

## AZ IMMUNRENDSZER BOKÉMIÁJA

ANTONI FERENC, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1977. XI. 17.

Az élő szervezet homeostázis állapotának egyik előfeltétele az immunogénekre adott válaszreakció, amelyben humorális és celluláris tényezők szerepelnek. Az immunválaszt az egész szervezetet behálózó immunrendszer (nyirok-szervek, nyirokkeringés) biztosítja.

A humán populáción belül az immunválasz-reakcióra az egyediség végtelen variabilitása a jellemző. Ennek megfelelően, igen csekély annak a valószínűsége, hogy két egyén immunológiailag teljesen azonos. Sőt egyetlen ma élő individuum sem azonos egyetlen más, a történelemben korábban élt egyénnel (Burnet 1969).

Az immunrendszer humorális faktorai a specifikus ellenanyagok, az immunoglobulinok (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) és nem specifikus anyagok, a komplement, a lizozim, illetve más komponensek.

A celluláris komponensek a B- és T-lymphocyták, továbbá a makrofágok. Az említett háromféle sejt — jelenlegi ismereteink szerint — kooperatív együttműködése szükséges feltétele az immunválasz-reakciónak.

A B-lymphocyták szerepe az ellenanyag szintézisben van. Az ellenanyag szintézisre már elkötelezett lymphocyták specifikus ellenanyagot termelnek. Más szóval egy lymphocyta *egyetlen immunogénnel* szemben termel csak ellenanyagot.

A B-lymphocyta potenciálisan ellenanyag termelő sejt. A felületén elhelyezkedő nagyszámú receptor és az immunogén közötti kapcsolat szükséges ahhoz, hogy a B-lymphocyták ellenanyag termelő kapacitása fokozódjon. Ezt a folyamatot minden esetben a sejt osztódása előzi meg. Az „immun-memória” egy adott immunogénre sejtről sejtre osztódással közvetítődik. A sejtek az ellenanyagot a vérplazmába, ill. lokálisan szekretálják az immunogén lokalizációjának megfelelően, pl. nyálkahártyák felszíne.

A T-lymphocyták (thymus eredetű) funkciója és szerepe sokkal gazdagabb, mint a B-lymphocytáké (Paul és Benacerraf 1977). A T-sejt felületén a hisztokompatibilis antigéneknek kívül az ún. theta-antigén a jellemző. A theta-antigén tulajdonságot a T-sejtek a thymusban szerzik meg. A thymusban termelődött thymosin hormon szabályozó szerepet játszik a T-sejtek képződésében.

A T-sejt szabályozó szerepet lát el a B-sejtek funkciójában. „Helper-funkció” ha a T-sejt az ellenanyag képződését a B-sejtben elősegíti. Szupresszor szerepet tölt be a T-sejt, ha az ellenanyag termelést gátolja. A T-sejt egy további funkciója az idegen sejt elpusztítása („killer” sejt).

A T-sejtek ezenkívül különböző immunaktív anyagokat termelnek és szekretálnak a környezetbe, amelyek az immunrendszer más sejtjeinek viselkedését befolyásolják; ilyen a migrációt gátló faktor (MIF), és egyéb más citotoxikus hatású anyag szintézise. A T-sejtek kevésbé adherens sajátosságúak, mint a B-sejtek, erre utal a sejt felszínükön is kimutatható különbözőség. A T-sejtek a felszínükön képesek eritrocytákat kötni, ez az ún. „rosetta képződés”, amely a T-sejtek viszonylag könnyű identifikálását teszi lehetővé.

Részletesen nem ismertek a T-sejtek funkciójával kapcsolatos biokémiai folyamatok, továbbá, hogy milyen antigén szerkezetbeli különbség az, amelyet a T-sejt még képes felismerni. Nincs pontos információnk arról sem, hogy a T-sejt milyen mechanizmus alapján befolyásolja a B-sejt ellenanyag termelését.

A lymphocytákkal kapcsolatban meg kell említeni, hogy a keringésben levő lymphocyták mitogének hatására in vitro osztódásra stimulálhatók (phytohaemagglutinin, concanavalin A stb.). Egy további tulajdonságuk, hogy a szervezetből kivett lymphocyták visszaadásakor az ún. „homing” jelenséget mutatják, visszajutnak abba a szervbe, amelyből a sejteket kinyerték.

Az immunválasz reakcióban részt vevő további igen jelentős sejt típus a makrofág. A makrofágok specifikus szerepéről az immunválasz reakcióban még viszonylag keveset tudunk, annak ellenére, hogy az anyagcseréjüket (Köteles és mtsai 1962, Várterész és mtsai 1963), fagocita funkciójukat az elhelyezkedésüktől függően is (alveoláris, peritoneális) többen vizsgálták. Annyit biztosan állítani lehet, hogy a makrofágok nélkül ellenanyag-termelés nem lehetséges. A T- és B-lymphocyták és a makrofágok közötti kooperáció feltétele az azonos hisztokompatibilitás: „azonos felületi antigének”. Ez jelenti a megfelelő makromolekuláris kapcsolatrendszer, amely előfeltétele a funkcionális együttműködést szabályozó anyagok termelésének, így pl. az ellenanyag-termelés, vagy azok szintézisének gátlása a B-sejtekben.

Az elmondottak jöllehet sejtek közötti kooperációra vonatkoznak, *a valósághoz mégis közelebb áll az immunválaszt a makromolekuláris rendszerek közötti kapcsolatként értelmezni.* Az immunogén és a sejt receptor közötti kapcsolat létrejötte indítja el a sejt replikációt, a makromolekulák (fehérje, RNS és DNS) szintézisét, az ellenanyag, az immunglobulin molekulák fokozott szintézisét. Az ellenanyag-szintézis szabályozásának további vizsgálata és megismerése szempontjából látszik előnyösebbnek makromolekuláris kapcsolatrendszerként értelmezni az ellenanyag szintézist, illetve a szintézist indukáló folyamatot (Nossal, 1975).

Az ellenanyag háromdimenziós térszerkezeti felépítése meglehetősen részletezéssel ismert, ami az ellenanyag és az immunogén közötti kapcsolat jobb

megértését is lehetővé teszi. Az ellenanyag-szintézisre vonatkozólag még sok kérdés vár megválaszolásra. Az ellenanyag molekula genetikai kódja erősen vitatott, különösen a polipeptid láncok variábilis részét illetően. Keveset tudunk az ellenanyag-szintézis szabályozásának és az ellenanyag szekréciónak mechanizmusáról. Az utóbbival kapcsolatban az ún. „szignál-peptid”, vezető peptideknek tulajdonítanak jelentőséget (Schechter 1977).

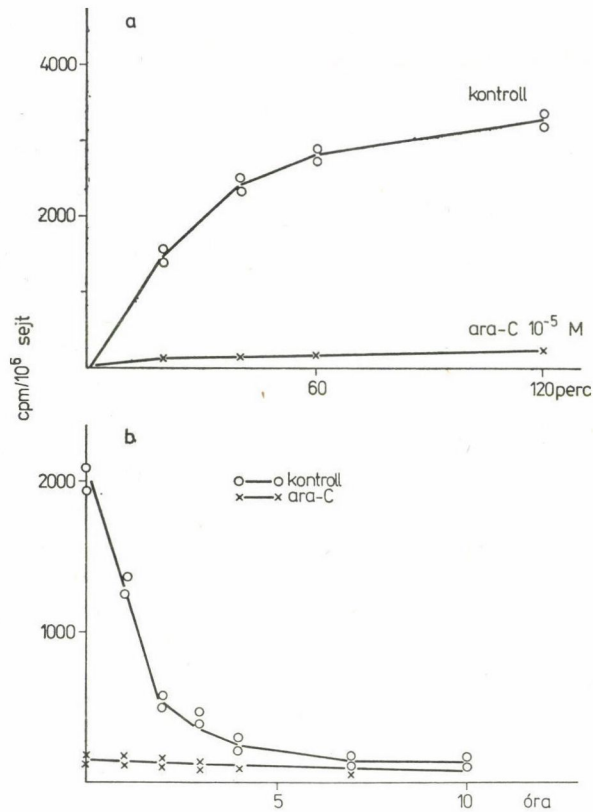
Az ellenanyag katabolizmusa, annak helye még szintén tanulmányozásra váró terület.

Az előzőekben felvetett problémák ismeretében tanulmányoztuk a lymphoid szervek biokémiáját. Kísérleti modelljeink humán lymphocyták, amelyek a tonsilla palatinából (a műtéti eltávolítást követően), illetve colostrumból kinyert lymphoid sejtek (Antoni és mtsai 1977, Antoni és Staub 1978).

A humán tonsillából a sejtek kinyerését részletesen más helyen ismertettük (Piffkó és mtsai 1970). A tonsilláris lymphocyták összetételének főbb jellemzőit, a sejtek DNS—RNS és fehérje tartalmát ugyancsak részletesen ismertettük. Ezek közül utalni kívánunk arra, hogy az RNS—DNS arány a tonsilláris lymphoid sejtekben 1,0 érték alatt van. A DNS tartalom a vizsgált sejtekben nagyobb, mint az RNS, amely általában jellemző a nyiroksejtekre (Antoni in press).

A tonsilláris lymphocyták egyik eltérő tulajdonsága a perifériás lymphocytáktól éppen abban van, hogy stimuláló anyag hozzáadása nélkül képesek in vitro timidin felvételére.

A tonsilla lymphocyta populáció kb. 14–20%-a  $^3\text{H}$ -timidint tartalmaz az izolált DNS-ben, amelyet a lymphoblastoknak tulajdonítunk. A stimulálás feltehetően már in vivo következett be, ami a tonsilla regionális helyzetével a külső környezetből származó lokális antigén hatására történik. A sejtek timidin felvételét mutatja az 1. ábra. Vizsgálatainkban arabinozil-citozint használtunk, amelyről ismeretes, hogy csak az eukariotákban folyó DNS szintézisét gátolja (Staub és mtsai 1972). Amennyiben a rendszer ilyen körülmények között timidint inkorporálna a DNS-be az a baktériumok jelenlétére utal. Az arabinozil-citozin jelenlétében nem észleltünk timidin inkorporációt. Ennek megfelelően a  $^3\text{H}$ -timidin inkorporációt a lymphocyták DNS-szintézisének kell tulajdonítani. A lymphocyták  $^3\text{H}$ -timidin inkorporációja a tenyésztés során rohamosan csökken, 5–10 órán belül megszűnik. Ezzel egyidejűleg a heterogén populáció homogén, csak kis lymphocytákból álló sejtekké alakul. A sejtek átlagos átmérőjének változását mutatja a 2. ábra PHA-val stimulált és kontroll sejt kultúrákban. Az izolálás után  $13\ \mu\text{m}$  a sejtek átlagos átmérője, ami 10 óra után  $6\ \mu\text{m}$ -re csökken. Ezzel párhuzamosan változik a  $^3\text{H}$ -timidinnel jelzett sejtek száma is. Ha PHA-val stimuláljuk a kultúrákat az átlagos sejt átmérő ismét nő (Staub és mtsai 1976). A szintézis és a sejt átmérő csökkenését azok DNS polymeráz aktivitásának csökkenése is kíséri (3. ábra). A PHA-hatására a  $^3\text{H}$ -timidin inkorporáció, a sejt átmérő és a DNS-polymeráz aktivitás is nő.



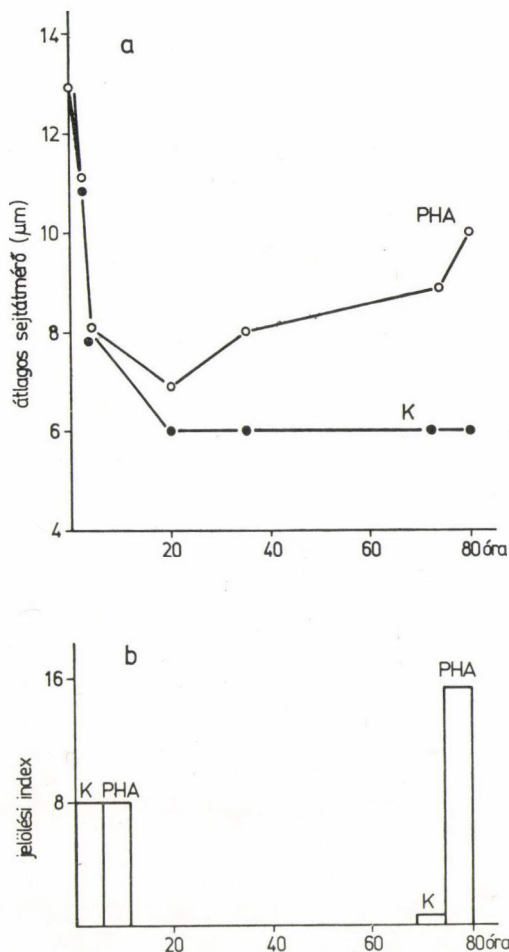
I. ábra. <sup>3</sup>H-timidin inkorporáció változása időben és gátlása arabinozil-citozinnal rövid és hosszabb idejű sejt kultúrákban.  
(a: folyamatos — b: szakaszos jelzés)

Azt, hogy a heterogén tonsilla lymphocytá populációban milyen sejtekben folyik DNS-szintézis, a különböző sejtek elválasztása után tudtuk eldönteni.

Diskontinuuous szérum albumin gradiens alkalmazásával a tonsillából nyert sejteket fajsúlyuk alapján frakcionáltuk. A különböző sejt-frakciókban mértük a timidin inkorporációt, valamint a sejtek DNS-polimeráz aktivitását, ami párhuzamosan kell hogy változzon a DNS-szintézissel. Vizsgálatainkat mutatja a 4. ábra; amelyből látható, hogy a lassan ülepedő sejtekben mind a két érték magasabb, mint a gyorsan ülepedő (kis lymphocytá) frakcióban (Staub és mtsai 1975).

#### Extra-celluláris DNS

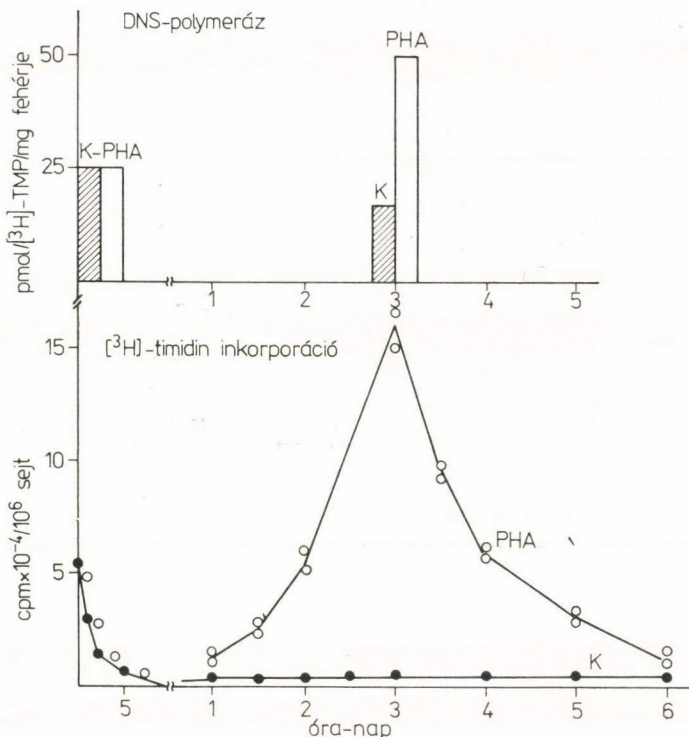
Több szerző vizsgálatainak eredményeiből ismert, hogy phytohaemagglutininall stimulált lymphocytákból DNS exkretálódik a médiumba, amely — mint savban nem oldódó frakció — kinyerhető. Ezt a jelenséget humán



2. ábra. Átlagos sejtméret és jelölési index változása a tenyésztés alatt.

perifériás vér lymphocyták in vitro PHA-val végzett stimulálásakor figyelték meg, a sejtek kiülepítése után a felülúszóban DNS-t találtak (Rogers és mtsai 1972, Rogers 1976). Korábbi vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a humán tonsilla lymphocyták citoplazmájából, illetve a sejtmembránból DNS izolálható (Baló-Banga és mtsai 1973).

Abban az esetben, ha a frissen izolált tonsilla lymphocytákat  $^3\text{H}$ -timidinnel 60 percig jeleztük, majd a sejteket friss tápfolyadékba vittük, a sejtekben csökkent az 5%-os TCA-val kicsapható radioaktivitás. Ezzel arányosan emelkedett a tápfolyadékban a savval kicsapható radioaktivitás (5. ábra). A sejtek felülúszójába jutott  $^3\text{H}$ -timidinnel jelzett anyag DNS-nek bizonyult, amelyet hidroxylapatit oszlopon tisztítottunk (6. ábra). A savban nem oldódó

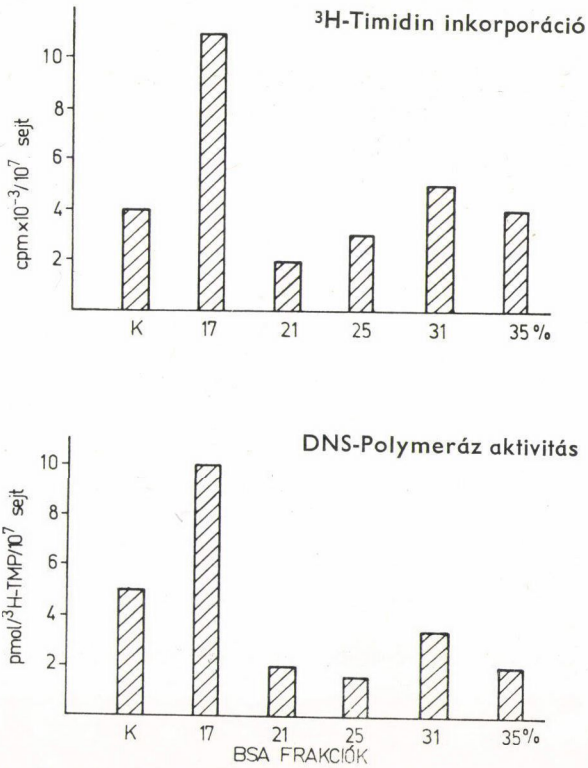


3. ábra. Tonsilla lymphocyták stimulálása PHA-val és DNS-polymeráz aktivitása.

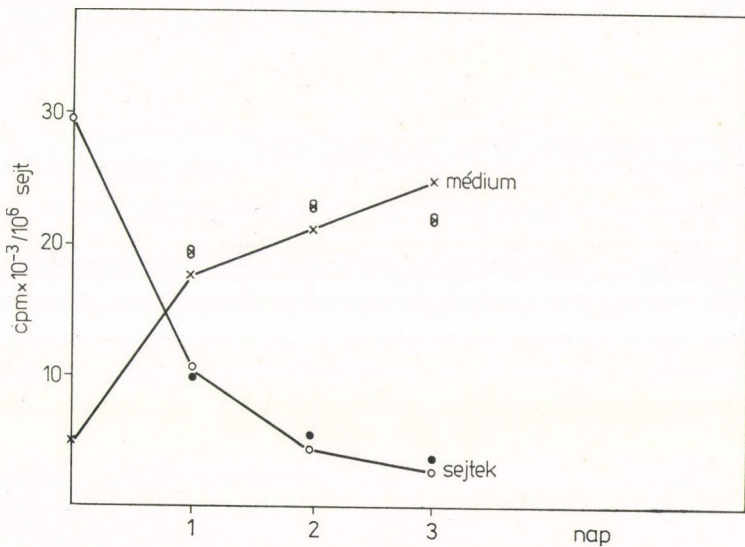
<sup>3</sup>H-timidin tartalom 70–80%-a kettősszálú DNS-nek bizonyult. A tisztított DNS jellemző fényelnyelési adata:  $260/280 = 2,15$ .

Az a tény, hogy a sejtek által újonnan szintetizált DNS-savban nem oldódó formában izolálható volt a felülúszóból, arra utalt, hogy nem a sejtek széteséséből, sejt pusztulásból származik. Ezt megerősíti az, hogy <sup>14</sup>C-valinnal és <sup>3</sup>H-uridinnel jelezve a sejteket lényegesen kevesebb jelzett anyag jut a tápfolyadékba (7. ábra), mint a DNS-jelzés esetében. A sejt nagyságának a változásában talált megfigyeléseinkkel jól megegyeznek a DNS-exkrécióval kapcsolatos adataink. A DNS leadása más sejtek esetében is ismert, amelyek differenciálódással specializálódnak. Ilyen például a retikulocitákból a vörösvértestek magvatlan alakjainak a kialakulása emlősök esetében.

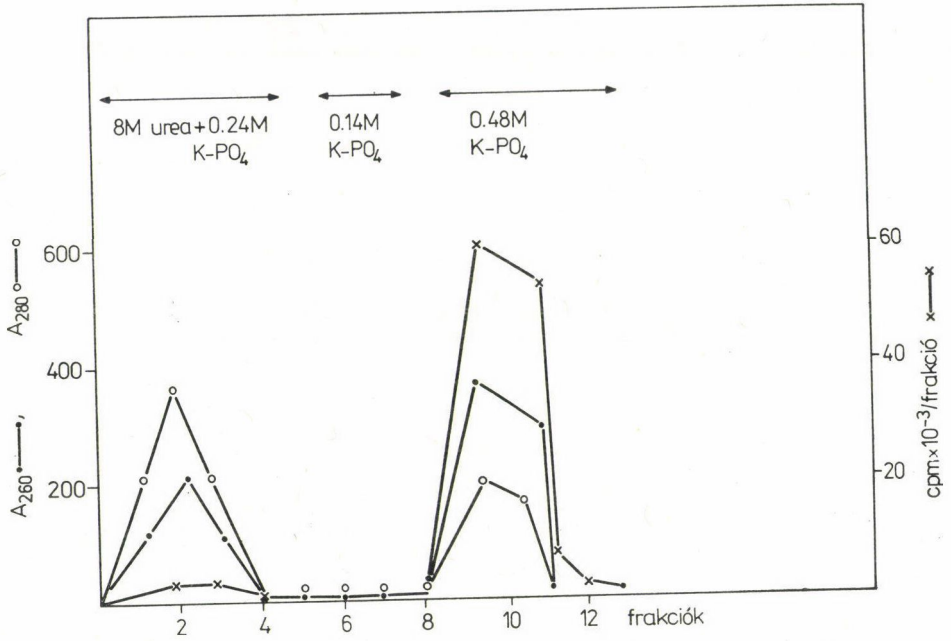
A blast állapotú sejteknek nyugvó sejtekké történő átalakulása feltételezhetően annak a DNS szakasznak a kilökődésével jár, amelynek szabályozó, esetleg iniciáló szerepe lehet a replikációban. Felmerül és tetszetősnek látszik az a magyarázat is, hogy esetleg az ellenanyag-szintézishez szükséges genom transzferálódik más sejtekbe, propagálva ezzel az antitest-szintézist, amely ezen az úton nem direkt, csak az antigén hatására történne. Ez a feltételezés az ellenanyag-szintézisnek azt a hipotézisét támogatná, amely szomatikus mutációként magyarázza az antigén hatására bekövetkező sejtosztódást.



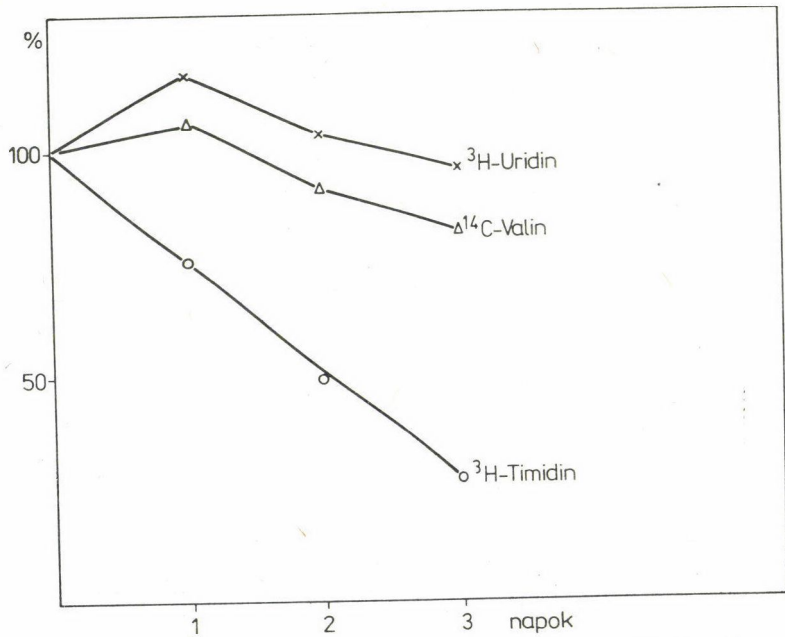
4. ábra. A frakcionált sejtek <sup>3</sup>H-timidin inkorporációja, és DNS-polymeráz aktivitása.



5. ábra. <sup>3</sup>H-timidinnel jelzett DNS exkréciója a tonsilla lymphocytá-tenyésztésben.



6. ábra. A tápfolyadékba jutott DNS kromatográfiája hidroxylapatit oszlopon.



7. ábra. A <sup>3</sup>H-timidin, <sup>3</sup>H-uridin és <sup>14</sup>C-valin jelzés sorsa a tonsilla lymphocytákban.



*Tonsilláris T- és B-lymphocyták*

A tonsilla lymphocyta populációban a T- és B-sejtek arányát több szerző tanulmányozta. A lymphocyták többsége a tonsillában — szemben a perifériás vérrel — B-lymphocyta. Táblázatban mutatjuk be a perifériás vér, a tonsilla és az appendixből izolált B és T sejtek százalékos előfordulását, amely adatokat saját vizsgálatainkkal is megerősítettünk.

I. táblázat

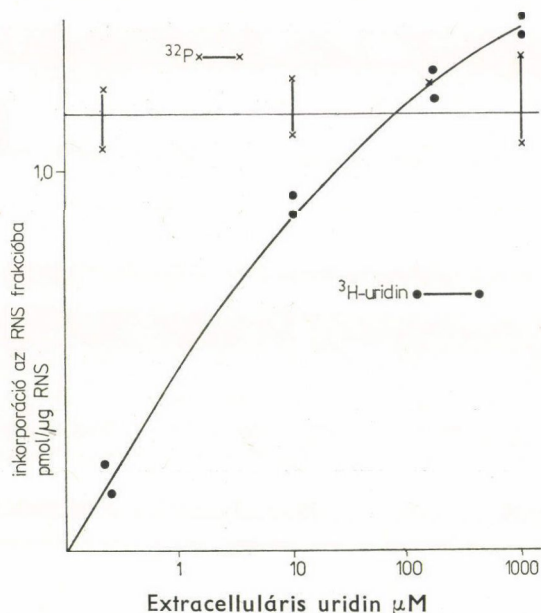
	Perifériás vér	Tonsilla	Appendix
	%		
B lymphocyta*	12,2	56,7	51,5
T lymphocyta**	50,0	23,6	27,9

C. Alexopoulos, A. G. Papayannis and C. Gardikas: Acta haemat. 55. 95—98 (1976).

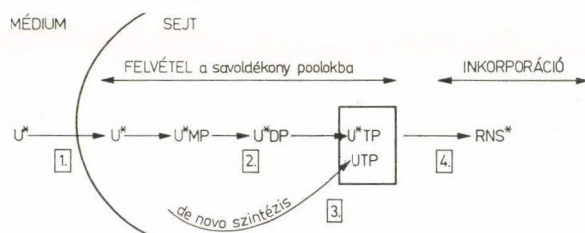
\* B lymphocyták átlagértéke EAC-rozettaképzés alapján

\*\* T lymphocyták átlagértéke spontán-rozetta-képzés alapján.

A lymphocyták stimulálására, a stimuláció követésére általában a timidin felvételt alkalmazzák. A szövet- és szervátültetéssel kapcsolatos gyakorlati igények sürgetően vetették fel, hogy rövid időn belül, de megbízható információk alapján az átültetés lehetőségéről döntést kapjon a felhasználó. A timidin felvétel helyett ezért — amely legalább 72 órás tenyésztési időt igényel — az uridin felvételt, az uridin inkorporációt kísérelték meg erre a célra felhasználni. Ez a vizsgálati rendszer lényegesen rövidebb időn belül ad értékelhető eredményt. Mitogénekkal történt stimulációknál már egy óra után fokozódik az uridin felvétel. Így a kevert rendszerekben (donor + acceptor) is várható volt, hogy a diagnózis felállításához szükséges adatok lényegesen rövidebb időn belül állnak a szövetátültetéshez rendelkezésre. A kevert kultúrákban a donor és az acceptor kölesönhatása az uridin inkorporáció alapján is megbecsülhető. Ahhoz azonban, hogy ezt az eljárást megbízhatóan alkalmazni lehessen, az uridin-felvétel, az uridin-transzport, illetve az ezeket befolyásoló tényezőket szükségesnek látszott pontosítani. Annál is inkább, mert újabban egyes szerzők az uridin felvételét a T- és B-sejtek elkülönítésére is megfelelőnek tartják (Hollingsworth és Carr, 1973, Scott és Josephs, 1975). Saját vizsgálatainkban az uridin transzportot, mindenekelőtt az uridin-felvétel és az RNS-be történő inkorporáció körülményeit és ezek összefüggését tartottuk indokoltnak vizsgálni. Azt találtuk, hogy a tonsilla lymphocyták <sup>3</sup>H-uridin inkorporációját a tápfolyadék uridin-tartalma erősen befolyásolja. Az extracelluláris uridin-koncentráció növelésekor az RNS-be történő beépülés



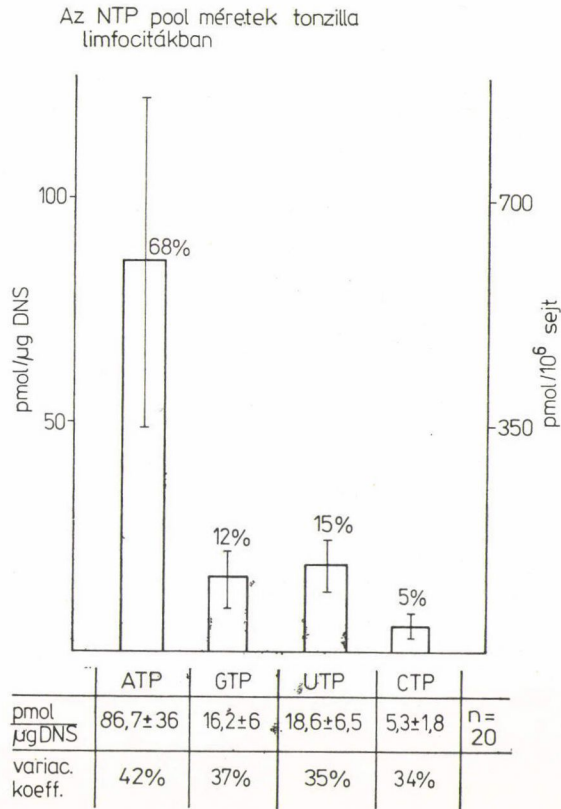
8. ábra. A  $^3\text{H}$ -uridin és a  $^{32}\text{P}$  inkorporáció függése az extracelluláris uridin koncentrációtól.



9. ábra. A lymphocyták által felvett  $^3\text{H}$ -uridin sorsa.

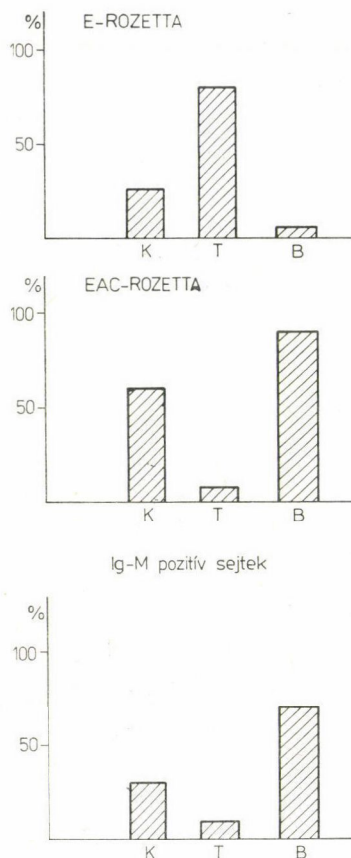
és a transzport fokozódik (8. ábra, Sasvári és mtsai 1975). Ez a kísérlet azt mutatta, hogy a  $^3\text{H}$ -uridin inkorporációból nem lehet az RNS-szintézisre következtetni, szükségessé vált az RNS közvetlen prekursorainak a ribonukleotid trifoszfátok koncentrációjának a meghatározása (9. ábra). Gyors és specifikus módszert dolgoztunk ki a lymphocyták ribonukleotid trifoszfát pooljának mérésére (Sasvári és mtsai 1975). Az RNS-polimeráz tesztel a tonsilla lymphocyták ATP, UTP, GTP és CTP tartalmát lehet meghatározni, amelyet a 10. ábrán tüntettünk fel. Az UTP sejten belüli koncentrációjából és annak a specifikus radioaktivitásából kiszámolható a sejtek DNS szintézisének a sebessége.

A tonsilla lymphocyták 18,6 pmol UTP-t tartalmaznak  $\mu\text{g}$  DNS-re vonatkoztatva. Vizsgálati eredményeink alapján  $10^6$  sejt 160 pmol UTP-t és 680 pmol ATP-t tartalmaz. Az utóbbi adat jól megegyezik az ún. Luciferáz-módszerrel kapott meghatározások eredményeivel.



10. ábra.

Az irodalomban található adatok alapján (Hollingsworth és Carr, 1973, Scott és Josephs, 1975) a T-lymphocyták több uridint inkorporálnak, mint az ellenanyag-termelésért felelős B-lymphocyták. Korábbi vizsgálataink szerint azonban a sejtek <sup>3</sup>H-uridin inkorporációját meglehetősen sok körülmény befolyásolja, amelyeknek az elhanyagolása téves következtetésekre vezethet. A tonsilla lymphocytákat nylon gyapot oszlopon T- és B-frakcióra szeparáltunk. A nem adherens frakció 75%-a T-sejt és 6,5%-a B-sejtet tartalmazott, míg a gyengén kötődő frakció, amelyet a nylon gyapotról mechanikusan le tudtunk rázni 6% T- és 60% B-, illetve egyéb sejtet tartalmazott. AT- és B-sejteket az E és az EAC rosetta, illetve anti-IgM kötés alapján identifikáltuk (11. ábra). Az irodalmi adatokkal ellentétben a tonsilla lymphocyták B-sejtekben gazdag frakciójában háromszor nagyobb volt a <sup>3</sup>H-uridin-felvétel és inkorporáció, mint a T-sejt frakcióban (12. ábra). A két frakció <sup>3</sup>H-timidin inkorporációját és DNS polimeráz aktivitását is összehasonlítottuk, ahol szintén a B-sejt frakció bizonyult aktívabbnak (12. ábra). Ha azonban a két frakciót PHA-val stimuláljuk, akkor 24 óra múlva a korábban kevésbé aktív T lymphocyták

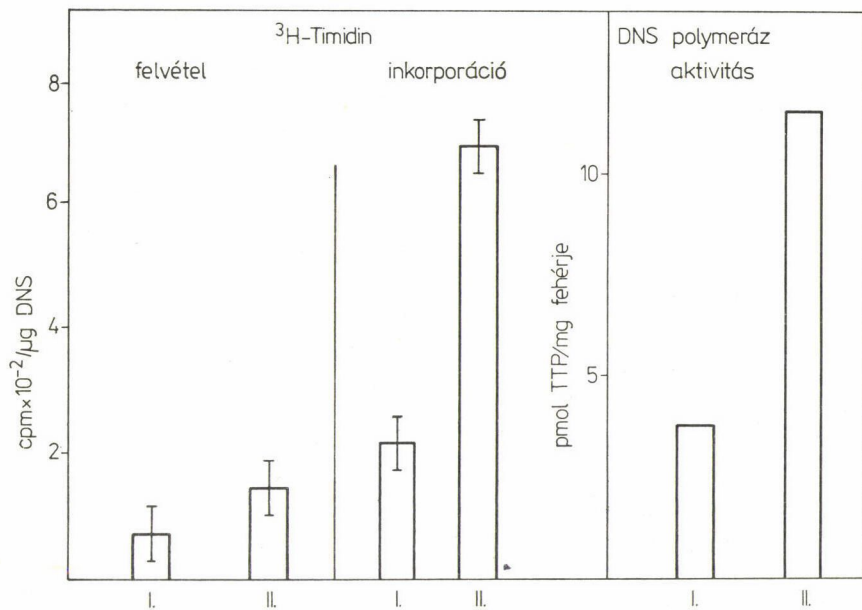


11. ábra. Nylon gyapot oszlopon szeparált tonsilla lymphocytá frakciók. T: nem adherens sejtek, B: adherens sejtek, K: kiindulási sejtek.

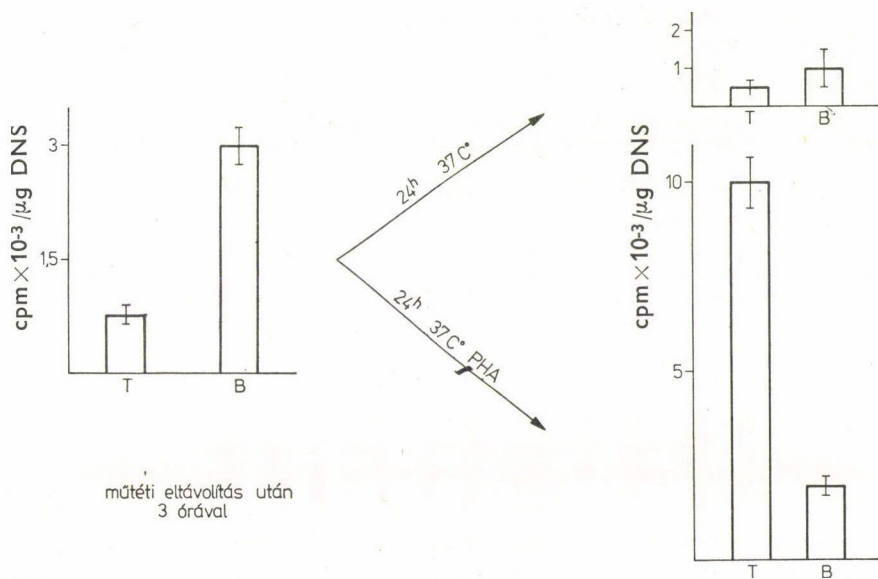
fognak több  $^3\text{H}$ -uridint felvenni (13. ábra). Kísérleteinkből egyértelműen látszik, hogy a  $^3\text{H}$ -uridin felvétel és inkorporáció nem alkalmas a T és B lymphocyták megkülönböztetésére. Annak értéke a sejtek aktivált állapotától függ. A tonsillában a B lymphocyták aktiváltak elsősorban, PHA hatására pedig a T lymphocyták aktiválódnak (13. ábra). A sejtekben mért  $^3\text{H}$ -uridin felvétel jól megegyezik a savoldékony pool  $^3\text{H}$ -UTP tartalmával, ami szintén háromszor magasabb a B lymphocytá frakcióban frissen izolált sejtek esetében.

#### *A tonsilláris T- és B-lymphocyták sugárérzékenysége*

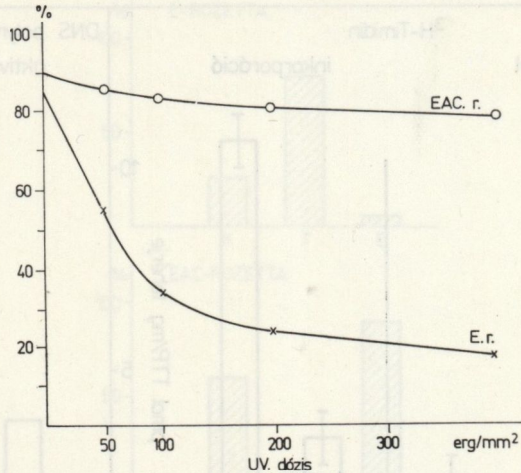
A lymphocytákról ismert, hogy ultraibolya fény (UV.) hatására a DNS-ben bekövetkezett károsodásokat a sejtek képesek helyreállítani (repair). Vizsgálatainkban a T- és B-sejtek UV.-érzékenységét vizsgáltuk, hogy a kétféle



12. ábra.  $^3\text{H}$ -timidin inkorporáció és DNS-polymeráz aktivitás a nylon gyapot adherens (II) és nem adherens (I) szubpopulációkban.



13. ábra.  $^3\text{H}$ -uridin inkorporáció tonsilla lymphocytá szubpopulációkban (sejtszeparálás nylon gyapot oszlopon).

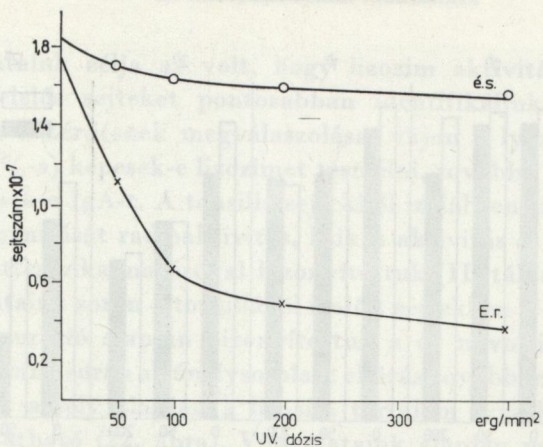


14. ábra. UV.-fény hatása a T- és B-lymphocyták E- és EAC-rosettaképző kapacitására.

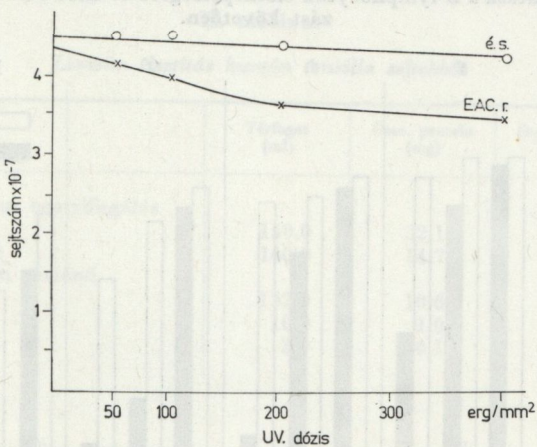
lymphocyták között található-e karakterisztikus különbség. Greaves és Brown (1974) által leírt, és kísérleteink alapján módosított (Csuka és mtsai 1976) sejt elválasztási eljárással T- és B-sejteket szeparáltunk. A szeparált sejteket különböző dózisu UV.-sugárral kezeltük. A sérülések kimutatására a membránreceptorok vizsgálatát használtuk; a T-lymphocyták erythrocyta-kötőképességét (E rosetta), ill. a B-lymphocyták  $C_3$  receptorának változását (EAC-rosetta). Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy 50–200  $\text{erg/mm}^2$  UV.-sugárzás jelentősen csökkentette a T-lymphocyták rosettaképző képességét és alig befolyásolta a B-lymphocyták EAC-rosetta képzését (14. ábra). A sejtek életképessége közvetlenül a besugárzást követően nem változott (15, 16. ábra). A T- és B-lymphocyták túlélése a besugárzást követően 1,–2,–12 óra múlva azonos arányú volt (17. ábra). Az élő sejtekre vonatkoztatott rosettaképző sejtek száma a T-lymphocyták esetében jelentősen csökkent (18. ábra). A B-lymphocyták esetében változást nem vagy alig tudtunk kimutatni (19. ábra). A vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy a T-sejtek felületén a rosettaképzésért felelős receptor UV.-fény hatására érzékenyebb, mint a B-sejtek EAC receptora (Csuka és mtsai 1977).

#### *Tonsilláris lymphocyták lizozim termelése*

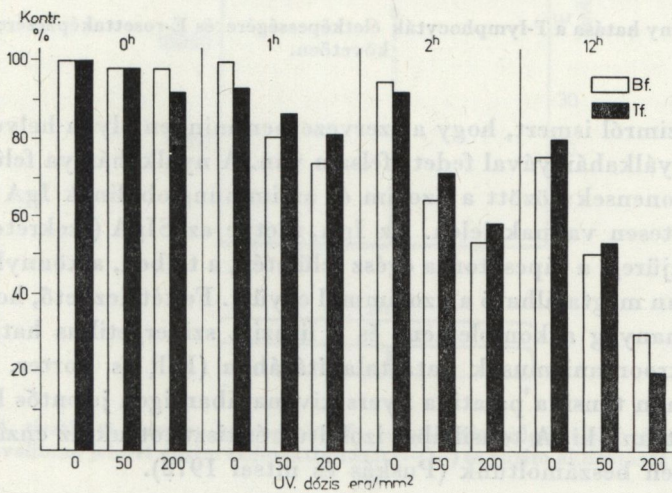
Mint már említettük, az immunválasz reakcióban specifikus és aspecifikus tényezők szerepelnek. Az aspecifikusak közül a baktericid hatású lizozim az egyik jelentős komponens. A lizozim (EC 3.2.1.17) a Gram pozitív baktériumok sejt falában levő N-acetyl muraminsav és N-acetyl glukozamin közti  $\beta 1 \rightarrow 4$  kötést bontja, és ezzel egyidejűleg a kórokozót elpusztítja.



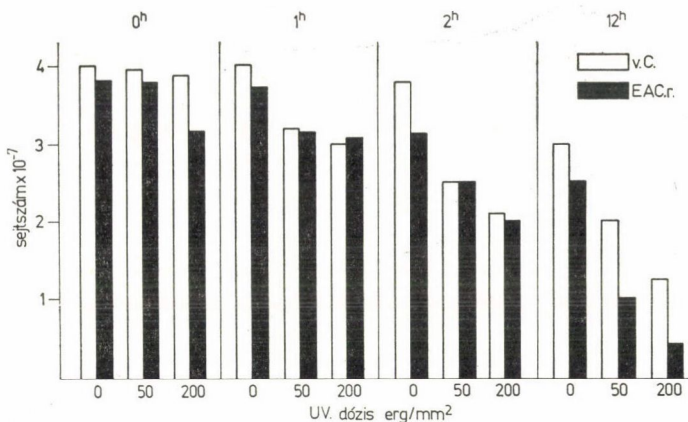
15. ábra. UV-fény hatása a T-lymphocyták életképességére, és E-rosetta képzésére.



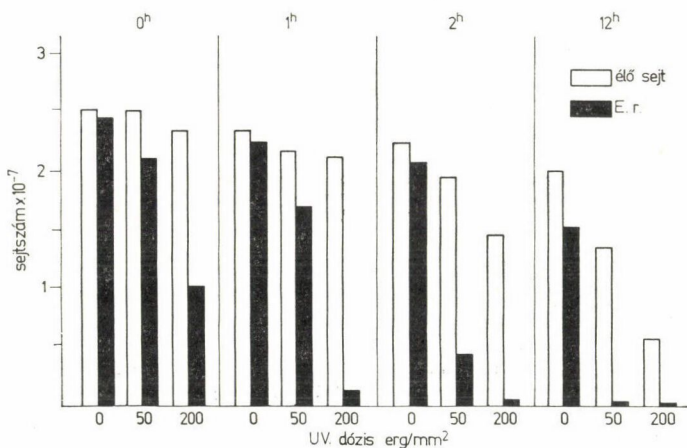
16. ábra. UV-fény hatása a B-lymphocyták életképességére és EAC-rosetta képzésére.



17. ábra. UV-fény hatása a T-és B-lymphocyták életképességére a besugárzást követően.



18. ábra. UV-fény hatása a B-lymphocyták életképességére és EAC-rosettaképzésére a besugárzást követően.



19. ábra. UV-fény hatása a T-lymphocyták életképességére és E-rosettaképzésére a besugárzást követően.

A lizozimról ismert, hogy a szervezetben minden olyan helyen megtalálható, ahol nyálkahártyával fedett felszín van. A nyálkahártya felületére szekretált komponensek között a lizozim és az immunglobulinok IgA típusa általában együttesen vannak jelen. Az IgA, illetve az SIgA (szekretorikus ellenanyag) a szájüreg, a tápcsatorna egész felületén, a tejben, a könnyben és egyéb szekrétumban megtalálható a lizozimmal együtt. Feltételezhető, hogy a szekretorikus ellenanyag a komplement és a lizozim szinergetikus hatású a Gram negatív mikroorganizmusok hatástalanításában (Hill és Porter, 1974).

A humán tonsilla palatina nyers kivonatában igen jelentős lizozim aktivitást mutattunk ki. A tonsillából izoláltuk és tisztítottuk az enzimet, amelyről részletesen beszámoltunk (Puskás és mtsai 1972).



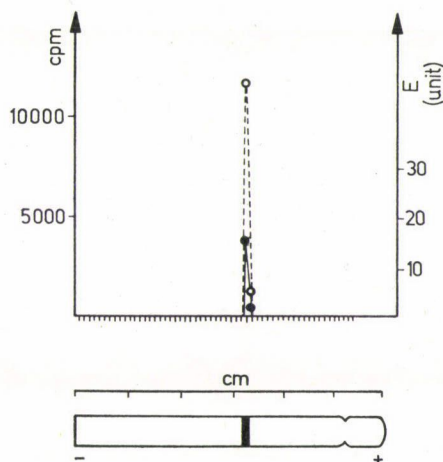
Vizsgálataink célja az volt, hogy lizozim aktivitást, illetve a lizozim szintéziséért felelős sejteket pontosabban identifikáljuk. Mindenekelőtt felmerült annak a kérdésnek megválaszolása, vajon a lymphocyták (a tonsilla sejtek 95–97%-a) képesek-e lizozimet termelni, továbbá a lizozim szintetizáló sejtek termelnek-e IgA-t. A tonsilla sejtekből izolált enzimet tisztítottuk, és a lizozim homogenitását radioaktivitás, litikus aktivitás és disc elektroforetikus módszer együttes alkalmazásával bizonyítottuk (II. táblázat, 20. ábra).

Vizsgálataink során a tonsillából izolált sejtekben U-14-C-valin lizozimbe történő inkorporáció alapján bizonyítottuk a de novo lizozim szintézist (21. ábra). Kísérleteink során az ún. lyso-plate eljárás tovább fejlesztésével módszert dolgoztunk ki, amely alapján a lizozim tartalom lymphocytákban egy-sejtszinten kimutatható (22. ábra). Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy

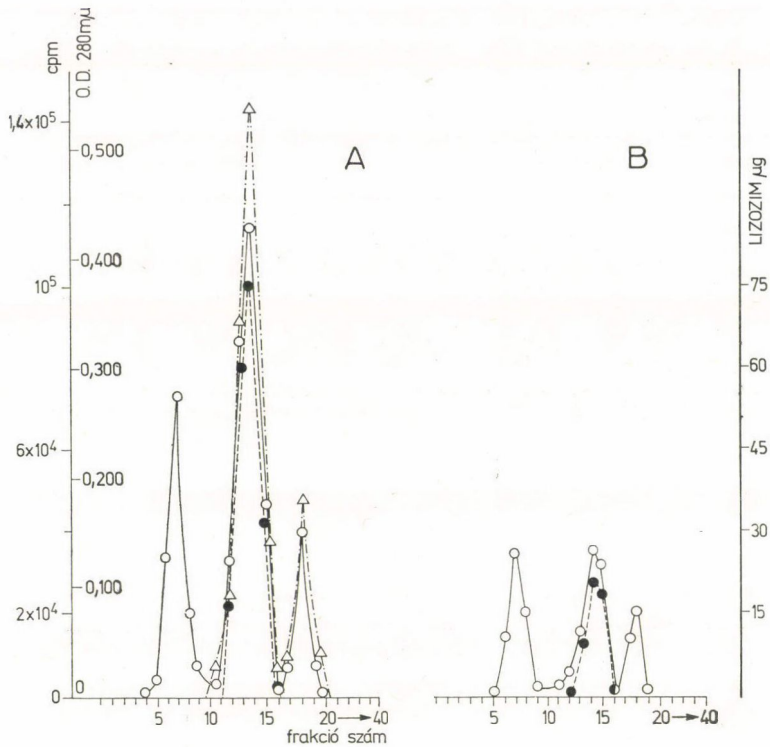
## II. táblázat

### Lizozim tisztítás humán tonsilla sejtekből

Enzim tisztítási lépések	Térfogat (ml)	Össz. protein (mg)	Össz. lizozim (unit)	Specifikus aktivitás (U/mg)
Sejt homogenizátum centrifugálás után	150,0	32,10	225,0	7,50
Felülúsó (pH 4,5)	140,0	14,70	182,5	12,41
Felülúsó 100 °C-on történő kezelés után	132,0	10,62	132,0	12,45
Amberlite IRC-50	10,0	1,00	120,0	120,0
Bio Gel P-10	3,0	0,15	110,0	733,33



20. ábra. A tisztított lizozim homogenitását polyakrylamidgél elektroforézissel vizsgáltuk. Az U-14-C-valinnal jelzett enzim radioaktivitását (--O--) és enzim aktivitását (—●—) tüntettük fel.

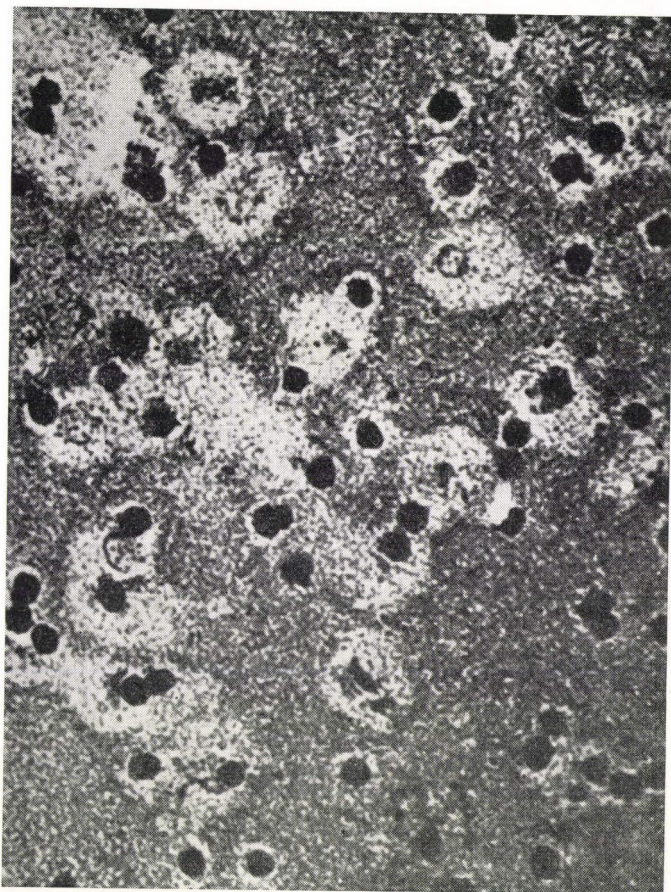


21. ábra. Lizozim tisztítás Bio Gel P-10 oszlopon. A tisztított enzimet az oszlopról eluáltuk és az egyes frakciók radioaktivitás (---Δ---), lizozim aktivitás (-●-) és O. D. 280  $m\mu$  (-O-) értékeit tüntettük fel. (A = kontroll, B = 1 mM cycloheximiddel kezelt.)

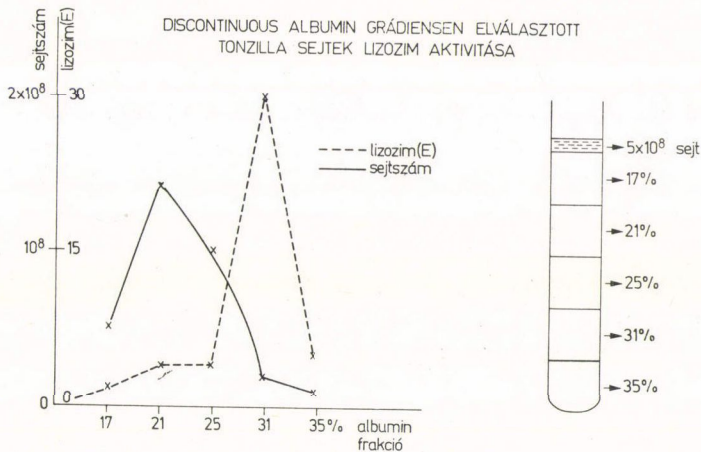
a tonsilla lymphocyták *de novo* szintetizálnak lizozimet (Antoni és Puskás, 1974, Puskás és mtsai 1975).

A lizozim szintézisért egy meghatározott lymphocytá szubpopuláció felelős (Puskás és mtsai 1975, 1976). Ezt a szubpopulációt a tonsilla lymphocytákból szérumentes üvegyapoton történő adherencia alapján sikerült szeparálni (III. táblázat). A lizozimet termelő sejtek nem adherensek az üvegyapothoz. Az oszlopról az első átfolyó frakcióban izoláltuk. A lizozimet szintetizáló, ún. „L lymphocytá” szubpopuláció discontinuous albumin grádiens centrifugálással is elkülöníthető a tonsillából izolált más sejtektől (23. ábra, Puskás és mtsai 1975).

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a tonsilláris lymphocyták egy szubpopulációja lizozimet termel, ellentétben a perifériás vérben levő lymphocytákkal, amelyekről az irodalmi adatok alapján ismert, hogy lizozimet nem szintetizálnak. A lizozimet szintetizáló lymphocytákban mérhető lizozim tartalom nem elhanyagolható a granulocytákban és monocytákban talált lizozim tartalomhoz viszonyítva (IV. táblázat).



22. ábra. A tonsilla lymphocyták körül kialakult lytikus zónák fénymikroszkópos képét mutatjuk be. A sejteket *Micrococcus Lysodeicticus* tartalmazó agarose gélbe szuszpendáltuk, és 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk.



23. ábra. A tonsilla sejt szuszpenziót discontinuous albumin grádiens centrifugálással frakcionáltuk. A centrifugálást 120 × g-gel 17 percig 4 °C-on végeztük. Az ábrán az egyes albuminfrakciókból kinyert sejt szám- és lizozim aktivitásértékeket tüntetjük fel.

## III. táblázat

*Lizozim specifikus aktivitás értékek különböző módszerekkel frakcionált tonsilla sejt populációkban*

Kiindulási sejt populáció		Sejtszeparálás	Szeparált sejtek		
$\mu\text{g}$ lizozim/ $10^7$ sejt	spec. akti- vítás ( $\mu\text{g}$ lizozim/ mg fehérje)		$\mu\text{g}$ lizozim/ $10^7$ lymphocyta	spec. akti- vítás ( $\mu\text{g}$ lizozim/ mg fehérje)	% ( $\frac{\text{szeparált sejt}}{\text{összes sejt}} \times 100$ )
1,8	0,009	discontinuous albumin grádiens centrifugálás (31%-os albuminban ülepedő lymphocyták)	30,0	0,120	4
1,6	0,008	üveggypot oszlop (szérum mentes)	13,5	0,075	10
2,0	0,009	üveggypot ↓ nylon gypot	35,0	0,140	3,5
1,8	0,011	vas por R 10	1,8	0,010	98

## IV. táblázat

*Izolált sejtek lizozim tartalma*

Sejt	$\mu\text{g}$ lizozim/ $10^7$ sejt	Szerzők
Monocyta	50–200	Heise és Myrvik 1967.
Granulocyta	5–10	Hindenburg és mtsai 1974.
„L-lymphocyta”	10–30	Puskás és mtsai 1975.

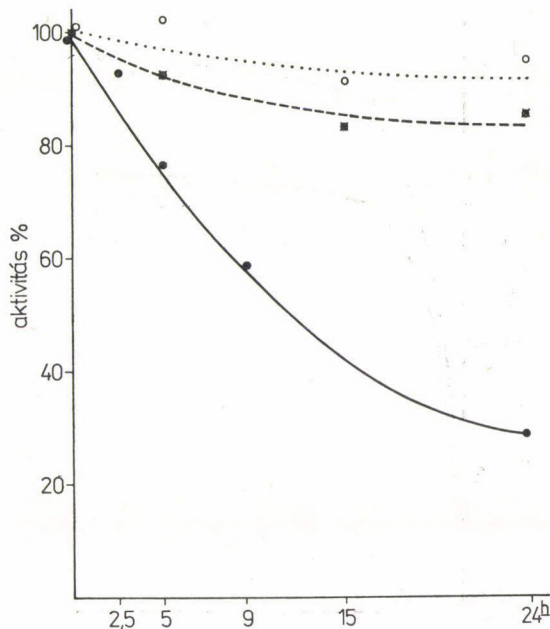
A tonsilláris lymphocyták lizozim termelését azzal hoztuk összefüggésbe, hogy a tonsilla palatina a külvilággal is érintkező, egyik legnagyobb nyirokszervünk, amelyben a lymphocyták a fokozott funkcionális igényekhez adaptálódtak. Kísérleteinkben gondosan ügyelnünk kellett arra, hogy az esetleges makrofágok jelenlétét az izolált sejtfrakcióban kizárjuk. Azt azonban még jelenleg sem sikerült egyértelműen bizonyítanunk, hogy esetleg a makrofágok valamelyik érési alakja van jelen abban a lymphocyta szubpopulációban, amelyet mi izoláltunk. Ha ilyen jelen is van, ennek a mennyisége elhanyagolhatóan kicsi ahhoz a viszonylag magas lizozim termeléshez képest, amelyre a szubpopuláció sejtjei képesek in vitro körülmények között. Az ún. „L-szubpopuláció” sejtjeiben a lizozim-szintézis és az IgA-termelés szabályozására vonatkozó vizsgálatokat végzünk.

### A tonsilláris lymphocyták fehérje szintézisének hőmérséklettől függő változása

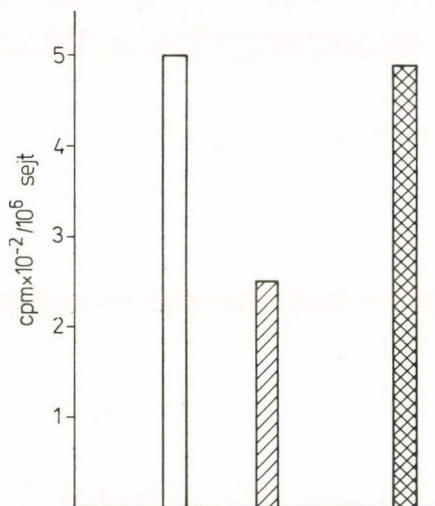
Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a tonsillák előzetes tárolása  $+4^{\circ}\text{C}$ -on jelentősen csökkenti a szervből izolált lymphocyták fehérjeszintézisét, ugyanakkor a sejtek RNS-DNS szintézise nem változik (24. ábra, Farkas és mtsai 1977). A frissen izolált sejtek  $+4^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálása csökkenti az aminosav inkorporációt, de nem befolyásolja a sejtek aminosav felvételét (25, 26. ábra).

A fehérjeszintézis csökkenése a  $37^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálással rekuperálódik, és eléri azoknak a sejteknek a fehérje szintetizáló sebességét, amelyeket előzetesen nem inkubáltunk  $+4^{\circ}\text{C}$ -on (25. ábra). A rekuperáció idő és hőmérséklet függő folyamat, amely cikloheximiddel gátolható (27., 28. ábra). Ismeretes, hogy a sejtekkel kapcsolatos vizsgálatoknál a sejtkinyerést és a vizsgálatokat megelőző folyamatot  $+4^{\circ}\text{C}$ -on végzik.

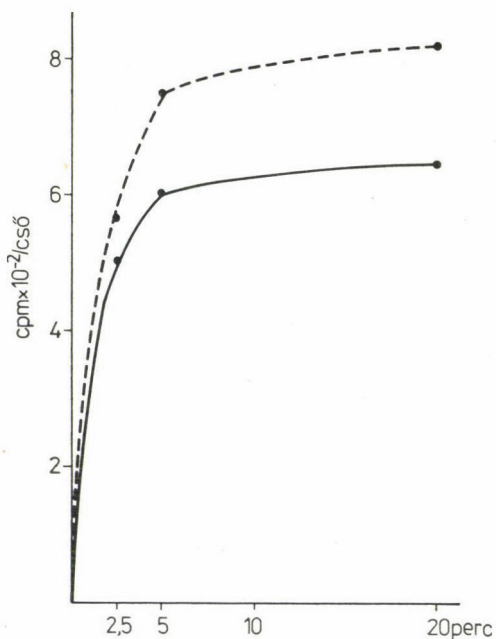
Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy az előzetes  $+4^{\circ}\text{C}$ -on történő kezelés időtartama jelentős mértékben befolyásolhatja a későbbi vizsgálati eredményeket. Ezért ajánlatos az előkészítő,  $+4^{\circ}\text{C}$ -on történő eljárásokat azonos idő intervallumon belül végezni. A sejtek fehérjeszintézisének csökkenése, amelynek a  $+4^{\circ}\text{C}$ -on történő előzetes tárolása az oka, arra utal, hogy a fehérjeszintézis folyamatának valamely szakasza „elakad”.



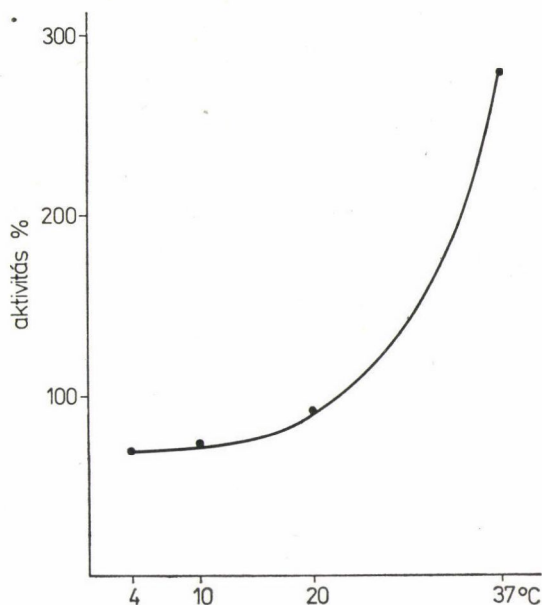
24. ábra. A tonsillák 0–24 óráig  $+4^{\circ}\text{C}$ -os tárolása után szeparált lymphocyták  $^{14}\text{C}$ -valin ( $\bullet - \bullet$ ),  $^3\text{H}$ -uridin ( $\blacksquare - \blacksquare$ ),  $^3\text{H}$ -timidin ( $\circ \cdots \circ$ ) inkorporációja, a tárolás nélküli tonsillákból frissen izolált sejtek inkorporációjának százalékában.



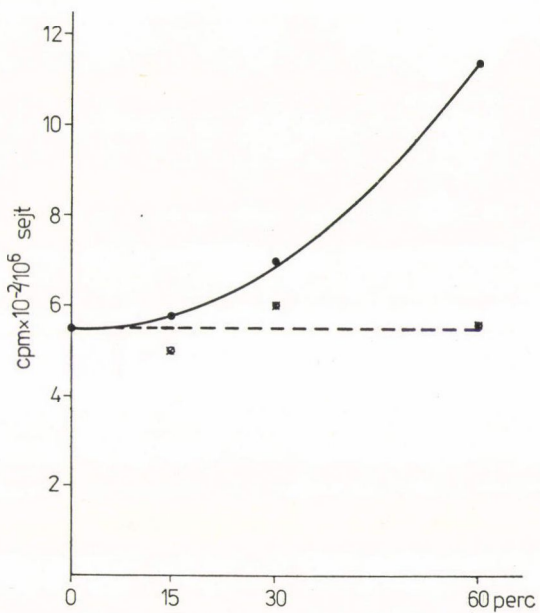
25. ábra. A tárolás nélküli tonsillákból izolált lymphocyták 60 perces <sup>14</sup>C-valin inkorporációja: előinkubálás nélkül □, előinkubálva: 60 percig +4°C-on ▨, 60 percig +4°C-on, és ezt követő 60 percig 37°C-on ⊠.



26. ábra. A tárolás nélküli tonsillákból izolált lymphocyták aminosav felvétele: előinkubálás nélkül •—•, 90 perces +4°C-on történő előinkubálást követően •---•.



27. ábra. 24 óráig +4 °C-on tárolt tonsillákból izolált lymphocyták 60 perces <sup>14</sup>C-leucin inkorporációja +4 °C, +10 °C, +20 °C, +37 °C-on történő 30 perces előinkubálást követően, az előinkubálás nélküli sejtek inkorporációjának százalékában.

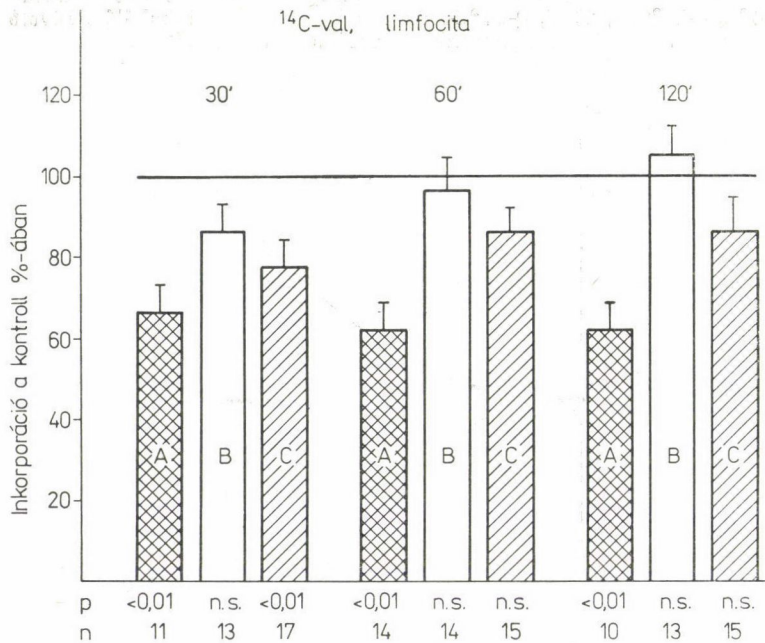


28. ábra. A tarolás nélküli tonsillákból izolált lymphocyták 0—60 perces 37 °C-os előinkubálását követő <sup>14</sup>C-valin inkorporációja, ha a rendszer nem tartalmazott cycloheximidet ●—●, ha az előinkubálás alatt jelenlevő 5 γ/ml cycloheximidet az előinkubálás végén eltávolítottuk a rendszerből ☒---☒.

A fehérjeszintézis blokkolódhat a transláció valamelyik szakaszában, vagy az azt követő posztszintetikus fázisban. Lehetséges továbbá, hogy a fehérjeszintézishez szükséges valamelyik faktor inaktíválódik  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A fehérjeszintézis rekuperálódik a  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolást követő  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálás következtében, ami tehát a folyamat reverzibilis jellegére utal.

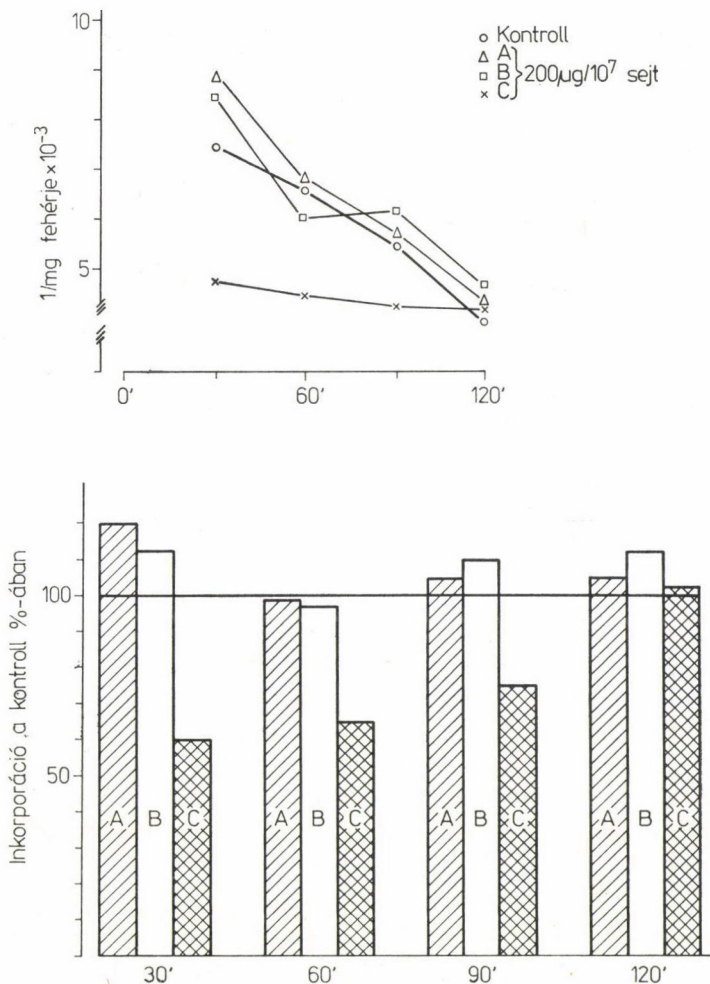
### Lymphocyták citotoxin termelésének vizsgálata

A B-lymphocyták a környezetbe ellenanyagot, immunglobulinokat szekretálnak. A T-lymphocyták citotoxikus és feltételezhetően még sok egyéb más faktorokat is szintetizálnak, amelyek a lymphocyták közötti kölcsönhatás szabályozásához szükségesek. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a kultúrákban tartott lymphocyták médiumából izolált fehérjetermészetű anyagok befolyásolják a friss lymphocyták tulajdonságait. Bizonyítottuk, hogy azok *in vitro* körülmények között lizálják a lymphocytákat, ill. a makromolekulák szintézisét gátolják (29., 30., 31. ábra, T. Szabó és Antoni 1975., T. Szabó és mtsai *in press*). A lízist  $\text{Cr}^{51}$ -el jelzett lymphocyták alkalmazásával (32. ábra),



29. ábra. Lymphocyták 4 órás inkubálási médiumából, ammóniumsulfáttal 3 frakcióban kicsapott fehérjék hatása a lymphocyták  $^{14}\text{C}$ -valin inkorporációjára. — A: 0—30% telítés; B: 30—70% telítés; C: 70—100% telítés. Inkorporáció mérés:  $10^7$ /ml sejt Hanks-médiumban inkubálva, a jelzett időpontokban 30 perces pulzusjelzés. A fehérje-frakciók nélkül inkubált kontroll sorozatok inkorporációjának %-ában fejeztük ki a fehérjék jelenlétében mért jelzetséget. Az egyes frakciókból  $200\text{ }\mu\text{g}$ -t adtunk  $10^7$  sejthez.



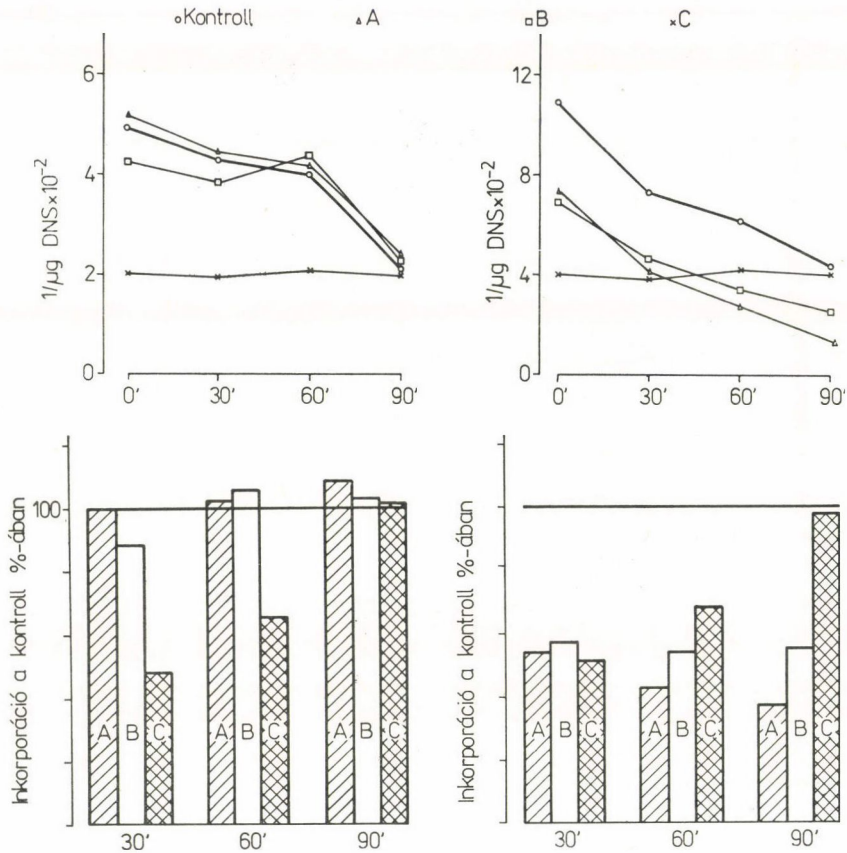


30. ábra. A fehérjefrakciók hatása a lymphocyták RNS szintézisére. Inkorporáció mérés: 10<sup>7</sup>/ml sejt Hanks-médiumban inkubálva, a jelzett időpontokban 30 perces pulzus jelzés <sup>3</sup>H-uridinnel. Az inkubálás után a TCA-val kicsapott sejtek jelzettségét mértük. Az ábra felső részén a specifikus aktivitást, az ábra alsó részén a kontrollhoz viszonyított inkorporációt mutatjuk be.

a makromolekulák szintézisében a gátlást jelzett prekursorok alkalmazásával mértük. A komponenseket tisztítottuk. A tisztított komponensek közül egyesek csak a lymphocyták fehérjeszintézisét gátolják.

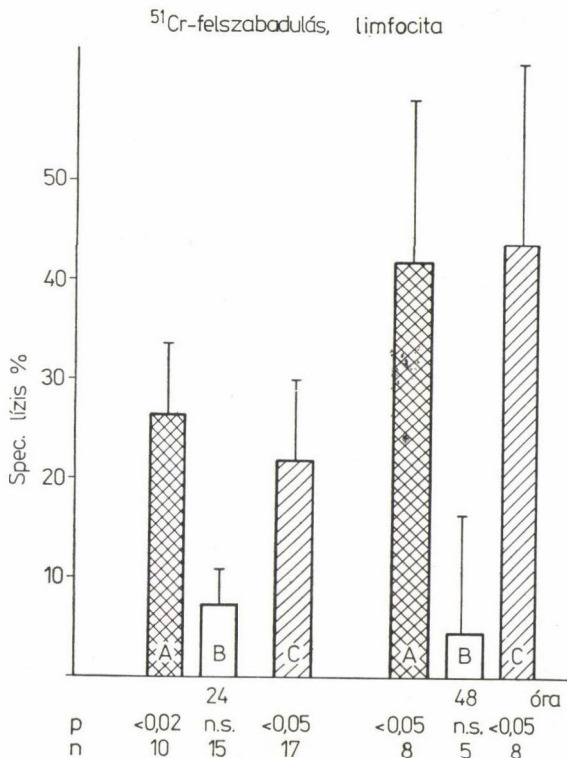
### Plazma membrán

A lymphocyták funkciójának megismerésében jelentős fejlődést jelentett a plazma membrán szerepének tanulmányozása, különös tekintettel a felületi ellenanyagok, továbbá a lymphocytá felületének változására, amely a



31. ábra. A fehérjefrakciók hatása a lymphocyták DNS szintézisére. Inkorporáció mérés:  $5 \times 10^6$ /ml sejt Eagle-médiumban inkubálva,  $100 \mu\text{g}$  fehérje jelenlétében. Az ábrán jelzett időpontokban 60 perces pulzus jelzés  $^3\text{H}$ -timidinnel. Az ábra felső részén a sejtekből izolált DNS-re vonatkoztatott specifikus aktivitást, az ábra alsó részén a kontrollhoz viszonyított jelzetséget mutatjuk be.

különböző mitogének hatására következik be. A lymphocytá membránra vonatkozó ismereteinket jelentős mértékben támasztotta alá az a felismerés, hogy a fluid mozaikmodell az eucaryota plazma membránjára jellemző állapot. A plazma membrán az eucaryoták — így a lymphocyták esetében is — nemcsak a sejt és a külső környezet közötti elhatárolást jelenti, hanem a plazma membrán közvetítő szerepét is a külső környezet és a sejt belső tere között. Más szóval a plazma membránoknak „átvezető” funkciója és szerepe van az eucaryota-sejtekben. A lymphocyták histokompatibilis antigén tulajdonságának felismerésében az antigén kémiai szerkezetének vizsgálatához szükséges a plazma membrán izolálása. A lymphocyták és más sejtek membránjának preparálásáról több szerző számolt be. Vizsgálatainkban a humán tonsillaris lymphocytákból preparáltunk mag- és mitokondrium mentes készí-



32. ábra. Az ábrán bemutatott fehérjefrakciók jelenlétében mért <sup>51</sup>Cr-felszabadulás, 24, 48 órás inkubálás után ( $5 \times 10^6$  sejt/ml, 100  $\mu$ g fehérjefrakció/ml).

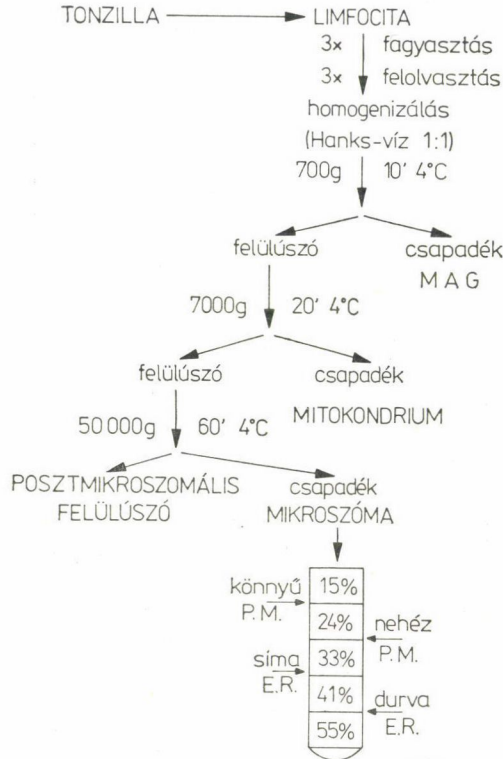
ményeket, amelyekből az egyes receptor fehérjék szeparálására eljárásokat dolgoztunk ki. A vizsgálatainkban használt tonsilla-sejtek membrán preparálását az alábbi ábra szerint végeztük (33. ábra, Hrabák és mtsai 1974, Hrabák 1976).

A frakcionálás során a DNS és RNS tartalmat követtük (Hrabák és mtsai, in press). Az egyes frakciók jellemző adatait táblázatban tüntetjük fel.

V. táblázat

Humán tonsilla-lymphocyták szubcelluláris frakcióinak kémiai összetétele

Frakciók	Fehérje (össz-sejt %-ában)	DNS	RNS	Hexóz	Hexózamin	Sziálsav
		$\mu$ g/mg fehérje egységekben				
Teljes sejt	100	189	62,5	18,6	2,92	5,36
Magfrakció	50,7	779	67	27,2	5,65	5,04
Mitokondrium	7,1	88	105	50,5	5,02	8,9
Mikroszomális fr.	5,0	44,6	88,8	57	15,7	19,4
Citoszól	37,2	28,9	10,5		1,66	



33. ábra. Plazma membrán frakciók izolálása humán tonsilla lymphocytákból.

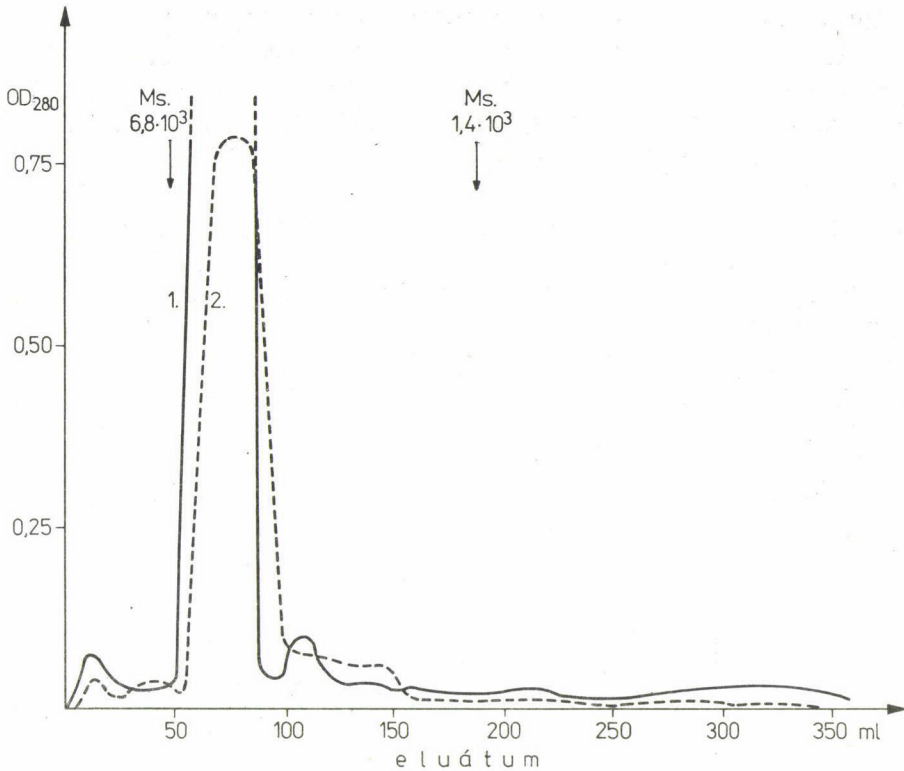
A tisztítás során követtük a membrán frakcióra jellemző 5' nukleotidáz és a glukóz-6-foszfataz aktivitást.

A táblázatból látható, hogy elsősorban szialinsav és neutrális hexózokban gazdag glikoprotein frakciót izoláltunk. Az izolált frakció összetételét és homogenitását kromatográfiás és gélelektroforetikus módszerekkel vizsgáltuk. A frakció Sephadex-G 150 géliszűrés alapján homogénnek bizonyult, diszulfid

#### VI. táblázat

Humán tonsilla lymphocyták subcelluláris frakcióinak enzim aktivitás értékei

Frakciók	<sup>14</sup> C-valin inkorporáció (dpm/mg · feh.)	Citokróom oxidáz U/mg feh.h	Gl-6-Páz	Savas foszfataz	5'-AMPáz
			μMP/mg feh. h		
Homogenátum (teljes sejt)		0,027	0,278	1,029	1,63
Magfrakció	4 910	0,112	0,310	0,855	1,44
Mitokondrium	7 720	0,340	0,241	1,862	2,32
Mikroszóma	45 900	0,036	0,340	1,030	2,82
Citoszól	34 400	0,01	0,348	1,170	1,45

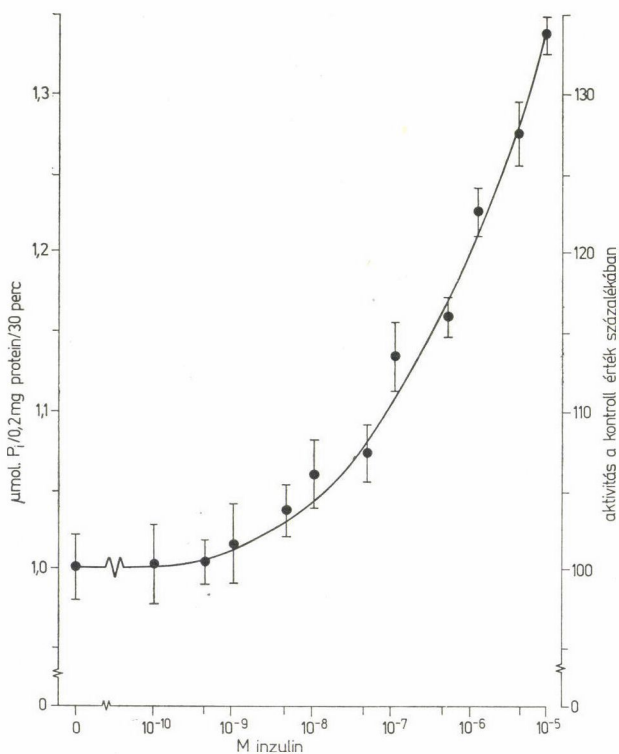


34. ábra. A LIS-kivonat gélszűrése Sephadex G 150 oszlopon (oszlop mérete:  $1 \times 80$  cm). A molkulásúlyok kalibrálására szérum albumint és ribonukleázt használtunk.

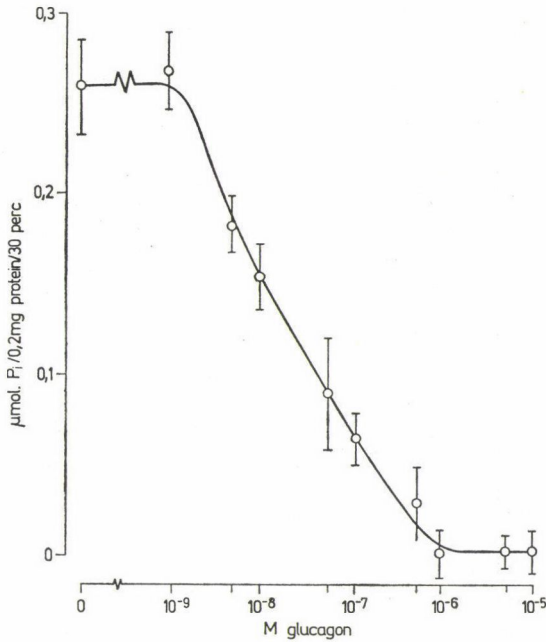
hidakat nem tartalmazott, molsúlya 45—50 000 körüli érték (34. ábra). DEAE cellulóz oszlopon kromatografálva a frakció erősen savanyú karakterű, két nagyobb frakcióra bontható (Hrabák és mtsai 1973), az SDS poliakrilamid-gél elektroforetikus módszerrel három frakcióra bontható (Ms: 40 000, 46 000, 49 000). A frakció a sejt összfehérje tartalmának kb. 0,035%-át tartalmazza, ami a membrán fehérjék 3,5%-át jelenti. Az izolált frakció biológiai aktivitást mutat *in vitro*, gátolja a humán lymphocyták és a birka vörösvértest között a rosettaképzést (Hrabák és mtsai 1975). A frakciók a lectinek stimuláló hatását gátolják a koncentráció függvényében. A gátlást annak tulajdonítjuk, hogy az általunk izolált membránfrakció szénhidrát determinánsai kötődnek a lectinekhez, és ez gátolja az utóbbiak membránhoz kötődését. Ez arra utal, hogy az izolált frakció *lectin receptor tulajdonsággal rendelkezik* (Hrabák és mtsai *in press*). A membrán receptorok és a membrán kötött enzimek közötti kölcsönhatások megismerésében tanulmányoztuk a lymphocytá membránok ATPáz enzimeire a peptid hormonok hatását. Az insulin és glukagon az egyes membrán ATPázokra eltérően hat. Az insulin 1—10  $\mu\text{M}$  koncentrációban

20–30%-kal fokozta a  $Mg^{2+}$  függő ATPáz hatását (35. ábra), de hatástalan volt a  $Na^+ + K^+$  ATPázra, továbbá a  $Mg^{2+} + Ca^{2+}$ -dependens ATPázra. A glukagon 10 nM koncentrációban gátolja a  $Mg^{2+} + Ca^{2+}$ -dependens ATPáz-t, de nem hatott a másik kettőre (36. ábra, Szamel és mtsai 1976). Az insulin hatását az együttesen adott — önmagában hatástalan glukagon —, az utóbbiét pedig az inzulin megszüntette (37., 38. ábra). Ha a mikroszóma frakcióról solubilizáltuk a receptorokat, vagy a mikroszóma kinyerés előtt kezeltük a sejteket detergenssel, ez a hormonhatást felfüggesztette (39. ábra, Szamel és mtsai 1977). Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a hormon — ATPáz kölcsönhatás kialakulásához a membrán felületén a receptorok jelenléte szükséges. Ezek alapján valószínűnek tartjuk, hogy a receptor-kötött hormonok a membrán ATPázokra gyakorolt hatása a membrán konformáció változásával függ össze.

A lymphocyták membránjával kapcsolatban tanulmányoztuk a helyi érzéstelenítők (lidocain és származékai) hatását. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a helyi érzéstelenítők  $10^{-2}$  mol koncentrációban gátol-



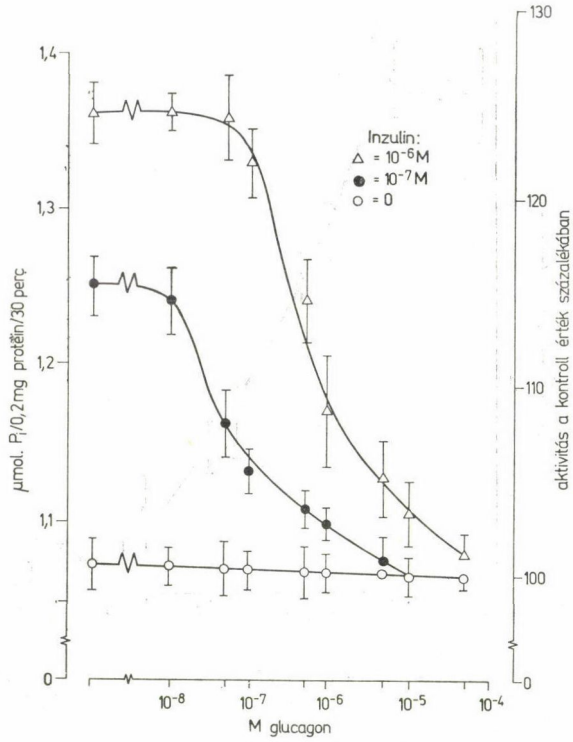
35. ábra. 50 mM Tris-HCl pufferban (pH 7,4), amely 5 mM ATP-t, 5 mM  $MgCl_2$ -t tartalmazott, mértük emelkedő koncentrációjú inzulin aktiváló hatását a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitására.



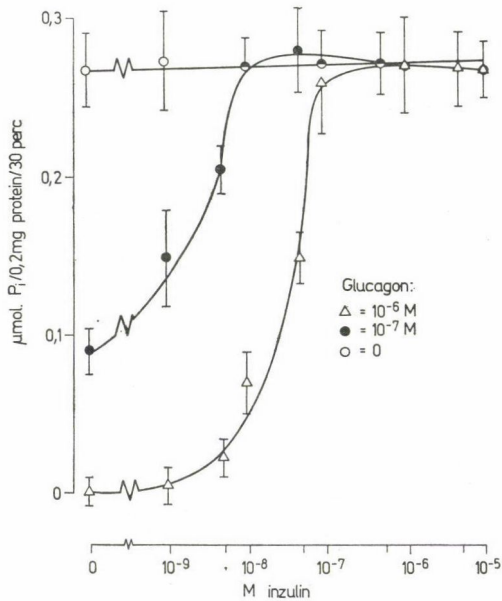
36. ábra. 50 mM Tris-HCl pufferban (pH 7,4) 5 mM ATP-t, 5 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 25 µM CaCl<sub>2</sub>-t tartalmazó reakcióelegyben mértük emelkedő koncentrációjú glukagon gátló hatását a Ca<sup>2+</sup>-aktivált ATPáz aktivitásra.

ják a lymphocyták a <sup>3</sup>H-timidin és <sup>3</sup>H-uridin felvételét és inkorporációját (40. ábra). A helyi érzéstelenítőknek ez a hatása a sejtekhez történő hozzáadásakor azonnal bekövetkezik. A gátló hatás reverzibilis: ha az érzéstelenítőt a rendszerből eltávolítjuk, új médiumba visszük a sejteket, a makromolekulák bioszintézise tovább folyik (Bojta és mtsai 1977, Hrabák és mtsai 1977). A lymphocytákkal szemben termelt lytikus antiszérum hatását a lidocain potenciozta (41. ábra). A lidocain hatására a membrán érzékenyebbé válik az antiszérumban jelenlevő lytikus faktorokkal szemben (Antoni és Bojta 1977). A lidocainnak ez a lízist fokozó hatása Ca<sup>2+</sup> koncentráció növelésével kivédhető (42. ábra).

Általánosan ismert, hogy a lymphocyták felületén immunglobulinok vannak jelen. Az immunglobulinoknak ezt a csoportját felületi immunglobulinoknak nevezzük. Vizsgálatainkban — melyet indirekt immunfluorescens módszerrel végeztünk — a humán tonsillákból kinyert lymphocyták felületén IgA, IgG és IgM immunglobulinokat mutattunk ki. Eljárást dolgoztunk ki az immunglobulinokat specifikusan, ill. aspecifikusan kötő lymphocyták elkülönítésére (Puskás és mtsai 1977). Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a tonsilla lymphocytá populációban 8% IgA, 16% IgG és 8% IgM szintetizáló sejt van (VII. táblázat, Antoni és mtsai in press).

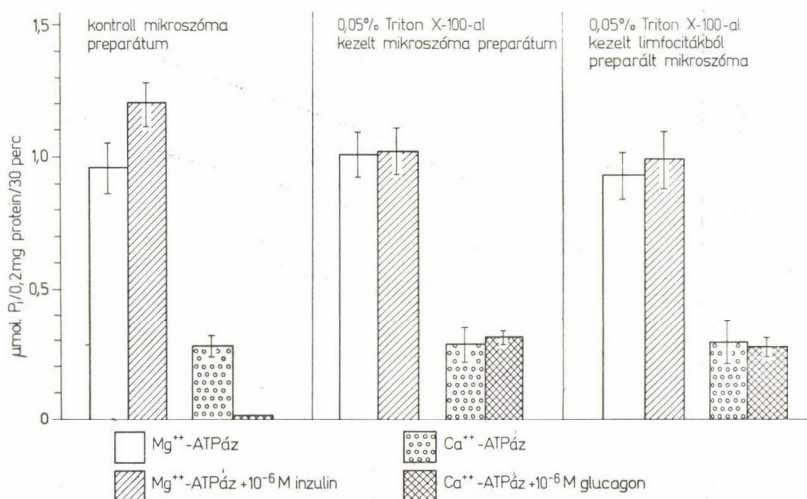


37. ábra. 50 mM Tris-HCl pufferban, 5 mM ATP és 5 mM  $\text{MgCl}_2$  jelenlétében emelkedő koncentrációjú glukagonnal az inzulin  $\text{Mg}^{2+}$  dependens ATPáz aktiváló hatása felfüggeszthető.

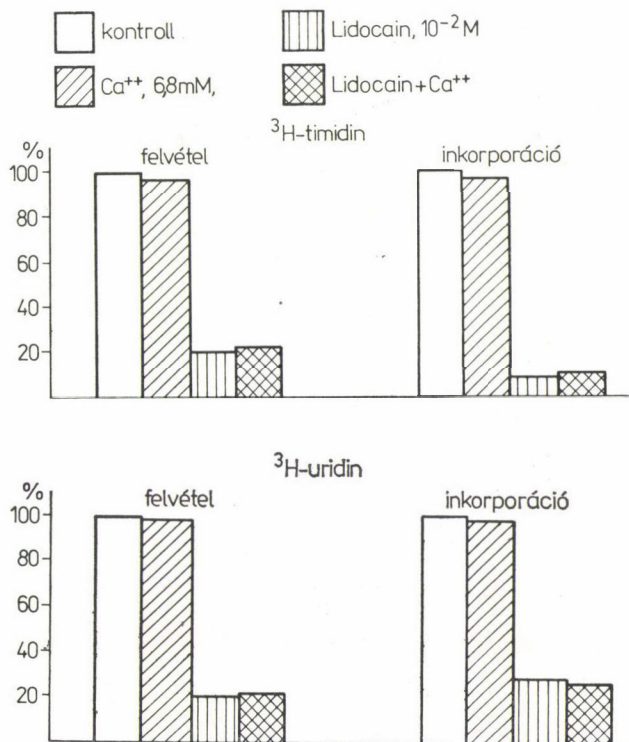


38. ábra. 50 mM Tris-HCl pufferban, 5 mM ATP-t, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ -t, 25  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ -t tartalmazó reakcióelegyben az inzulin a glukagon  $\text{Ca}^{2+}$  aktivált ATPáz-gátló hatását felfüggeszti.

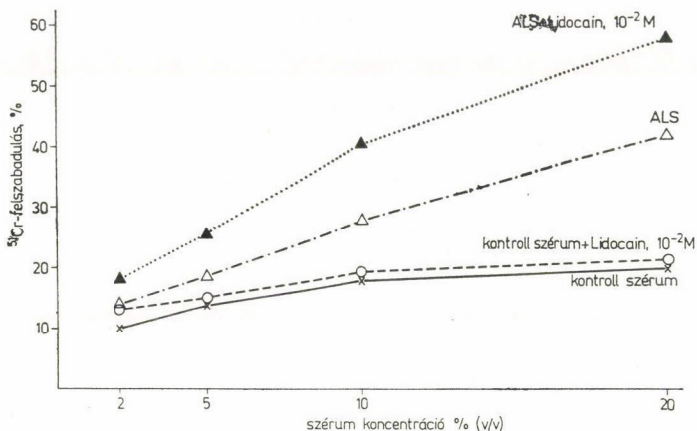




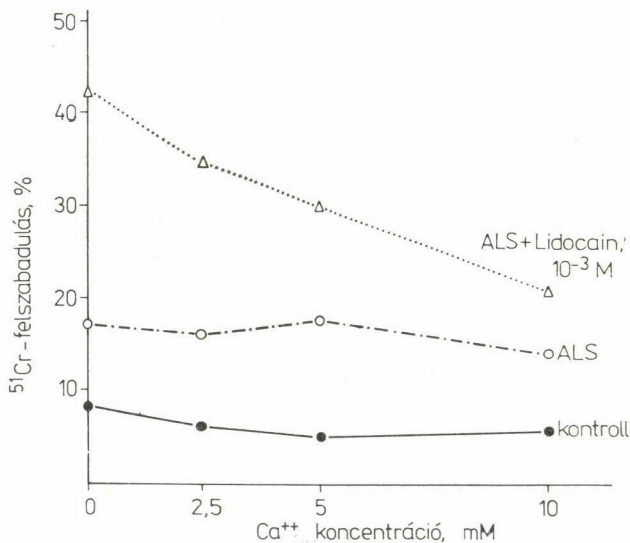
39. ábra. A mikroszoma frakciót, ill. a lymphocita sejtuszpenziót a mikroszoma preparálás előtt 0,05% Triton X-100-zal kezeltük 0°C-on 20 percig. Ez a detergens koncentráció mind az inzulin,  $\text{Mg}^{2+}$  ATPázt aktiváló, mind a glukagon  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázt gátló hatását megszünteti.



40. ábra. Lidocain hatása humán tonsilla lymphocyták timidin, ill. uridin felvételére és inkorporációjára.



41. ábra. Lidocain hatása az immuncitolízisre. A patkányban termelt antilymphocita szérúm (ALS) citolitikus hatását a  $^{51}\text{Cr}$ -al jelzett humán tonsilla lymphocytákból felszabaduló  $^{51}\text{Cr}$  mennyisége jelzi. (A sejtek kezdeti krómtartalma felel meg 100%-nak.)



42. ábra. Calcium ionok hatása a lidocainnal potencírozott immuncitolízisre.

### *A cAMP molekuláris hatásmechanizmus vizsgálata humán tonsilláris lymphocytákban*

A cAMP-nek, mint intracelluláris mediátornak a felfedezése egy elvileg új szabályozási mechanizmus felismerését jelentette az eucaryota sejtekben. Az elmúlt évtizedben nyilvánvalóvá vált, hogy a cAMP nemcsak több polipeptid hormon mediátor anyaga, hanem más szabályozási folyamatokban,

VII. táblázat

Immunglobulint szintetizáló lymphocyták (%)		
IgA	IgG	IgM
átlag		
7,8	16,5	7,9
Immunglobulint szintetizáló + adszorbtíve kötő lymphocyták (%)		
IgA	IgG	IgM
átlag		
15,2	29,0	22,0

ill. rendszerekben is mediátor szerepet lát el. A sejtmembránban lokalizált adenilcikláz-hatására a cAMP ATP-ből képződik. Az adenilcikláz sejt-típusonként más-más membrán receptorokhoz kapcsolódik. Ennek megfelelően az adenilcikláz sejt-típusonként más hormon, illetve hormonszerű anyag képes aktiválni. Egy adott sejtben a cAMP-szint emelkedés tehát nagyon specifikus membránreakció eredményeképpen jön létre. Az intracellulárisan képződött cAMP mindig az adott differenciált sejt programjának megfelelően speciális funkciót aktivál, vagyis mindig olyan folyamatokat, amelyekre nézve az adott sejtben a genetikai információ előírható. A cAMP szerepével kapcsolatban a lymphocytá proliferaációban két egymással ellentétes hipotézis ismert. Az egyik szerint a mitogén stimulust követően a cAMP-szint növekedik és ezt követi a foszfát inkorporáció a H I hiszton frakcióba és más, citosolban levő fehérjékbe. A lymphocyták mitogenezisében a cAMP a feltételezés szerint pozitív mediátor szerepet játszik. A másik hipotézis szerint a cAMP gátolja a poliferaációt. A cAMP-szint emelkedése az intracelluláris foszfodieszteráz gátlásával vagy prostaglandinok, illetve cAMP analógok adásával gátolja a mitogénekkal stimulált RNS DNS szintézist. Újabban a lymphocyták mitogenezisének folyamatában kétféle cAMP függő proteinkináz ellentétes hatásáról számolnak be, amely feloldhatja a korábbi két ellentmondó munkahipotézist (Byus és mtsai 1977). A ciklikus nukleotidok, a cAMP és a cGMP nagyon valószínűen szerepet játszanak az immunválasz reakció intracelluláris mediátoraiként is. A cAMP immunológiai hatása minden valószínűség szerint a cAMP magi folyamatokat befolyásoló működésével áll összefüggésben. A cAMP magi folyamatokat reguláló hatásának vizsgálatára a lymphocyták bizonyulnak az egyik legjobb kísérleti objektumnak. A cAMP sokféle folyamatot aktiválhat, vagy gátolhat, de jelenlegi ismereteink szerint csak egy olyan molekuláris szintű folyamat ismert, amelyben a cAMP közvetlenül részt vesz. Ez a folyamat a cAMP

dependens proteinkináz aktiválása. Ezért vizsgálataink első feladatákként a lymphocita proteinkináz aktiválásának tanulmányozását tűztük ki. A humán tonsilla lymphocita sejtplazmája magas hisztonkináz aktivitást mutatott, és az enzimmtisztítás során kiderült, hogy a lymphocita legalább két különböző hiszton foszforiláló enzimmel rendelkezik. Ezeket egymástól DEAE cellulóz kromatográfia alkalmazásával sikerült elválasztani. A két hisztonkináz különbözik a cAMP iránti érzékenységben, pH optimumban, stabilitásban és enzimkinetikai paramétereikben. A két enzim frakció közül az egyiket, amelyik ciklikus nukleotidokkal nem aktiválható cAMP independensnek, míg a másikat, amelyik cAMP érzékenységet mutatott, cAMP dependens enzimnek neveztük (Farágó és mtsai 1973).

A két enzim által foszforilált H2b hiszton triptikus peptidjeinek fingerprint analizisével kimutattuk, hogy a cAMP dependens enzim főleg egyetlen kitüntetett helyen foszforilálja a H2b-t, míg a cAMP independens enzim több oldalláncot foszforilál. A lymphocytákból nyert cAMP dependens enzim a borjú thymus H2b hiszton aminosav szekvenciájának 36- vagy 38-as pozíciójában levő szerin csoportot foszforilálja (VIII. táblázat, Farágó és mtsai 1975). A hisztonkináz hatásról feltételezik, hogy az a sejtmagban, kromatinszinten érvényesül. Az általunk izolált enzimeket a citoplazmában találtuk, míg vizsgálataink további részében a humán tonsilláris lymphocyták magjában tanulmányoztuk a proteinkináz aktivitást. Hasonlóan más sejtek magjából nyert kivonatokhoz, a humán tonsilláris lymphocita magjából nyert kivonat is hisztonkináz aktivitással rendelkezik és cAMP independensnek bizonyult. Azonban a magkivonatban olyan jelentős mennyiségű cAMP-kötő fehérjét találtunk, amely nem származhatott a sejtek feltárásakor a plazmából a maghoz keveredő szennyezésből. DEAE cellulóz kromatográfiai eljárással kimutatható volt a magban is a cAMP dependens hisztonkináz, de

## VIII. táblázat

*Borjú thymus H2b hiszton aminosav szekvenciája*

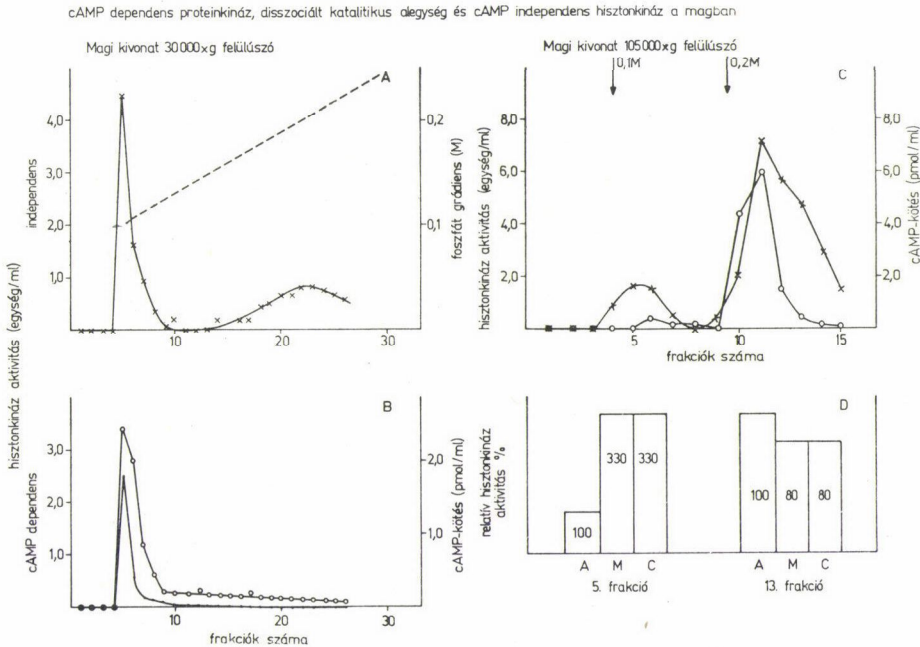
	5	10	15	20
H <sub>2</sub> N-Pro-Gln-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-Ala-Pro-Lys-Lys-Gly-Ser-Lys-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Ala-				
	25	30	35	40
Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-Lys-Lys-Glu-Ser-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys-				
	45	50	55	60
Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-				
	70	75	80	85
Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-				
	90	95	100	105
Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-				
110	115	120	125	
Ala-Val-Ser-Glu-Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Ser-Lys-COOH				

Iwai, K., Ishikawa, K. és Hayashi, H., Nature, 226. 1056 (1970).

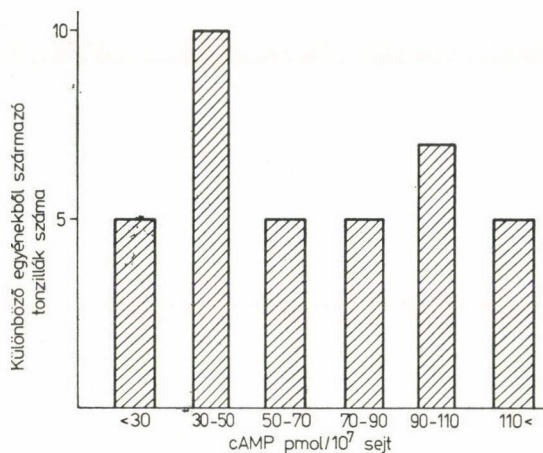
magi kivonatban a cAMP dependens enzim disszociált alegységei is megtalálhatók. Az irodalomból jól ismert az a tény, hogy a cAMP dependens protein-kináz cAMP hatására katalitikus és cAMP kötő regulátor alegységre disszociál. Ez magyarázhatja a magas cAMP receptor aktivitását a magi kivonatnak (43. ábra, Faragó és mtsai 1974).

A friss tonsilla lymphocyta cAMP tartalma igen magas más szövetek cAMP tartalmához viszonyítva. A sejtek átlagos cAMP tartalma  $60 \text{ pmol}/10^7$  sejt, megközelítőleg  $60 \text{ pmol}/\text{mg}$  szövet körüli érték, azonban ha az egyedi tonsillákból származó lymphocyták cAMP tartalmát vizsgáljuk, kiderül, hogy ez nagyon széles határok között változik. Saját eredményeink (44. ábra) mellett feltüntetjük az irodalomban található, humán lymphocytákra vonatkozó adatokat is (IX. táblázat).

Az általunk vizsgált egyedi tonsillák nagy csoportjánál a cAMP szint  $30\text{--}50 \text{ pmol}/10^7$ sejt, ez az érték jól megegyezik a keringő vér-lymphocyták



43. ábra. A magi kivonatok DEAE cellulóz oszlopról eluálódó frakcióinak hisztonkináz aktivitását megmértük cAMP jelenlétében és cAMP nélkül (x-x-x). A kettő különbségét tüntettük fel cAMP dependens aktivitásként (-●-●-). A és B ábrán (30 000x g felülűsző kromatográfiája) látható, hogy a frakciók cAMP-kötő aktivitása (○-○-○-) nem teljesen párhuzamos a cAMP-dependens enzim-aktivitással. C ábrán (105 000x g felülűsző kromatográfiája) látható, a 0,1 M foszfáttal eluálódó disszociált katalitikus alegység, amelyik nem köt cAMP-t, és a 0,2 M foszfáttal eluálódó cAMP independens hisztonkináz. A jelentős cAMP-kötő aktivitás ellenére cAMP dependens proteinkináz holoenzim ebben a preparátumban nincs. D ábra a C ábrán elkülöníthető két hisztonkináz frakció relatív aktivitását mutatja. — A: 0,1 mg/ml H2b jelenlétében, M: 1,0 mg/ml H2b jelenlétében, C: 1,0 mg/ml H2b + cAMP jelenlétében.



44. ábra. Különböző tonsillákból nyert lymphocyták megoszlása cAMP tartalmuk szerint.

### IX. táblázat

#### Humán lymphocyták cAMP tartalma

Sejt	Kezelés	cAMP tartalom pmol/10 <sup>7</sup> sejt	Szerzők
Perifériás vér, lymphocyta	—	36,8	Wedner és mtsai 1975.
Perifériás vér, lymphocyta	—	25,8	Atkinson és mtsai 1975.
Izolált T-sejtek	—	5,3	”
Perifériás vér, lymphocyta	—	38,6	Shneyour és mtsai 1976.
Lymphocyta	tripszin	364,0	”
Thymocyta	—	1,4	”
Thymocyta	tripszin	4,8	”
Perifériás vér, lymphocyta	—	70,4	Niaudet és mtsai 1976.
Lymphocyta	isoproterenol	257,2	”
Thymocyta	—	12,4	”
Thymocyta	isoproterenol	78,0	”
Izolált T-sejtek	—	10,1	”
Tonsilla és adenoid sejtek	—	46,4	”

cAMP-tartalmára vonatkozó irodalmi adatokkal. A tonsillák jelentős részében azonban a lymphocyták cAMP tartalma olyan magas értékeket ér el, amelyeket perifériás lymphocyták esetén csak tripszines vagy isoproterenolos kezelés hatására találnak. A tonsilla-lymphocyták emelkedett cAMP szintje is a cAMP immunológiai reakciókban játszott szerepére utal.

A cAMP dependens lymphocytá enzimek in vitro 37 °C-on, pH 7,0 körül már  $10^{-7}$  M cAMP mellett is több mint a fele aktivált, disszociált állapotban van. A lymphocytában található  $10^{-5}$  M nagyságrendű cAMP-koncentráció mellett érthető, hogy a magban (és a plazmában is) a cAMP dependens proteinkináz egy része disszociált formában van. A humán lymphocytá sejténként  $10^4$  nagyságrendű cAMP-receptor (cAMP-t kötő regulátor alegység) molekulát tartalmaz.

Újabb vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a cGMP parciálisan kompetitív gátolja a  $^3\text{H}$ -cAMP kötődését a humán tonsilla lymphocytákból izolált cAMP dependens proteinkináz regulátor alegységéhez. A  $^3\text{H}$ -cGMP kötődés Scatchard-analízise alapján a részlegesen tisztított proteinkináz preparátum egy nagy affinitású és egy kis affinitású cGMP-kötőhelyet tartalmaz. A cAMP hatására a nagy affinitású kötőhely eltűnik, míg a kis affinitású kötést a cAMP nem befolyásolja. A cAMP és cGMP-kötőhelyek nem azonosak (Faragó és mtsai 1977).

cAMP independens hisztonkinázokat más szövetekből is izoláltunk és azt összehasonlítottuk a humán tonsilláris lymphocytákból izolált enzimekkel. A más szövetekből izolált cAMP independens hisztonkináz enzimkinetikai tulajdonságai hasonlóan bizonyultak a lymphocytákból izolált independens hisztonkinázéhoz. A H2a és H2b hisztonok, amelyek asszociációra hajlamosak, enzimaktivitást gátló hatásúaknak bizonyultak 0,01 mg/ml-nél magasabb koncentrációban. Ez a jelenség H1 hiszton szubsztrát esetében nem volt tapasztalható. A foszforilált H2a és H2b hisztonok triptikus peptidjeinek fingerprint analízise azt mutatta, hogy a lymphocytá enzím szubsztrát-specifitása azonos a más szövetből származó hisztonkinázéval (Romhányi és mtsai 1977).

**Összefoglalás:** A humán tonsilla palatinából izoláltunk lymphocytákat. A humán tonsilla lymphocyták az izolálást követő 3–4 óráig inkorporálnak timidint. A nagy átmérőjű sejtek (blastok) a kultúrából eltűnnek, nyugvó kis lymphocytákká alakulnak át. Ezzel egyidejűleg a DNS-polymeráz aktivitás is csökken a sejtekben. A lymphocyták felületén immunglobulinok találhatóak, amely sejteknek azonban csak egy része immunglobulin szintetizáló sejt. A felületi receptorok fontos szerepet játszanak a membrán ATPáz hormon kölcsönhatású folyamatokban.

A lymphocytá membránból glikoprotein frakciót izoláltunk, amelynek biológiai aktivitását bizonyítottuk. A sejtmembrán más tulajdonságait, a helyi érzéstelenítők, antilymphocytá savók hatását tanulmányoztuk, amelyek

alapján a lymphocyta membránt az eucaryotákhoz hasonlóan fluid mozaik típusúnak találtuk. A tonsillák +4 °C-on történt tárolása a lymphocyták fehérjeszintetizáló képességét csökkenti, amelyet 37 °C-on történő előinkubálás helyreállít. A T- és B-sejtek UV-érzékenységénél különbségeket találtunk. A T-sejtek membránreceptora UV-fényérzékeny, míg a B-sejteké kevésbé. A T- és B-sejtek az ún. repair folyamatban különbséget mutatnak, amit a sejtek különböző transzportálóképességével hozunk összefüggésbe. A tonsilláris lymphocyták esetében azt találtuk, hogy a B-lymphocyták jelentősen több uridint vesznek fel és inkorporálnak, mint a T-sejtek. Ez a megállapítás a nyugalmi sejtpopulációra vonatkozik, míg a stimulált sejtpopulációban a T-sejtek vesznek fel jelentősen több timidint a B-sejtekhez viszonyítva. A tonsilláris lymphocytákból lizozimet izoláltunk. A lizozimszintézist a tonsilláris sejtek ún. „L-lymphocyta” szubpopulációjában mutattuk ki. Megállapítottuk, hogy a tonsilláris lymphocyták in vitro körülmények között a médiumba citotoxinszerű anyagokat, továbbá DNS-t szekretálnak, amelyek szerepét összefüggésbe hozzuk a lymphocyták ellenanyag-szintézisével, ill. szintézis propagációjával más sejtekben.

A humán tonsilla palatina exstirpálható szerv. Ennek ellenére igen jelentős részét képezi a szervezet immunrendszerének, különös tekintettel a tonsilla palatina anatómiai lokalizációjára. A tonsilla az egyik legnagyobb nyirok-szervünk, amely közvetlen kapcsolatban áll a külvilággal. Ilyenformán lehetőséget ad arra, hogy regionális immunfolyamatok indukálódjanak és a szervezet perorális immunizálásában fontos szerepet játszhat. Az immunfolyamatok gyógyszeres befolyásolása elkerülhetővé teheti a tonsilla palatina kiirtását, és funkciója az immunvédekező rendszer szabályozásában fokozottabbá válik. A tonsilla palatina lymphocyta elemeinek a pontosabb megismerése jó modellkísérleteket és eredményeket szolgáltat a humán immunfolyamatok megismeréséhez.

#### IRODALOM

- Alexopoulos, C., Papayannis, A. G. és Gardikas, C.: *Acta Haemat.* **55**, 95 (1976).  
 Antoni, F.: *Fül-Orr-Gégegyógy.* **21**, 132 (1975).  
 Antoni, F.: *Biomedizinische Tagung in Seibersdorf.* (1977).  
 Antoni, F. és Bojta, J.: *Biomedizinische Tagung in Seibersdorf* (1977).  
 Antoni, F. és Staub, M.: *Biochemical and Immunological Properties of Human Tonsillar Lymphocytes.* Akadémiai Kiadó, Budapest (1978).  
 Antoni, F., Staub, M. és Puskás, M.: *Orvostudomány* **25**, 107 (1974).  
 Antoni, F. és Puskás, M.: 9th FEBS Meeting, Budapest abs: 470 (1974).  
 Antoni, F., Temesi, A., Kiss, P., Puskás, M. és Lipták, M.: *MBT.* Pécs, II/21 (1977).  
 Atkinson, J. P., Wedner, H. J. és Parker, C. W.: *J. of Immunology* **115**, 1023 (1975).  
 Baló-Banga, J. M., Antoni, F. és Altmann, H.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **44**, 101 (1973).  
 Bojta, J., Antoni, F. és Temesi, A.: *MBT.* Pécs, I/33 (1977).  
 Burnet Macfarlane.: *Self and Not-Self.* Melbourne University Press. (1969).  
 Byus, C. V., Klimpel, G. R., Lucas, D. O. és Russell, D. H.: *Nature* **268**, 63 (1977).  
 Csuka, I., Farkas, Gy., Vincze, I. és Antoni, F.: 12th Ann. Meeting Eur. Soc. Radiat. Biol. Budapest, abs. 26 (1976).



- Csuka, I., Vincze, I. és Farkas, Gy.: MBT. Pécs, S-3/3 (1977).
- Faragó, A., Antoni, F., Takáts, A. és Fábíán, F.: Biochim. Biophys. Acta **297**, 517 (1973).
- Faragó, A., Antoni, F. és Fábíán, F.: Biochim. Biophys. Acta **370**, 459 (1974).
- Faragó, A., Romhányi, T., Antoni, F., Takáts, A. és Fábíán, F.: Nature **254**, 88 (1975).
- Faragó, A., Hasznos, P., Antoni, F. és Romhányi, T.: Biochim. Biophys. **538**, 493 (1978).
- Farkas, Gy., Vincze, I. és Antoni, F.: MBT. Pécs, abs. III/11 (1977).
- Greaves, M. F. és Brown, G.: J. Immunol. **112**, 420 (1974).
- Heise, E. R. és Myrvik, Q. N.: J. Reticuloendothel. Soc. **4**, 510 (1967).
- Hill, I. R. és Porter, P.: Immunology **26**, 1239 (1974).
- Hindenburg, A., Spitznagel, J. és Arnheim, N.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **71**, 1653 (1974).
- Hollingsworth, J. W. és Carr, J.: Cell. Immunol. **8**, 270 (1973).
- Hrabák, A., Antoni, F. és T. Szabó, M.: MIT. Pécs, abs. 18 (1973).
- Hrabák, A., Antoni, F., T. Szabó, M. és Merétey, K.: FEBS 9th Meeting, Budapest (1974).
- Hrabák, A., Antoni, F., T. Szabó, M. és Merétey, K.: MBT. Debrecen, abs. 140 (1975).
- Hrabák, A.: MTA Biol. Oszt. Közl. **19**, 247 (1976).
- Hrabák, A., Antoni, F. és T. Szabó, M.: IUPS 27. Kongresszus Páris, abs. 986 (1977).
- Hrabák, A., Antoni, F., T. Szabó, M. és Merétey, K.: in press.
- Hrabák, A., Antoni, F. és T. Szabó, M.: in press.
- Iwai, K., Ishikawa, K. és Hayashi, H.: Nature **226**, 1056 (1970).
- Köteles, G. J., Antoni, F. és Szabó, L. D.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **22**, 1 (1962).
- Niaudet, P., Beaurain, G. és Bach, M. A.: Eur. J. Immunology **6**, 834 (1976).
- Nossal, G. J. V.: The nature of the immune response. 181—183 p. in: Functional linkage in biomolecular systems. [Ed. by: F. O. Schmitt és D. M. Schneider] Chapter 8. New York, Raven Press. 350 p. (1975).
- Paul, W. E. és Benacerraf, B.: Science **195**, 1293 (1977).
- Piffkó, P., Köteles, G. J. és Antoni, F.: Pract. Oto-rhino-laryngol. **32**, 350 (1970).
- Puskás, M., Antoni, F., Staub, M., Farkas, Gy. és Piffkó, P.: Pract. Oto-rhino-laryngol. **34**, 160 (1972).
- Puskás, M., Staub, M. és Antoni, F.: Biochem. Med. **13**, 359 (1975).
- Puskás, M., Staub, M. és Antoni, F.: Biochem. Biophys. Acta, Suppl. **193** (1975).
- Puskás, M. és Antoni, F.: 3rd European Immunology Meeting (1976).
- Puskás, M., Antoni, F. és Jobbágy, A.: MBT. Pécs, abs. P-1/39 (1977).
- Rogers, J. C., Bolát, D., Kornfeld, S., Skinner, S. A. és Valeri, C. R.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **69**, 1685 (1972).
- Rogers, J. C.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **73**, 3211 (1976).
- Romhányi, T., Faragó, A., Antoni, F. és Sajgó, M.: 11th FEBS Meeting Copenhagen, abstract LA 105 (1977).
- Sasvári-Székely, M., Staub, M. és Antoni, F.: Stud. Biophys. **50**, 161 (1975).
- Sasvári-Székely, M., Vitéz, M., Staub, M. és Antoni, F.: Biochem. Biophys. Acta **395**, 221 (1975).
- Schechter, I.: 11th FEBS Meeting Copenhagen (1977).
- Scott, D. W. és Josephs, S. H.: Cell. Immunol. **20**, 64 (1975).
- Shneyour, A., Patt, Y. és Trainin, N.: J. of Immunology **117**, 2143 (1976).
- Staub, M., Warner, H. R. és Reichard, P.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **46**, 1824 (1972).
- Staub, M., Faragó, A. és Antoni, F.: First International Colloquium, Várna, p. 409. Plenum, New York (1975).
- Staub, M., Antoni, F. és Sellyei, M.: Biochem. Med. **15**, 246 (1976).
- T. Szabó, M. és Antoni, F.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **10**, 31 (1975).
- T. Szabó, M., Antoni, F. és Hrabák, A.: közlés alatt.
- Szamel, M., Somogyi, J. és Antoni, F.: MÉT. Vándorgyűlés, Budapest, abs. 59 (1976).
- Szamel, M., Varró, A., Somogyi, J. és Antoni, F.: MBT. Pécs, abs. 46 (1977).
- Várterész, V., Köteles, G. J., Antoni, F. és Szabó, L. D.: Int. J. Radiat. Biol. **6**, 541 (1963).
- Wedner, H. J., Dankner, R. és Parker, C. W.: J. of Immunology **115**, 1682 (1975).