

SZÖVETTENYÉSZTÉS SZEREPE AZ IMMUNOLÓGIAI VIZSGÁLATOKBAN

BENCZUR MIKLÓS és PETRÁNYI GYŐZŐ

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet Transzplantációs Immunológiai osztálya,
Budapest

Bevezetés

A szövettenyésztés az első jelentős eredmények idején már összefonódott az immunológiával, amikor CARREL és INGBRIGTSEN 1912-ben tengeri malac nyirokcsomó és csontvelősejtek kecske vörösvérsejtek elleni hemolizin termelését *in vitro* rendszerben elsőként tanulmányozták [10]. A szintetikus tápoldatok bevezetése és elterjedése (Fischer 1948, Morgan 1950) tovább szélesítette a limfoid sejtek tenyésztésének lehetőségeit és biztosította különböző laboratóriumok számára is a reprodukálható, *in vitro* módszerek alkalmazását. A szervezet immunválaszának tanulmányozására a bonyolult regulációs tényezők hatásától izolált, *in vitro* rendszerek rendkívüli előnyt jelentettek, így érthető, hogy mind a celluláris immunválaszt [13], mind a humorális ellenanyag szintézist [19] sikerrel vizsgálták *in vitro* modellek segítségével. A szövettenyésztés eszközeinek és lehetőségeinek fejlődésével pedig az immunológia egyik alapvető módszerére talált a szövettenyésztésben.

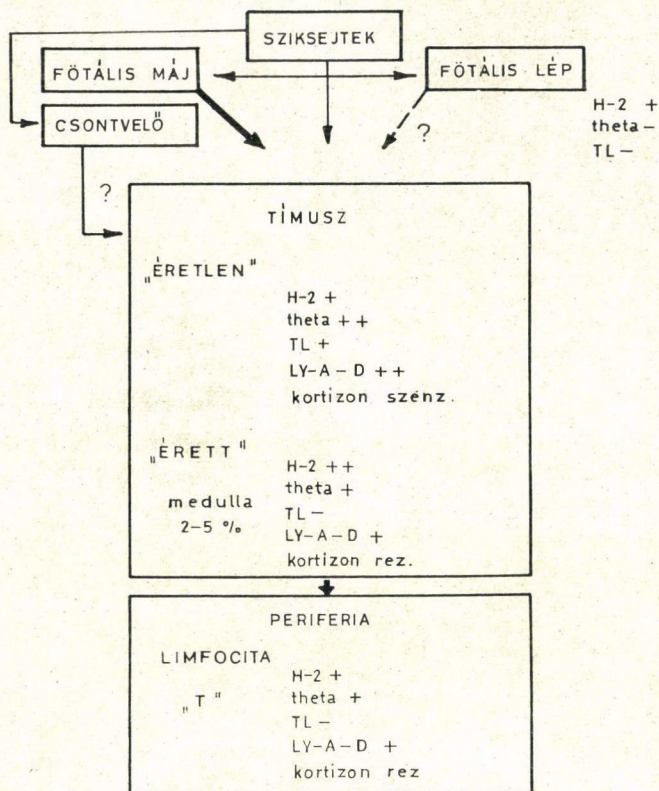
Az immunológiai jelenségek modellezésénél elsősorban limfociták, azok különböző populációinak, valamint makrofágoknak a tenyésztését kell megoldanunk. Összefoglalónkban kizárólag a limfociták tenyésztésével, annak eszközeivel és eljárásaival foglalkozunk, a makrofágokra nem térünk ki, minthogy azok tenyésztési igénye kisebb lévén, az alábbiakban vázolt rendszerekben a monocita/makrofág rendszer sejtjei jól tenyésznek.

A limfociták jellemzői

A limfocitákat pusztán *morfológiai* kritériumok szerint olyan sejtekként jellemezhetjük, amelyeknek a citoplazmához képest nagy magjuk van, gazdagok riboszómában, számos mitokondriumot tartalmaznak, kis Golgi-apparátussal és néhány lizoszómával rendelkeznek. Már a korai vizsgálatok alapján kicsiny, közepes, illetve nagy limfocitákat különböztettek meg, amely e sejtek heterogenitására utalt.

A limfociták a multipotenciális *őssejtekből differenciálódnak*, amelyek a szikhólyagból származnak. Aszerint, hogy immunológia funkcióképességüket

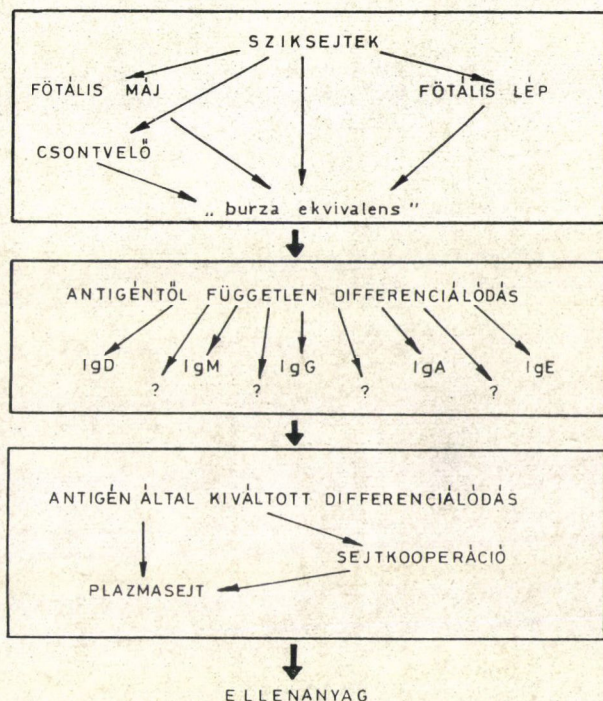
A T-SEJTVONAL DIFFERENCIÁLÓDÁSA



1. ábra. A „T” sejtvonal differenciálódása a multipotenciális őssejtekből (sziksejtek) az immunológiai kompetens perifériás limfocitákká. Az egyes sejtpopulációk jellemző antigénjeit az ábrán feltüntettük (1. az 1. táblázatot)

melyik elsődleges nyirokszervben nyerik el, megkülönböztetünk timusz dependens, ún. „T”, illetve bursa dependens, „B” limfocitákat. Ezek a megfigyelések főként madarakon végzett vizsgálatokon alapultak, ahol a két elsődleges nyirokszerv morfológiailag is jól elkülöníthető. Emlőskben a Bursa Fabriciusnak megfelelő szervet mindeddig nem sikerült biztonsággal meghatározni. Feltehetően a gasztrointesztinális rendszer nyirokapparátusa tölti be a „bursa equivalens” funkciót. A T és B limfociták differenciálódását röviden az 1. és 2. ábra foglalja össze. Az elsődleges nyirokszervekben a mikro-környezet és humorális mediátorok (thymus faktor), valamint klonális oszlás során differenciálódó kompetens sejtek a másodlagos nyirokszervekbe (nyirok-csomók, lép, tonsilla stb.) vándorolnak és ott morfológiailag jellemző helyen (pl. a T sejtek a nyirokcsomók parakortikális régiójában) helyezkednek el. (1. és 2. ábra.)

A B-SEJTVONAL DIFFERENCIÁLÓDÁSA



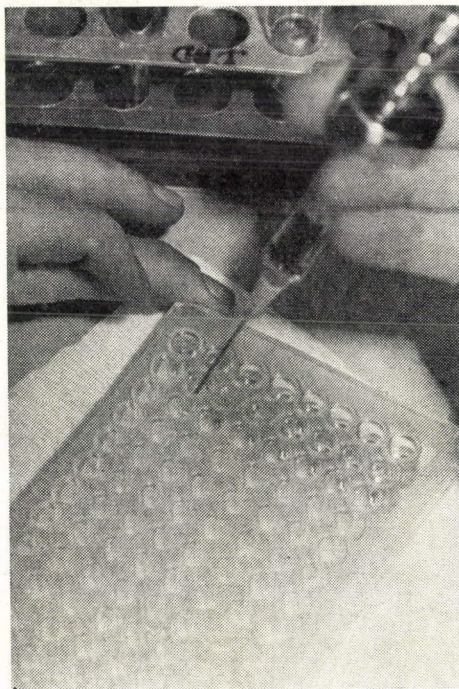
2. ábra. A „B” sejt vonal differenciálódása az ellenanyagtermelő plazmasejteké.

Mai ismereteink szerint mind a T, mind a B limfociták számos *szubpopulációra* oszlanak, aszerint, hogy milyen funkciót töltenek be a szervezet immunmechanizmusában. Ezek a szubpopulációk egyrészt jól detektálható felületi receptorokkal, illetve antigénekkal, másrészt funkcionális sajátosságokkal rendelkeznek. Az antigéneket és receptorokat az 1. táblázat foglalja össze.

A limfociták intenzív *mozgáskészséggel* rendelkező sejtek, amely mozgás az immunológiai jelenségekben (pl. sejt közvetítette citotoxicitás) jól megfigyelhető (3. ábra).

Felületi *negatív töltésük* nagysága alapján, szabad elektroforézissel több populáció különíthető el. A T sejtek nagyobb negatív töltésűek révén a gyors motilitású frakcióban helyezkednek el, bár a timusz sejtek 11%-a a lassú motilitású frakcióhoz tartozik [17].

Különböző anyagok, az ún. *mitogének* mind a T, mind a B sejteket aspecifikusan, intenzív sejtoszlásra készítetik (blasztos transzformáció). A fitohemagglutin (PHA), a konkanavalin-A (ConA) a lentil mitogén, a T limfocitákra gyakorolnak mitogén hatást, a lipopoliszacharid (LPS) az aggregált PPD és az anti-immunoglobulin a B sejteken fejtik ki hatásukat, a pokweed



3. ábra. Citotoxikus limfocita aktivitás meghatározására szolgáló félmikro-sejtkultúrák összemérése (1×10^4 célsejt kultúránként)

I. táblázat

„T” és „B” Limfociták felületi antigénjei és receptorai

ANTIGÉNEK		„T”		„B”	
név	allél	TIMUSZ	PERIF.	NYUGVÓ	EA. TERM
* THETA	AKR, C3H	+++	+	—	—
TL	1, 2, 3,	++	±	—	—
GIX		+	±	—	—
LY A	A ₁ , A ₂	++	+	—?	—?
B	B ₁ , B ₂	++	+	—?	—?
C	C ₁ , C ₂	++	+	—?	—?
D	D ₁	++	+	—?	—?
* E		+	+	—	—
MPLA		+	+++	—?	—?
* Ig		—	—	+	++
* MBLA		—	—	+	+
* MSPCA		—	—	+?	+++
* C3b		—	—	+	—
* Fe	(IgG ₁)	—	—	++	—
PC-1		—	—	—	++

A fontosabb receptorokat, illetve antigéneket *-gal jelöltük meg (egér limfociták).

mitogén (PWM) pedig mindkét populációt transzformálja. A mitogének hatása volt az egyik olyan bizonyíték, amely világosan rámutatott arra, hogy a kezdetben végsejteknek tartott limfociták további funkcióra képes sejtek.

Az egyes limfocita populációk *életideje* sem azonos. Megkülönböztetünk rövid és hosszú életű populációkat. A rövid életű limfociták azok, amelyek intermitotikus fázisa mintegy két hétre tehető, és többségük 4–5 nap alatt mitózisba kerül. A hosszúéletű populációnál az intermitotikus fázis hónapokra terjedhet ki. Mind a B, mind pedig a T limfociták egyaránt tartozhatnak a hosszú, illetve rövid életidejű sejtekhez [6]. A timusz sejtjeinek pl. 95%-a rövid életű és a hosszú életű limfocitákat a velőállomány tartalmazza, a csontvelőben pedig majdnem az összes limfocita rövid életidejű [12].

A limfociták jelentős része a nyirokereken, illetve a ductus thoracicuson keresztül *recirkulál* [14]. A recirkuláló thoracicus sejtek 80–90%-át a T sejtek alkotják. A B sejtek kisebb hányadot tesznek ki, amit részben a recirkuláló lassabb időkinetikája is magyaráz [15].

Mindezek az itt csak röviden összefoglalt jellemző tulajdonságok is rávilágítanak arra, hogy a limfociták tenyésztésénél számos sejtpopuláció együttes tenyésztéséről van szó, amelyeknek tenyésztési igényei sem feltétlenül azonosak. Erre utal az a tény is, hogy a T és B sejtek különböző érzékenységgel bírnak egyes ágensek, így pl. citosztatikumok, antilimfocita szérum, kortikoszteroidokkal szemben. Amikor tehát célunk valamennyi populáció tenyésztése optimális szövettenyésztési feltételeket kell biztosítanunk a viszonylag rövidnek tűnő (1–6 nap) periódus alatt is, hogy a legérzékenyebb sejteket se veszítsük el.

Limfociták szeparálása

Limfociták elválasztására elsősorban akkor van szükségünk, amikor kiindulási anyagunkat perifériás vér képezi. A vérből való szeparálásra számos módszert dolgoztak ki, amelyek közül a legelterjedtebb az 1 : 3 arányú 4%-os (37 °C) zselatinnal történő elegyítés, amellyel 15–30 perces ülepítés után — mivel az aggregálódott vörösvérsejtek gyorsabban szedimentálódnak —, viszonylag tiszta sejtuszpenzió nyerhető. Hasonló elven szeparálhatók el a vörösvérsejtektől a limfociták nagy molekulású (5%-os) dextrán oldat segítségével is. A visszamaradt vörösvérsejtek 0,83%-os, hipotóniás ammoniumklorid segítségével hemolizálhatók. Finomabb vizsgálatokhoz azonban, ahol a limfocita szubpopulációk megtartása szükséges, a fikoll gradiens centrifugálásos módszer ajánlható [7]. Ennek lényege, hogy fikoll és diatrizoát röntgenkontrasztanyag keverékével létrehozott 1,076-os fajsúlyú folyadék fölé rétegezett, hígított vérből a vörösvérsejtek, nagyobb fajsúlyuk révén, a centrifugálás során leülepednek, míg a tiszta limfocita populációk interfázisból eltávolíthatók. Speciális célokra rozetta szeparálási, oszlop frakcionálási és más módszerek is használatosak.

Limfociták konzerválása

10% DMSO₄ és más konzerváló anyagok segítségével, a hőmérséklet fokozatos csökkentése mellett (1 °C/perc) limfociták folyékony nitrogénben, funkcióképességüket tartva, jól konzerválhatók. A fokozatos hőmérséklet-csökkentésre alkalmazott berendezések az életképesen visszanyerhető sejtek számát nagymértékben emelik. A limfocita konzerválása azért különösen jelentős, mert segítségével az effektor sejtek tenyésztése számos esetben kiküszöbölhető, így a konzerválás bizonyos mértékig a szövettenyésztés helyettesítője lett, mivel elegendő számú sejt esetén, különböző időpontokban is végezhetőek vizsgálatok ugyanazon sejtekkel.

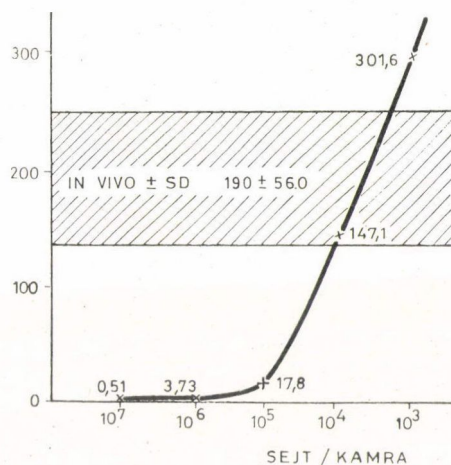
Limfociták tenyésztése

A tenyésztésnek két fő célja van. Az első cél az *immunológiai reakciók modellezése* és tanulmányozása. Ebben az esetben elsősorban ellenanyag-termelés, különböző transzformációs kísérletek, sejt közvetítette immunreakciók, migráció gátlás, rozetta formáció és más immunológiai jelenségek in vitro megfigyelésére irányuló kísérletekről van szó. A másik fő cél különböző limfoid sejtvonalak létrehozására és fenntartása, amikor is különleges tulajdonsággal, receptorral, felületi antigénnel rendelkező limfoid sejteket, vagy tumorokat kívánunk tenyészteni.

Amíg az előbbi esetben a klasszikus értelemben vett szövettenyésztés nem valósul meg, mivel a tenyésztési idő igen rövid (1–7 nap), addig az utóbbi esetben a klasszikus szövettenyésztési módszerek kerülnek alkalmazásra és lényegében véve azokkal megegyeznek, ezért a továbbiakban nem részletezzük.

A limfociták, mivel funkcionálisan erősen differenciálódott sejtek, szövettenyésztési igényük magas és speciális médiumot kívánnak meg. Itt kell kiemelnünk azt a nehézséget, amit az jelent, hogy a limfociták folyamatosan termelnek különböző faktorokat (MIF, immunoglobulinok, PF, LT, interferon, stb.), amelyek magasabb koncentrációban feltehetően csökkentik a tenyésztési effektust, ezért a médium igen gyakori cseréjére lenne szükség. A sejtek azonban igen érzékenyek a sejt denzitásra (1–2 × 10⁶ly/ml), amely nem teszi lehetővé nagy térfogatú szuszpenziós kultúrák létrehozását. Ezt az ellentmondást csak különleges in vitro rendszerekkel, illetve transzformált sejtekkel (vírus, mitogének) sikerült feloldani.

Speciális limfocita-médiumok (pl. RPMI–1640) további segítséget jelentettek főként a rágeszélők limfocitáinak tenyésztése terén, azonban humán limfociták elfogadhatóan tenyésznek az eredetileg vírus tenyésztésre létrehozott Parker 199-es tápoldatban is. A médiumok főtájis borjú szérummal (FBS 10–15%), vagy homológ (autológ) szérummal való szupplementálása



4. ábra. YBA-limfoma sejtek vizsgálata diffúziós kamrában. Az abszcisszán a kamrába bejuttatott sejtszámot (10^7 – 10^3) az ordinátán a tenyésztés 5. napján észlelt effektív multiplikációt (= visszanyert élő sejt/bevitt élő sejt) tüntettük fel, amíg a vonalkázott sáv az élő állatban létrejövő tumorsejt multiplikációt mutatja. A 10^4 kezdeti sejtszám bevitele esetén az élőben lefolyó multiplikáció modellezhetőnek bizonyult.

elkerülhetetlen. Régi megfigyelés, hogy bizonyos FBS minták jó, míg mások rossz tenyésztési effektust okoztak. Az erre irányuló vizsgálatok tisztázták, hogy azok a szérumok rendelkeztek jó effektussal, amelyek egyben mitotikus hatással is bírtak. — A sejtek, különösen rágesáló limfociták igen érzékenyek a pH változással szemben, azonban a széndioxid termosztátok bevezetése és organikus pufferek használata (HEPES) e kérdést megoldani látszanak.

A hosszú tenyésztés során (sejtvonalak) a limfociták bizonyos tulajdonságokat elveszthetnek és így speciális sejtvonalak jöhetnek létre. Ilyen példa a Daudi sejtvonal, amely a transzplantációs antigének szintézisére már nem képes, de megőrizte eredeti B sejt antigén struktúráját. A hosszú munka eredményeképpen ma már számos limfoid sejtvonal, elsősorban leukémiás sejtekből származók állnak a kutatók rendelkezésére (CCRF—SB, EB-3, MOPC—31C, RAJI stb.).

Tekintettel arra, hogy a limfoid sejtek tenyésztése nehezen megoldható feladat, ezért számos, úgynevezett *különleges rendszert* alakítottak ki, amelyek az in vivo és in vitro tenyésztési feltételek kombinációjának tekinthetők. Ilyen különleges rendszerek a recipiens állatok intrakraniális terében, elülső szemesarnokában, hörsөгök pofazaeskö szubkutiszában való tenyésztés. Ezek a rendszerek immunológiailag „privilegizált” helyet vesznek igénybe, ahova a beültetett sejtek elleni immunreakciók kisebbek, azonban kompatibilis rendszereknek mégsem tekinthetők. Másik jellemzőjük, hogy a bejuttatott sejtek megfigyelése, kvantitatív lemérése — szemben az in vitro rendszerekkel — nehézségbe ütközik, illetve nem valósítható meg. A különleges rend-

szerek közül csak a besugárzással inaktívvá tett állapotba való sejtttranszfer [11], valamint a diffúziós kamra technika [1] terjedt el széles körben, minthogy az utóbbi kívánalmaknak is megfelelnek. A diffúziós kamra módszer rövid ismeretetésére még visszatérünk.

A rövid idejű tenyésztések, illetve az immunológiai reakciók lemérése és megfigyelése egyre inkább műanyag edényekben, tálcákban, csövekben történik.

A továbbiakban néhány immunológiai alaplódszert mutatunk be, amelyek példázják a szövettenyésztésnek az immunológiában való alkalmazását.

Mikroplate technika [20]: A tenyésztés $10\ \mu\text{l}$ térfogatú, csonkakúp alakú tálcalyukokban történik, amelyek fenekén 2–400 sejt tenyésztésére és megfigyelésére van elegendő hely. Előnyét a rendkívül kicsiny mennyiségekkel való munka és a folyamatos vizuális kontroll lehetősége jelenti. Segítségével különböző tumorsejtek ellen irányuló immunválasz és antiszérumok hatásának lemérése valósítható meg. Ugyanebben a műanyag tálcában (Terasakitalca) történik a transzplantációs antigének meghatározására szolgáló mikrocitotoxicitási reakció is. A reakciók kétféleképpen értékelhetők ki; ha antiszérumok hatását mérjük le, akkor az elpusztult sejteket megfestve (trypan kék, eozin) azok száma fordított sugármenetű mikroszkóppal közvetlenül meghatározható. Adherens tulajdonsággal bíró célsejtek (elsősorban tumorsejtek) elleni limfocita aktivitás is meghatározható ezzel a módszerrel, amelynek kiértékelése úgy történik, hogy az effektor limfocitákat és az elpusztult célsejteket lemosva, az adheráló, éppen maradt sejtek számát mikroszkóposan határozzuk meg. Megfelelő kontrollok és limfocita: célsejt arányok alkalmazásával a reakció jól, quantitative értékelhető. A mikrotálca használatának hátránya, hogy a kiértékelés vizuális számolást igényel. Ennek kiküszöbölését szolgálja a nagyobb méretű tálcák alkalmazása.

Szemi-mikro citotoxicitási reakciók céljára a nagyobb méretű, lapos, vagy gömbölyű fenekű műanyag tálcák (Falcon 3040, Linbro IS FB 96 TC) alkalmazhatók. Ezek térfogata 0,3–0,4 ml és fenekük nagyobb felülete több célsejt (10^3 – 10^5) tenyésztését teszi lehetővé, amelyeknél már izotópos jelzéssel is lemérhetők a reakciók eredményei. A laposfenekű tálcák esetében a mikroszkópos kontroll elvégzésére is mód nyílik. Izotóppal jelzett célsejtek vizsgálata általában release módszerrel történik, amelynek során a felülúszóból határozzuk meg az elpusztult sejtekből kiszabaduló aktivitást. A tálcák speciális rotor segítségével centrifugálhatók is, amely a reakció elvégzését megkönnyíti, más esetekben pedig az adheráló tulajdonsággal rendelkező célsejtek aktivitását a tálcák fenekének kivágása és direkt mérése útján határozhatjuk meg. A tálcákban jó szövettenyésztési feltételek biztosíthatók $0,5$ – 1×10^6 limfocita számára 1–6 napon keresztül is, ezért újabban a kevert limfocita kultúra [2, 3] végzése is ezen tálcák segítségével történik.

Egyes különleges vizsgálatokra, ahol optimális feltételeket szükséges

biztosítanunk, a MARBROOK [16] által kidolgozott kamra módszert alkalmazhatjuk. Ez az *in vitro* rendszer áthidalja a sejt denzitását és a sejtek által termelt faktorok eliminálásának ellentétét, mivel a tenyésztendő sejtek olyan, félig áteresztő membrán fenekű csőben vannak, amely egy nagyobb, médiumot tartalmazó edénybe merül. A módszer bonyolult és médium igényes, azonban segítségével számos *in vitro* vizsgálatot végeztek el, amelyek a korábbi tenyésztési feltételek mellett nem voltak tanulmányozhatók [21].

A diffúziós kamra technika (DT) lényege, hogy a vizsgálandó sejtek olyan, gyűrű alakú kamrába kerülnek, amelyek falát sejtet át nem eresztő membránfilterek (0,45–0,15 μ) alkotják. A sejtekkel megtöltött kamrát recipiens állatok (rendszerint egerek) hasüregébe ültetve, azok számára optimális tenyésztési feltételek biztosíthatók, mivel a kamrákat beburkoló cseplesz útján jó diffúzió alakul ki. Saját vizsgálataink mutattak rá a kiindulási sejtszám fontosságára és igazolták, hogy optimális sejtszám esetén az általunk vizsgált 6 napos periódus alatt az élő állatban lefolyó effektív sejt multiplikáció is modellezhető. Számos paraméter mozgásképesség, megtartott malignitás, letapadási készség, citosztatikumokkal szembeni érzékenység) vizsgálatával igazoltuk, hogy a diffúziós kamra módszer az *in vivo* jelenségek korrekt modellezésére alkalmas eljárás [4]. További vizsgálataink során a masztocitoma *in vitro* rendszer [9] diffúziós kamra modellezését sikerrel végeztük el. Megfigyeléseink arra az igen érdekes jelenségre is rámutattak, hogy a diffúziós kamrában indukált effektor sejtek fajlagos száma magasabb volt, mint az immunizált állatból nyerhető sejteké. Ugyancsak ezek a vizsgálatok igazolták, hogy az immunválasz maximuma a korai 4–6. napokon volt észlelhető szemben az élőben a 11–13 napi maximummal. Ennek magyarázatát elsősorban a DT különleges voltában kell keresnünk, minthogy a DT zárt rendszerként alkot az élő állaton belül. Az effektor sejté váló differenciálódása számára csak a kamrába bevitt sejtek állnak rendelkezésre, ezért valamennyi, arra képes sejt differenciálódása után az utánpótlás megszűnik (exhaustiv differenciálódás, 18). E tekintetben a DT az *in vitro* rendszerrel mutat rokonságot, ahol épp a fentiek folytán a reakciók kinetikája azonos lefutást mutat [21]. A diffúziós kamra tenyésztési módszer tehát egyesíti magában az *in vivo* és *in vitro* rendszerek előnyös tulajdonságait. Ezen tulajdonságai tették lehetővé azt, hogy e módszer segítségével különböző emberi limfoid tumorokból származó sejtek, citosztatikumokkal szembeni érzékenysége meghatározható volt [4]. Újabb vizsgálatokban a hematopoetikus őssejtek differenciálódását tanulmányozzák e technika segítségével [8].

Az *in vivo* sejtranszfer kísérletek lényege, hogy sugárzással (600–950 R) immunológiailag „üressé” tett állatokba vizsgálandó, immunológiailag aktív sejteket viszünk be. E sejtek számára lehetőség nyílik a repopulációra és a továbbiakban a recipiens állatokból nyert sejt-, illetve szérumminták alapján azok aktivitása quantitative meghatározható.

Összefoglalás

A szövettenyésztés az immunológiában mint módszer nélkülözhetlenné vált. Segítségével a különböző limfocita populációk aktivitása, a szervezet bonyolult regulációs mechanizmusaitól izolálva, in vitro vizsgálható. A limfociták sikeres tenyésztéséhez biztosítanunk kell az optimális sejtdenzitást, az állandóan termelődő faktorok eliminálását és nem utolsósorban a megfelelő médiumot. Ezen kívánalmaknak maradéktalanul csak a különleges in vitro, illetve in vivo rendszerek tesznek eleget, a reakciók leérésére alkalmazott rövid (1–6 napos) tenyésztések azonban megfelelő médiumok és szupplementálás segítségével jól kivitelezhetők. A limfoid sejtvonalak kialakítása és tenyésztése különleges eljárásokat igényel. Újabban a limfocita konzerválási technikák jól egészítik ki és helyettesítik részben a szövettenyésztési módszereket. Munkánkban röviden összefoglaltuk a limfoid sejtek jellemzőit, az immunológiai reakciók leéréséhez használt szövettenyésztési eljárásokat.

IRODALOM

1. ALGIRE, G. H., WEAWEP, J. M., PREHN, R. T.: *J. Natl. Cancer Inst.* **15**, 493 (1954).
2. BACH, F. H., HIRSCHORN, K.: *Science* **143**, 813 (1964).
3. BAIN, B., VAS, M., LOWENSTEIN, L.: *Blood* **23**, 108 (1964).
4. BENCZUR, M., PETRÁNYI, G. GY., HINDY, I., ECKHARDT, S.: in: *Aktuelle Probleme der Therapie maligner Tumoren*. Wüst, G. P. (ed.) Georg Thieme, Stuttgart 117–30 old. (1973).
5. BENCZUR, M.: A diffúziós kamra módszer vizsgálata és alkalmazásának lehetősége az immunológiai és onkológiai kutatásokban, kand. ért. Budapest (1974).
6. BIANCO, C., PATRICK, R., NUSSENZWEIG, V.: *J. exp. Med.* **132**, 702 (1970).
7. BÖYUM, A.: *Scand. J. clin. Lab. Invest. Suppl.* **21**, 51 (1968).
8. BÖYUM, A., BOECKER, W., CARSTEIN, A. L., CRONKITE, E. P.: *Blood*, **40**, 163 (1972).
9. BRUNNER, K. T., MAUEL, J., CEROTTINI, J. C., CHAPUIS, B.: *Immunology* **14**, 181 (1968).
10. CARREL, A., INGEBRIGTSEN, R.: *J. exp. Med.* **15**, 287 (1912).
11. COHRANE, C. G., DIXON, F. J.: *Adv. Immunol.* **2**, 205 (1962).
12. EVERETT, N. B., CAFFREY, R. W., RIEKE, W. O.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **113**, 887 (1964).
13. GOWAERTS, A.: *J. Immunol.* 516 (1960).
14. GOWANS, J. L.: *J. Physiol (Lond.)* **146**, 54 (1959).
15. HOWARD, J. C., SCOTT, D. W.: *Cell. Immunol.* **3**, 421 (1972).
16. MARBROOK, J.: *Lancet* **II**, 1279 (1967).
17. NORDLING, S., ANDERSONS, L., HÄYRY, P.: *Europ. J. Immunol.* **2**, 405 (1972).
18. SERCARZ, E., COONS, A. H.: in: *Mechanisms of Immunological Tolerance*, M. Hasek, A. Lengerová, M. Vojtisková (eds.) Academia, Prága 73. old. (1962).
19. STEVENS, K. M., MCKENNA, J. M.: *J. exp. Med.* **107**, 537 (1958).
20. TAKASUGI, M., KLEIN, E.: *Transplantation* **9**, 219 (1970).
21. WAGNER, H.: *Science* **181**, 1170 (1973).