sci. /Paris/ 259: 1277 1964
- 23/ Nowell, P. C.: Phytohaemagglutinin: an inhibitor
of mitosis in cultures of normal human
leucocytes.
Cancer Res. 20: 462, 1960
- 24/ Ónody K.: A lymphocyták mitogének által kiváltott
blasztos transzformációjának jellemzői.
Orvosképzés 49: 281 1974
- 25/ Ónody K.: Normál egyének lymphocytáinak phyto-
haemagglutinin érzékenysége. A celluláris
immunológia aktuális kérdései.
A Magyar Immunológiai Társaság kiadása
164. old. Budapest 1973
- 26/ Perper, R. J. and Mickelson, M. M. : Purification
of lymphocytes and platelets by gradient
centrifugation.
I. Lab. clin. Med. 72: 842-851 1968

- 27/ Rich, A. R., and Lewis, M. R.: The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies.
Bull. Johns Hospital 50: 115 1932
- 28/ Rocklin, R. E., Meyers, O. L. and David, J. R.:
An in vitro assay for cellular hypersensitivity in man.
J. Immunol. 104: 95 1970.
- 29/ Rocklin, R. E., Mac Dermott, R. P., Chess, L., Schlossman, S. F., and David J. R.,
Studies on mediator production by highly purified human T and B lymphocytes.
J. exp. Med. 140: 1303 1974
- 30/ Söberg, M. and Bendixen, G.: Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity.
Acta med. scand. 181: 1967
- 31/ Söberg, M.: In vitro demonstration of cellular hypersensitivity in man. Specific migration inhibition of white blood cells from brucella-positive persons.
Acta med. scand 182: 167-174, 1967
- 32/ Stathopoulos, G. and Elliott, E. V.: Formation of mouse or sheep red blood-cell rosettes by lymphocytes from normal and leukaemic individuals.
Lancet i: 600 1974

- 33/ Svejcar, J., Pekarek, J. and Johanovsky, J.:
Studies on the mechanism of delayed type
hypersensitivity in tissue cultures XIV.
Species nonspecificity of biologically
active substances /migration inhibiting
factor/ released during the interaction
of hypersensitivitive.
Z. Immun. Forsch. 141: 119 1971
- 34/ Wilkinson, P. C.: Chemotactis and Inflammation,
Churcill, Livingston, Edinburgh, 1974
- 35/ Zaalberg, O. B.: A simple method for detecting
single antybody-forming cells.
Nature 202: 1231 1964

