

УДК 612.017.1

## ІНДУКЦІЯ ПЕРВИННОЇ ТА ВТОРИННОЇ ВІДПОВІДІ З ДОПОМОГОЮ МАКРОФАГАЛЬНОЇ РНК В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ IN VIVO

І. М. Моргунов, М. І. Грутман, М. Я. Оргель

*Кафедра епідеміології Київського медичного інституту; імунологічний відділ  
Київського інституту епідеміології, мікробіології та паразитології*

За порівняно короткий час опубліковано серію праць, в яких описаний можливий ефект, що настає безпосередньо після фіксації антигену макрофагами. Показано, що рибонуклеїнова кислота макрофагів, які захопили антиген, здатна нести інформацію про антиген клітинам, які є попередниками клітин — продуцентів антитіл. Перенесення імунологічної інформації за допомогою РНК щодо утворення антитіл [8], імунітету до трансплантату [19] і клітинного імунітету [14] та невдача викликати ці феномени при обробці препаратів РНК ферментом РНК-азою привели до уявлення, що рибонуклеїнова кислота може служити донатором закодованих відомостей про антиген [7]. Хоч специфічність рибонуклеїнової кислоти макрофагів, що захопили антиген, заперечується даними, які свідчать про наявність фрагментів антигену в препаратах РНК [2, 5, 9, 16], пригнічуючий ефект РНК-ази на індукуючу здатність макрофагальної РНК підкреслює її значимість у процесі взаємодії клітин, які беруть участь в імунних реакціях.

Наше дослідження, виконане з допомогою методу дифузійних камер, проведено з метою вивчення ролі макрофагальної РНК в індукції первинної та вторинної реакції до корпускулярного та розчинного антигенів.

В роботі використані щури Вістар вагою 250—300 г. Донорами «нормальних» клітин служили неімунні тварини. Імунні донори макрофагів та лімфоцитів підготовляли заздалегідь внутріочеревинним введенням за 28—30 днів до експерименту  $10^9$  баранячих еритроцитів або за 8—11 місяців до досліду  $15 \text{ Lf}$  сорбованого дифтерійного анатоксину, дворазово, з інтервалом 21—24 дні.

У день досліду через 2,5 год після введення в черевну порожнину антигену —  $10^9$  баранячих еритроцитів або  $12 \text{ Lf}$  очищеного дифан-анатоксину — та 48 год після виникнення асептичного запалення в черевній порожнині, викликаного введенням 5 мл суміші крохмалю, пептону та суспензії бентоніту, донорів макрофагів забивали, і відбирали перитонеальний ексудат. Ексудати, забруднені кров'ю, відкидали. Клітини перитонеального ексудату (78% макрофагів) осаджували центрифугуванням при 100—150 g протягом 10 хв, промивали одноразово, і з осаду клітин виділяли РНК [3, 21]. В дослідах з баранячими еритроцитами макрофаги спочатку звільняли від нефагоцитованих клітин [20]. Для стабілізації РНК уживалася суспензія бентоніту [10, 15].

Суспензії лімфоцитів селезінки нормальних та імунних донорів готували за методом Краскіної з співроб. [6] у першому градієнті гу-

стини сахарози. В дифузійні камери вводили по 200—250  $\mu\text{кг}$  РНК та  $5 \cdot 10^8$  —  $6 \cdot 10^8$  лімфоцитів. Заповнені дифузійні камери вшивали асептично в черевну порожнину щурів-реципієнтів. Реципієнтами камер служили нормальні тварини, що зазнавали рентгенівського опромінення в дозі 550  $\rho$  за дві доби до досліду.

В ряді дослідів РНК макрофагів, інкубованих з антигеном *in vivo* попередньо приводили до контакту з РНК-азою у відношенні 10:1 —

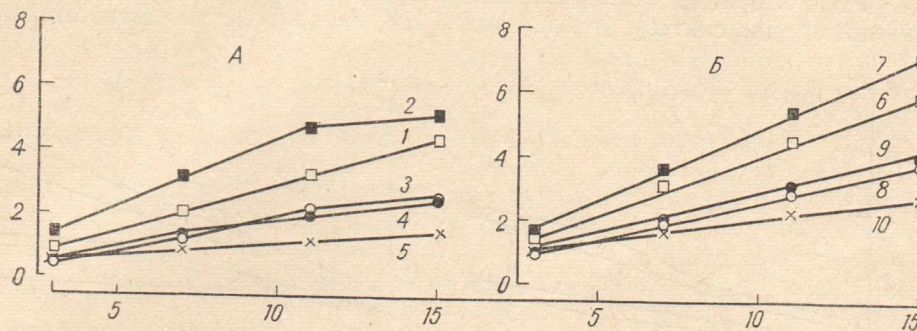


Рис. 1. Синтез гемолізинів у культурах лімфоцитів *in vivo*.

По горизонталі — дні після імплантації дифузійних камер; по вертикалі — логарифми титрів. А — культури нормальних лімфоцитів, Б — культури імунних лімфоцитів. 1 — 10 — номери дослідів.

15:1 при 37° С протягом однієї години, а потім вводили в дифузійні камери з тією ж кількістю лімфоцитів, що й за звичайною постановкою дослідів. Частина дифузійних камер заповнювалася тільки лімфоцитами нормальних або імунних тварин.

Отже, з двома антигенами було проведено десять дослідів на 20 групах реципієнтів, по п'ять тварин у кожній. Кожен дослід відрізнявся від інших тільки за вмістом дифузійних камер. Так, у камери вводили: РНК, одержану від макрофагів, вилучених з черевної порожнини неімунізованих тварин через 2,5 год після внутріочеревинного введення антигену, і умовно позначену як «РНК первинно стимульованих макрофагів», або «РНК-1», разом з лімфоцитами нормальних щурів, або «нормальними лімфоцитами» — в досліді № 1; РНК від макрофагів, вилучених з черевної порожнини імунних тварин через 2,5 год після ревакцинаційного введення антигену, і умовно позначену як «РНК вторинно стимульованих макрофагів», або «РНК-2», разом з лімфоцитами нормальних тварин — в досліді № 2; РНК-1, попередньо оброблену РНК-азою, та нормальні лімфоцити — в досліді № 3; РНК-2, преінкубовану з РНК-азою, разом з нормальними лімфоцитами — в досліді № 4; нормальні лімфоцити як контроль — в досліді № 5; РНК-1 та лімфоцити селезінки імунізованих тварин, або «імунні лімфоцити» — в досліді № 6; РНК-2 та імунні лімфоцити — в досліді № 7; РНК-1, преінкубовану з РНК-азою, разом з імунними лімфоцитами — в досліді № 8; РНК-2, попередньо оброблену РНК-азою, та імунні лімфоцити — в досліді № 9; імунні лімфоцити — в досліді № 10.

Антитіла в сироватці крові опромінених реципієнтів визначали на 3, 7, 11 та 15-й дні після імплантації камер за методом Кебета та Мейера [17] для гемолізинів та за методом Ставитські [22] для дифанатоксину. Ряди логарифмів титрів антитіл обробляли статистично. Результати дослідів наведені на рис. 1 і 2.

В серії дослідів з баранячими еритроцитами (рис. 1) нормальні та імунні лімфоцити давали в дифузійних камерах ледве помітний при-

ріст антитіл (досліди № 5 і 10). РНК макрофагів, преінкубованих з антигеном, була здатна викликати інтенсивний синтез гемолізинів у культурах не тільки імунних лімфоцитів (досліди № 6 і 7), але і лімфоцитів від тварин, які не були раніш у контакті з антигеном (досліди № 1 і 2). Ці результати свідчать на користь уявлення, що РНК макрофагів, які захопили антиген, має достатній «набір відомостей» для збудження процесу утворення антитіл у клітинах лімфоїдного ряду.

РНК вторинно стимульованих макрофагів викликала більш інтенсивний процес синтезу антитіл, ніж РНК первинно стимульованих мак-

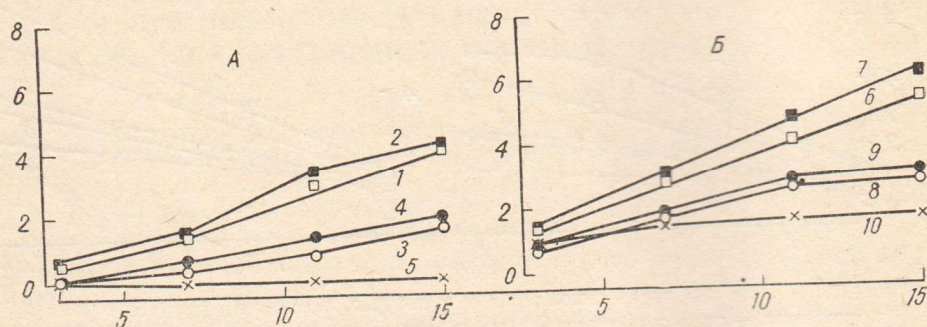


Рис. 2. Синтез антитіл до дифанатоксину в умовах культури лімфоцитів *in vivo*.  
Умовні позначення див. рис. 1.

рофагів: у досліді № 2 приріст антитіл був вірогідно більший, ніж у досліді № 1, а в досліді № 7 — більший, ніж у досліді № 6. Оскільки кількість використаної РНК у всіх дослідіх була постійною, можна припустити, що при фагоцитозі корпускулярного антигену імунними макрофагами виникає «більш імуногенна» субстанція — інформаційна РНК, або комплекс РНК-антиген, — ніж у нормальних макрофагів, яка відрізняється якимись особливостями будови, або, можливо, більшою домішкою антигену.

Водночас імунологічний статус донорів лімфоцитів (нормальна чи імунна тварина) наче зовсім не впливає на характер імунної реакції до баранячих еритроцитів. Після стимулювання імунних лімфоцитів за допомогою як РНК-1, так і РНК-2 продукція гемолізинів не була більшою, ніж в аналогічних дослідіх з культурами нормальних лімфоцитів. Різниця в титрах між дослідіми № 1 та 6, а також між дослідіми № 2 і 7 виявилася статистично невірогідною. Крім того, динаміка утворення антитіл у культурах нормальних та імунних лімфоцитів виявилася схожою. В обох рядах дослідів максимальні титри були зареєстровані на 7—11-й дні. Ці результати узгоджуються з раніше одержаними даними [18], що вторинна реакція щурів на баранячі еритроцити не відрізняється від первинної ні за динамікою, ні за величиною, і що ця схожість пояснюється ніби «ознайомленістю» щурів з гетероантигеном типу «форсманівського» [4]. Є ще інші пояснення цього явища. В нашій роботі гемолізینی не типувалися на 19S- та 7S-імуноглобуліни. Вже було показано [13], що 7S-імуноглобуліни менш ефективні в реакції комплемент-залежного гемолізу, ніж 19S-імуноглобуліни. Можливо, цією недостатньою активністю 7S-антитіл пояснюється відсутність, у наших умовах, видимої різниці між первинною та вторинною реакцією щурів на баранячі еритроцити.

У серії дослідів з дифанатоксином (рис. 2) одержані трохи інші дані. І в цих дослідіх РНК макрофагів, преінкубованих *in vivo* з

антигеном, індукувала синтез антитіл у нормальних та імунних лімфоцитів, які самі по собі не утворювали антитіл (досліди № 5 та 10). Згідно з нашими даними, нормальні лімфоцити в умовах дифузійних камер не утворювали антитіл навіть під час прямого контакту з дифанатоксином, тому поява антитіл при інкубації лімфоцитів *in vivo* з макрофагальною РНК свідчить про важливу роль макрофагів у процесі рецепції і розчинних антигенів.

Проте РНК-2 була неспроможна індукувати більший приріст антитіл, ніж РНК-1. Результати дослідів № 1 та 2, а також № 6 і 7 не були статистично різними. Відсутність різниці в біологічній дії РНК-1 та РНК-2 у дослідях з дифанатоксином і наявність цілком певної різниці в однотипних дослідях з баранячими еритроцитами ще не ясні. Необхідні далі дослідження, щоб прийти до певного висновку.

Величину імунної реакції та її динаміку в дослідях з дифанатоксином зумовлював імунологічний статус донорів лімфоцитів. Один і той же тип РНК, чи від первинно, чи від вторинно стимульованих макрофагів, викликав більший приріст антитіл у імунних лімфоцитів, ніж у нормальних: в досліді № 6 титри були вірогідно більші, ніж у досліді № 1, а в досліді № 7 — більші, ніж у досліді № 2. Динаміка утворення антитіл в умовах дифузійних камер нагадувала динаміку первинної або вторинної реакції на дифанатоксин *in situ*. Найбільші титри в культурі імунних лімфоцитів зафіксовані на третьому — сьомому дні, а в культурі нормальних лімфоцитів — на 11—15-у дні.

Виявилось також, що РНК-аза пригнічує індукуючу властивість макрофагальної РНК. Як у дослідях з баранячими еритроцитами, так і в дослідях з дифанатоксином преінкубація макрофагальної РНК з РНК-азою пригнічує її дальшу здатність викликати синтез антитіл до двох застосованих антигенів при різних типах імунної реакції (досліди № 3, 4 та 8, 9). РНК-2 не виявилася більш стійкою до дії РНК-ази, ніж РНК-1, тому що наслідки цього впливу в обох випадках були схожими: різниця в титрах між дослідями № 3 та 4, а також між дослідями № 8 та 9 була статистично невірогідна. РНК-аза в обраних концентраціях не ушкоджувала здатності лімфоцитів реагувати на корпускулярний та розчинний антиген. Інкубована з РНК-азою РНК все ще була здатна викликати вловимий приріст антитіл, але статистично не відмінний від контрольних значень.

Результати описаних дослідів свідчать про те, що імунологічний статус донорів лімфоцитів зумовлює характер імунної реакції, яка з'являється у відповідь на РНК стимульованих антигеном макрофагів. Вже відомо, що лімфоцити відіграють значну роль не тільки в процесі утворення антитіл, але й у формуванні реакції надмірної чутливості сповільненого типу, яку відносять до патергії [1]. Вже добре відомим став факт бласт-трансформації лімфоцитів крові під впливом специфічного антигену у хворих у стані гіперчутливості сповільненого типу [11]. Було також встановлено, що бласт-трансформація в культурах лімфоцитів стає більш інтенсивною і набуває кращого виразу, якщо в цих культурах присутні макрофаги [12]. У зв'язку з цим можна припустити, що макрофаги являють собою важливу деталь у механізмі виникнення імунних реакцій різного типу, як-от: утворення антитіл або реакції сповільненої гіперчутливості. При цьому роль макрофагів зводиться, цілком ймовірно, до захвату та «опрацювання» антигену, а також до передавання «інформації про антиген» — у вигляді РНК або комплексу РНК-антиген — клітинам лімфоїдного ряду, які безпосередньо здатні відтворювати імунну реакцію того чи іншого типу.

## Висновки

1. РНК макрофагів перитонеального ексудату нормальних та імунних щурів, преінкубованих *in vivo* з баранячими еритроцитами або дифанатоксином, викликала утворення антитіл у культурах лімфоцитів селезінки нормальних і імунних тварин в умовах дифузійних камер.
2. Характер імунної реакції, наведеної макрофагальною РНК, зумовлювався імунологічним статусом донорів лімфоцитів і мав особливості, властиві імунній реакції інтактної тварини на застосований антиген.
3. Індукція синтезу антитіл з допомогою макрофагальної РНК пригнічувалася РНК-азою незалежно від того, чи були донорами макрофагів нормальні або імунні тварини.

## Література

1. Абрикосов А. И.—Арх. патол. анат. и патол. физиол., 1935, 1, 4; Советская клиника, 1935, 19, 109.
2. Аветикян Б. Г., Великосельцева Л. Г.—В сб.: Труды Ленинградск. НИИВС, 1967, 5, 1, 67.
3. Арион В. Я., Мантьева В. Л., Георгиев Г. П.—Молек. биол., 1967, 1, 5, 689.
4. Гурвич Г. А.—IX Междун. конгр. по микробиол. Тез. докл., М., 1966, 599.
5. Кабанова Е. А., Кокорин И. Н.—IX Междун. конгр. по микробиол. Тез. докл., М., 1966, 572.
6. Краскина Н. А., Фонталин Л. Н., Соловьев В. В., Сакова О. В.—Бюлл. exper. биол. и мед., 1965, 60, 7, 78.
7. Фриденштейн А. Я., Чертков И. Л.—Журн. Всес. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1968, 13, 4, 396.
8. Adler F., Fishman M., Drey S.—J. Immunol., 1966, 97, 558.
9. Askonas B., Rhodes J.—Nature, 1965, 205, 470.
10. Brownhill T., Jones A., Stacey M.—Biochem. J., 1959, 73, 434.
11. Elves M., Roath S., Taylor G., Israels M.—Lancet, 1963, 1, 7294, 1292.
12. Hersch E., Harris J.—J. Immunol., 1968, 100, 1184.
13. Humphrey J.—In: Complement, 175 (Churchill, London, 1965). Quoted from: Dresser D., Wortis H.—Nature, 1965, 208, 859.
14. Fong J., Chin D., Elberg S.—J. Exp. Med., 1963, 118, 371.
15. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A.—Virology, 1961, 14, 54.
16. Friedman H., Stavitsky A., Solomon J.—Science, 1965, 149, 1106.
17. Kabat E., Mayer M.—In: Exper. Immunochem. Charles C. Thomas Publisher., 1964, 133.
18. La Via M.—J. Immunol., 1964, 92, 252.
19. Mannick J., Egdahl R.—Ann. Surgery, 1962, 156, 356.
20. Morita T., Perkins E.—RES (N. Y.), 1965, 2, 406.
21. Scherrer K., Darnell J.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, 7, 486.
22. Stavitsky A.—J. Immunol., 1954, 72, 360.

Надійшла до редакції  
12.III 1969 р.

# INDUCTION OF PRIMARY AND SECONDARY RESPONSE BY MEANS OF MACROPHAGE RNA IN Lymphocyte CULTURE IN VIVO

I. N. Morgunov, M. I. Grutman, M. Ya. Orgel

Department of Epidemiology, Medical Institute, Kiev; Immunobiological  
Department, Institute of Epidemiology, Microbiology and Parasitology, Kiev

## Summary

The ability of RNA of rat peritoneal exudation macrophages, incubated *in viro* with ram erythrocytes or diphtoxoid, to induce the synthesis of antibodies in diffusion chambers, implanted into the abdominal cavity of irradiated recipients was studied. The data testifying to the important role of macrophages in the process of antibody formation are obtained. Total RNA from macrophages primary or secondary stimulated evoked a statistically considerable increment of antibodies in lymphocyte cultures *in vivo* which themselves did not give antibodies. Incubation of RNA with RNAase inhibited induction of antibody formation.