

ЗАСТОСУВАННЯ АНТИЛІМФОЦИТАРНОЇ ЦИТОТОКСИЧНОЇ СИРОВАТКИ І АНТИЛІМФОЦИТАРНОГО ГЛОБУЛІНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ І КЛІНІЦІ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ГОМОЛОГІЧНОЇ ШКІРИ

Ю. О. Спасокукоцький, С. Ф. Городецька, Ю. Г. Тимошенко

*Відділ експериментальної терапії Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ*

Численні операції з приводу пересадки різних органів і тканин, проведені в СРСР і за кордоном, свідчать про величезну актуальність проблеми подолання тканинної несумісності. Одним із шляхів для розв'язання цієї важливої проблеми є застосування імунодепресивних засобів, серед яких АЛС і АЛГ дістають все більш широке використання в експерименті та клініці.

У зв'язку з розвитком трансплантології в останні роки АЛС почали інтенсивно досліджувати, оскільки вони виявились активними засобами пригнічення імунологічної відповіді організму реципієнта на пересажену донорську тканину [4, 5, 6].

Протягом 1968—1969 рр. Ю. О. Спасокукоцький провадив дослідження по одержанню АЛС, специфічної для різних видів тварин і людини. Особливу увагу було спрямовано на одержання антилімфоцитарного глобуліну — АЛГ, який має всі необхідні властивості антитіл сироватки, відрізняється низькою токсичністю і позбавлений алергенних особливостей — та застосування АЛС і АЛГ при пересадці шкірних трансплантатів.

Останнім часом застосування імунодепресантів, типу АЛС і АЛГ, здатних подовжити виживання гомотрансплантатів, не викликаючи при цьому токсичного впливу на живий організм, становить не тільки теоретичний, а й практичний інтерес.

Методика досліджень

Експерименти проведені на 15 собаках і 75 кроликах. Антигеном для одержання АЛС служили ізольовані клітини лімфатичних вузлів, щільна тканина лімфовузла та ізольовані клітини селезінки. Імунізацію тварин провадили за схемою: а) експресний метод (Ю. О. Спасокукоцький) три-чотири рази через день внутрішньо; б) два цикли внутрішніх введень тричі з інтервалом між циклами у 9—12 днів; в) дворазова імунізація внутрішньо з інтервалом у 14 днів. Для імунізації вводили 1×10^7 клітин. Кролячу АЛС одержували імунізацією собак, а собачу і людську АЛС — імунізацією кроликів.

Титр АЛС визначали за реакцією зв'язування комплементу з гомологічним антигеном і встановлювали титр її в реакції з іншими органами. Гамма-глобулін виділяли за методом Кендалла, визначаючи в ньому вміст білків за методом Лоурі.

В усіх серіях дослідів провадили гематологічний контроль при введенні АЛС і АЛГ для регуляції кількості лімфоцитів у периферичній крові. Особливу увагу звертали на кількісні і якісні зміни лімфоцитів при згаданих впливах. Операцію по пересадці шкірних трансплантатів провадили в стерильних умовах та вивчали строки їх приживлення у собак і кроликів. Пересаджений на вухо реципієнта шкірний трансплантат фіксували шовковими швами. Розмір клаптя $1-2 \times 1,5-2,5$ см. Для запобігання його від підсихання, інфікування і травмування накладали марлеву серветку, змочену антибіотиками, і прозору плівку, які також фіксували в шкірі реципієнта шовковими швами. Дози введеної сироватки становили 0,3—0,5 мл/кг як при одноразовому, так і при багаторазовому впливах АЛГ. Звичайно тваринам вводили АЛС і АЛГ два-три рази до пересадки шкіри і три—п'ять раз після гомотрансплантації у

згаданих кількостях. Способи введення — внутрішній і підшкірний. Для підсилення імунодепресивної дії АЛС і АЛГ використовували фізичний фактор впливу — високочастотне випромінювання, джерелом якого служив генератор СВЧ ЛУЧ-58.

Результати досліджень

Одержано 28 серій АЛС для собак з титром 1 : 100 — 1 : 320, п'ять серій АЛС, специфічних для кроликів, з титрами 1 : 100 — 1 : 160, 15 серій АЛС для людини з титрами 1 : 100 — 1 : 320. Найбільш стійкий імунодепресивний ефект одержано при підшкірному введенні АЛС і АЛГ у собак. На рис. 1 показано зменшення процентного вмісту лімфоцитів у периферичній крові собак, яке чітко проявилось на наступну добу після одноразового введення АЛС. Відновлення кількості лімфо-

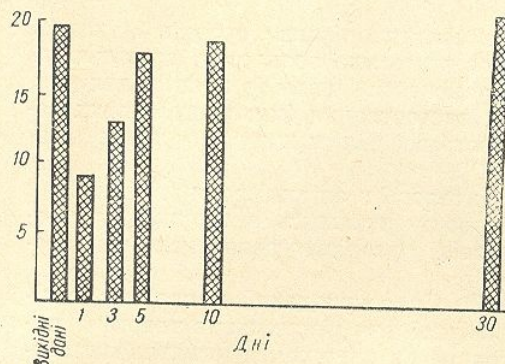


Рис. 1. Зміна вмісту лімфоцитів у собак при одноразовому підшкірному введенні АЛС.

По вертикалі — вміст лімфоцитів у %, по горизонталі — дні після введення.

цитів до вихідного рівня відбувалось лише на десятю добу після введення. При повторних багаторазових введеннях АЛС в експерименті вдалося одержати більш стійку лімфопенію, яка триває до 30 діб. Аналогічні дані виявлені і у кроликів, але у них відновлення кількості лімфоцитів до вихідного рівня відбувалось більш швидко (наступна доба). Усього було проведено п'ять серій дослідів.

У I серії вивчали вплив підшкірних ін'єкцій АЛС на кількість лімфоцитів у периферичній крові та вплив АЛС на приживлення шкірних трансплантатів. У II серії вивчали вплив підшкірних ін'єкцій АЛГ на ті самі показники. У III серії вивчали вплив СВЧ-випромінювань на досліджувані показники. У IV серії вивчали спільне застосування АЛС і СВЧ-випромінювання на досліджувані показники. У V серії досліджували спільне застосування АЛГ + СВЧ-випромінювань на кров і пересадку шкірних трансплантатів.

На рис. 2 наведені дані по зміні абсолютної кількості лімфоцитів у крові кроликів в усіх п'яти серіях дослідів. Найбільш стійка статистично достовірна лімфопенія виявлена у IV і V серіях досліджень, в яких було застосоване спільне використання АЛС і АЛГ з СВЧ-випромінюванням.

Попереднє локальне опромінення різних ділянок лімфатичних вузлів генератором ЛУЧ-58 з ЩПП (щільність потоку потужності) 100 мвт/см², експозицією 10 хв з одноразовим введенням АЛС і АЛГ приводило до різкого зменшення абсолютної і відносної кількості лімфоцитів у периферичній крові у два, а іноді і три рази щодо вихідного

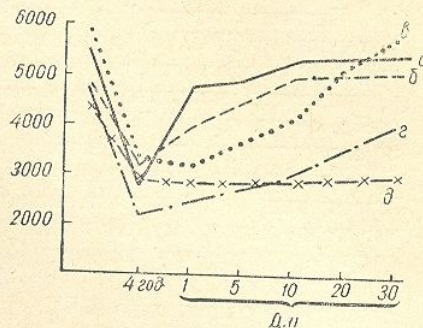


Рис. 2. Зміни абсолютної кількості лімфоцитів у крові кроликів при введенні АЛС.

По вертикалі — абсолютна кількість лімфоцитів, по горизонталі — дні після введення; а — АЛС, б — АЛГ, в — СВЧ, г — АЛС + СВЧ, д — АЛГ + СВЧ.

рівня. Відновле після введення новоти, що тіл фоцитів до вих тистично досто при виникненні застосовуваних усіх серіях дос експерименталь відмінностей ш у вмісті гемогл троцитів.

Слід під шкірної реакції денні АЛС. Зви ня відзначалас великий набряк доби після вве денні АЛГ шкі вираженою, а є кості лімфоциті шення кількост лося внаслідок них елементів н сегментоядерни збільшилась і по

Наступним дослідах з пере слідів провадил і до моменту в торгнення шкір лімфоцитів у пе значали невідпо дії відторгнення шкірних трансп строків прижив підтверджені і в торгнення шкір ро, якому до прижився, прорс ним, на ньому в нення відбулося АЛС по 0,3 мл/к плантатів на чо

Більш трива кликати при ко середньому у цій трансплантатів с серії дослідів у лось лише на 60 СВЧ-випромінен трансплантатів. 10—15 днів скор СВЧ-терапії + А стю, яка росте в

рівня. Відновлення кількості лімфоцитів не спостерігалось і на 30 добу після введення препарату. Віддалене спостереження дозволило встановити, що тільки на 60-у добу відзначено відновлення кількості лімфоцитів до вихідних даних. При цьому з боку кількості лейкоцитів статистично достовірних змін виявити не вдалося, що особливо важливо при виникненні вторинних інфекцій та є доказом високої специфічності застосовуваних сироваток. Ілюстрацією є дані, наведені на рис. 3. В усіх серіях досліджень виражених достовірних змін червоної крові у експериментальних тварин не виявлено. Не було також достовірних відмінностей щодо вихідного рівня і у вмісті гемоглобіну та кількості еритроцитів.

Слід підкреслити виникнення шкірної реакції при підшкірному введенні АЛС. Звичайно на місці введення відзначалась легка гіперемія і невеликий набряк, який тривав протягом доби після введення АЛС. При введенні АЛГ шкірна реакція була менш вираженою, а ефект у зниженні кількості лімфоцитів був стійким. Зменшення кількості лімфоцитів відбувалося внаслідок перерозподілу формених елементів крові у бік збільшення сегментоядерних і паличкоядерних нейтрофілів, кількість яких різко збільшилась і перевищила вихідний рівень.

Наступним етапом досліджень було застосування АЛС і АЛГ в дослідях з пересадкою шкірних трансплантатів. В усіх п'яти серіях дослідів провадили строгий гематологічний контроль як до пересадок, так і до моменту відторгнення шкірного трансплантату. Як правило, відторгнення шкірного трансплантату збігалось з відновленням кількості лімфоцитів у периферичній крові. І тільки в одиничних випадках відзначали невідповідність між ступенем лімфопенії та інтенсивністю реакції відторгнення після введення АЛС і АЛГ. Досліди по пересадці шкірних трансплантатів у собак, які показали можливість подовження строків приживлення шкірних трансплантатів під впливом АЛС, були підтверджені і в дослідях на кроликах. Якщо у контрольних собак відторгнення шкірних клаптів відбувалося на 12—19 доби, то у собаки Сірого, якому до пересадки і після неї вводили АЛС, шкірний клапоть прижився, проростав судинами, був теплим, м'яким на дотик, еластичним, на ньому відзначався ріст волосяного покриву (рис. 4), і відторгнення відбулося лише на 33-ю добу. У кроликів триразове введення АЛС по 0,3 мл/кг приводило до подовження приживання шкірних трансплантатів на чотири—шість днів щодо контрольних тварин.

Більш тривале приживлення шкірних трансплантатів вдалося викликати при комбінованому застосуванні СВЧ-випромінень і АЛС. У середньому у цій серії експериментів подовження приживлення шкірних трансплантатів спостерігалось на сім—десять діб щодо контролю. У цій серії дослідів у кролика № 3 (рис. 5) відторгнення клаптя спостерігалось лише на 60-у добу після пересадки. При спільному впливі АЛГ і СВЧ-випромінень виявлені більш тривалі строки приживлення шкірних трансплантатів. Шкірні клапті у контрольних тварин відторгались на 10—15 днів скоріше в порівнянні з тваринами, яким провадили курс СВЧ-терапії + АЛГ. Всі приживлені клапті з часом покривались шерстю, яка росте в інший бік, ніж шерсть реципієнта.

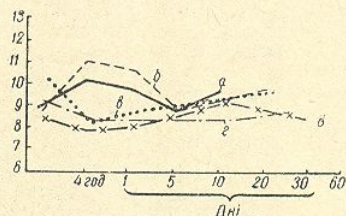


Рис. 3. Зміни кількості лейкоцитів у крові кроликів при введенні АЛС.

По вертикалі — кількість лейкоцитів у тисячах, по горизонталі — дні після введення. Інші позначення див. рис. 2.

Експериментальні дані, одержані на тваринах, дозволили провести комплексні дослідження з Українським республіканським опіковим центром (керівник — проф. О. О. Федоровський).



Рис. 4. Пересадка шкірного трансплантата у собаки.

При застосуванні АЛС і АЛГ основним об'єктивним критерієм їх ефекту дії служило визначення відносної і абсолютної кількості лімфоцитів у периферичній крові. Як правило, курс АЛС-терапії при трансплантації гомологічної шкіри при опіках IVa — IVб ступеня складався з двох—п'яти ін'єкцій. АЛС і АЛГ застосовували у 15 опікових хворих. У п'яти з них гомотрансплантація поєднувалась з введенням АЛС, у

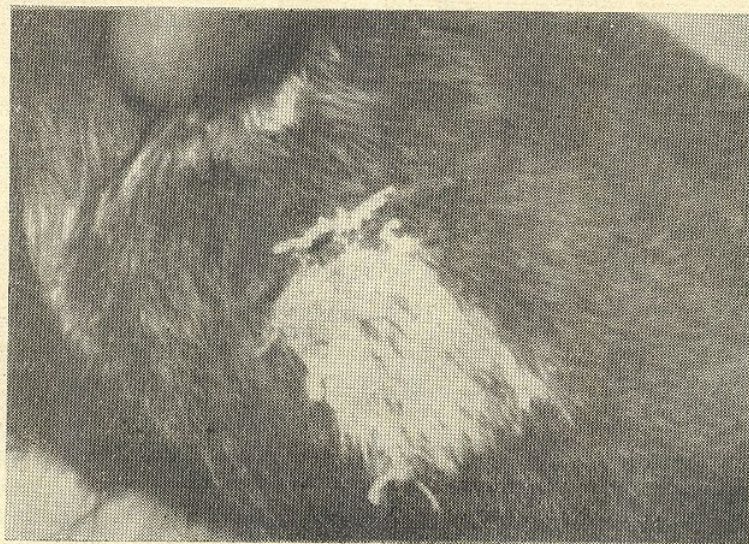


Рис. 5. Пересадка шкірного трансплантата у кролика.

десяти — з введенням препарату АЛС абсолютної кількості лімфоцитів і вище вихідної доби відновлення.

У цих дослідженнях пересаджені гомологічні хворі отримували препарати АЛС і АЛГ 20—25 діб. Терапія достатнього

1. В лабораторії собак і кроликів.

2. Показана оптимальна кількість приживлення АЛС і АЛГ.

3. Розроблено шляхом комбінованого промінювання (АЛС і АЛГ).

4. Введення відносної і абсолютної кількості лімфоцитів життєво важливо.

1. Говалло В. И. докт., М., 1965.
2. Говалло В. И. специфической АЛС.
3. Levej R., Med.
4. Monaco A., W.
5. Waksman B.,
6. Woodruff M.,

APPLICATION OF ANTILYMPHOCYTES WITH TRANSPANTATION

Yu. A. Spasokukotskyi

Department of Experimental Surgery

Under laboratory conditions the aptigens for immunized cells of the lymphatic system

Immunological changes in the blood are studied. Gammaglobulin primary toxicity. In experimental animals without decreasing the rate of reimplantation of skin grafts. The method is developed for the treatment of burns by means of their radiation generator LVS.

десяти — з введенням АЛГ. Через 24 год після підшкірного введення препарату АЛС і АЛГ у хворих відзначалось зменшення відносної і абсолютної кількості лімфоцитів внаслідок збільшення кількості паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів. Кількість лімфоцитів була нижче вихідних даних протягом п'яти діб і лише на п'яту — сьому доби відновлювалась до вихідних величин.

У цих дослідженнях відзначено чітке подовження строків життя пересадженої гомошкіри. Тривалість життя гомотрансплантатів у контрольних хворих коливалась в межах 7—15 днів, а у хворих, яким вводили препарати АЛС і АЛГ, строки життя трансплантатів становили 20—25 діб. Тепер ці дослідження тривають і вимагають нагромадження достатнього фактичного матеріалу.

Висновки

1. В лабораторних умовах одержані АЛС, специфічні для людини, собак і кроликів.

2. Показана можливість відтворення лімфопенії без зменшення загальної кількості лейкоцитів у периферичній крові та подовження строків приживлення шкірних трансплантатів при підшкірних введеннях АЛС і АЛГ.

3. Розроблено метод підсилення імунодепресивної дії АЛС і АЛГ шляхом комбінованого застосування їх з фізичним фактором СВЧ-випромінювання (генератор ЛУЧ-58).

4. Введення АЛС і АЛГ опіковим хворим приводило до зменшення відносної і абсолютної кількості лімфоцитів та чіткого подовження строків життя гомотрансплантатів шкіри.

Література

1. Говалло В. И. — Иммуитет при пересадке органов и тканей. Автореф. дисс. докт., М., 1965.
2. Говалло В. И., Голодневкова В. Н. Руденко Г. Г. — Применение гетероспецифической АЛС при гомотрансплант. кожи, М., 1966, 398.
3. Levej R., Medawar P. — Proc. natl. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 1130.
4. Monaco A., Wood M. — J. Immunology, 1966, 96, 229.
5. Waksman B., Arboujs S., Arnason B. — J. exp. Med., 1961, 114, 997.
6. Woodruff M., Anderson N. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 120, 119.

APPLICATION OF ANTILYMPHOCYTIC CYTOTOXIC SERUM AND ANTILYMPHOCYTIC GLOBULIN IN EXPERIMENT AND CLINIC WITH TRANSPLANTATION OF THE HOMOLOGOUS SKIN

Yu. A. Spasokukotsky, S. F. Gorodetskaya, Yu. G. Timoshenko

Department of Experimental Therapeutics, the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Under laboratory conditions ALS specific for man, dogs and rabbits are obtained. The antigens for immunization were: a) isolated cells of the lymphatic nodule; b) isolated cells of the lymphatic nodule water-salt extract; c) isolated cells of spleen.

Immunological characteristic is given and the immunodepressive action of ALS is studied. Gammaglobulin (ALG) is isolated possessing specificity, effective, devoid of primary toxicity. In experiment and clinic the possibility is shown to obtain lymphopenia without decreasing the total amount in peripheral blood and prolongation of time for reimplantation of skin transplantates with subcutaneous injections of ALS and ALG. The method is developed for intensification of immunodepressive effect of ALS and ALG by means of their combined application with a physical factor of superhigh frequent radiation generator ЛУЧ-58.