

1956, 64,

6, 1342.

редакції
п.

FLEX

ysiology,

evoked
dogs by
that the
nocarotid

УДК 616-097:612.017-11/12

ГУМОРАЛЬНІ ФАКТОРИ ІМУНІТЕТУ У АДРЕНАЛЕКТОМОВАНИХ І НЕОПЕРОВАНИХ МОРСЬКИХ СВИНОК У СТАНІ ГІПЕРЧУТЛИВОСТІ УПОВІЛЬНЕНОГО ТИПУ

Т. К. Валуєва, В. Ф. Чеботарьов, А. В. Антоненко,
Л. Т. Ванюріхіна

Лабораторія імунохімії гормонів Київського інституту ендокринології
і обміну речовин

У відповідності з літературними даними, адrenaлектомія змінює імунологічну реактивність організму [1, 3, 4, 10], що, зокрема, призводить до зниження рівня циркулюючих антитіл.

У наших раніше проведених дослідках було показано, що адrenaлектомія підсилює прояв реакції гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) [2].

Відомо, що у тварин з проявами клітинного імунітету, зокрема й ГУТ, можуть виявлятися антитіла до сенсибілізуючого агента. Їх поява на ранніх стадіях розвитку ГУТ зобов'язана феномену імунного відхилення, а згодом інтенсивне утворення циркулюючих антитіл супроводжує перехід уповільненої гіперчутливості в негайну [7, 11].

Становило інтерес з'ясувати, як на фоні сенсибілізації з метою індукції ГУТ адrenaлектомія впливає на титри антитіл до агента, використаного для сенсибілізації, і до додаткового антигену, що відрізняється від першого як за хімічною структурою, так і за дисперсністю.

Методика досліджень

Досліди проведені на 103 морських свинках-самцях. Як сенсибілізуючий фактор був використаний людський сироватковий альбумін (ЛСА) у повному ад'юванті Фрейнда. Стан ГУТ констатували за наявністю позитивної шкірної проби і специфічним гальмуванням міграції макрофагів *in vitro*.

Роль додаткового корпускулярного антигенного впливу виконували ін'єкції 0,5 мл 30%-ної суспензії еритроцитів барана. Методами для визначення титрів антитіл служили: реакції мікроципепреципітації, пасивної гемаглютинації, пасивної шкірної анафілаксії, прямої гемаглютинації. 7S і 19S-глобулінутворючі клітини у піддослідних тварин у процесі розвитку ГУТ визначали методом Меллера [8]. Для цього з лімфатичних вузлів піддослідних тварин готували суспензію лімфоїдних клітин у розчині Хенкса (рН 7,0). До осаду відмитих лімфоцитів додавали 0,1 мл сироватки проти 7S (19S) глобулінів морської свинки. Після 15-хвилинного інкубування при кімнатній температурі клітини ретельно відмивали розчином Хенкса і додавали мічену флуоресцеїном осялчу антисироватку проти глобуліну кролика, потім знову інкубували протягом 15 хв. Після відмивання від незв'язаної сироватки готували препарати, які переглядали в люмінесцентному мікроскопі МЛ-2.

Результати обробляли статистично для встановлення середньгеометричних величин та їх параметрів.

При дослідженні титрів антитіл до сенсибілізуючого агента нас цікавило не тільки те, як адrenaлектомія впливає на антитілоутворення у тварин, сенсибілізованих для розвитку у них ГУТ, але й наскільки динаміка утворення антитіл залежить від фази алергічного стану.

Результати досліджень та їх обговорення

Найбільш повні дані про наявність антитіл до сенсibilізуючого антигену були одержані з допомогою реакції пасивної гемаглютинації.

У період розвитку ГУТ у всіх піддослідних тварин ці антитіла визначаються в низьких титрах. Починаючи з 13—15-го дня після сенсibilізації, тобто після переходу ГУТ в реакцію негайної чутливості циркулюючі антитіла досягають значно більш високого рівня. Середній їх титр коливався близько $93,4 \pm 1,4$.

Як уже було відзначено, у період розвитку ГУТ висота титрів антитіл невелика. Проте їх порівняння у адrenaлектомованих і неоперованих тварин виявляє тенденцію до зменшення титрів антитіл у оперованих морських свинок ($10,24 \pm 2,98$ і $15,6 \pm 1,85$ відповідно).

Слід відзначити, що у деяких тварин високий титр цих антитіл (до 1:512) виявлявся у ранні строки після сенсibilізації, які передували розвитку ознак гіперчутливості. У таких тварин надалі, як правило, не виявляється позитивна 24-годинна шкірна проба або вона виражена дуже слабо.

На відміну від пасивної гемаглютинації реакцією мікрокільцепреципітації антитіла виявлялись тільки на 15—20-й день після сенсibilізації, тобто на фоні алергії негайного типу. Титр цих антитіл був достатньо високий (1:100 000).

Прийнято вважати, що реакція пасивної шкірної анафілаксії за Оварі [9] виявляє антитіла, фіксовані на клітинах. За наших умов вони з'являлись тільки у пізні строки після сенсibilізації, тобто при появі ознак негайної гіперчутливості. Позитивні результати ці сироватки давали в невеликих розведеннях (1:5,1:10).

У серії додаткових експериментів було показано, що при внутрішньому введенні інтактним тваринам сироватки, одержаної на висоті розвитку ГУТ (восьмий день після сенсibilізації), у них через 5—15 хв на шкірі з'являються темно-чорні плями, кільця або напівкільця. Через 24 год у цих місцях шкіри розвивався некроз. Найвище розведення сироватки, здатне викликати таку реакцію, становило 1:80. Сироватки інтактних морських свинок і сироватки від тварин на інших досліджуваних нами етапах ГУТ не давали подібного ефекту. Вичерпання сироваток екстрактом з шкіри і прогрівання їх при температурі 56°C протягом 30 хв не впливало на описаний ефект. Введення тваринам іншого виду (кролик) не супроводжувалось подібною реакцією. Нормальні сироватки кролика і барана не викликали ніяких шкірних реакцій у морських свинок.

Видимо, на висоті розвитку ГУТ в циркуляцію надходять біологічно активні речовини, даліше вивчення природи і ролі яких у формуванні і розвитку стану уповільненої алергії становить безсумнівний інтерес.

Додаткові дані про можливості синтезу антитіл у сенсibilізованих адrenaлектомованих і неоперованих тварин дають імуофлуоресцентне визначення 19S і 7S-глобуліноутворювальних клітин. Результати цих дослідів наведені в табл. 1.

У сенсibilізованих тварин на висоті ГУТ відбувається значне збільшення кількості клітин, що утворюють 7S і 19S імуноглобуліни. При цьому кількість 19S-глобуліноутворювальних клітин збільшується набагато інтенсивніше. На восьмий день після сенсibilізації кількість клітин, що синтезують 7S глобуліни, вдвоє збільшується щодо інтактних, а кількість клітин, що синтезують 19S молекули, збільшується в 15 раз. У наступні дні кількість 7S-глобуліноутворювальних клітин на-

ростає і до 13-го дня і що синтезують білки з

У адrenaлектомованих тварин чашеється аналогічна динаміка показників відрізнялись від тварин. Якщо кількість налектомованих тварин неоперованих тварин (тін у адrenaлектомованих тварин) ($p < 0,05$). Слід відзначити, що антитілоутворення при [5, 6].

Вміст клітин		
Тип глобуліну	Дні після сенсibilізації	Відносна кількість клітин, що синтезують у ін
7S	8	
	11	
	13	
18S	8	1
	11	
	13	

Застосування дода провадилось без застосування відповіді, яка розвивається в відповіді у заздалегідь характеризуванні здатності імунітету (реакція адrenaлектомія в подібних вплив надниркових залоз на рального імунітету.

Результати визначення наведені в табл. 2.

Обернені величини

Назва групи
Неоперовані + ЛСА еритроцити
Адrenaлектомія + ЛСА еритроцити

ростає і до 13-го дня після сенсibilізації перевищує кількість клітин, що синтезують білки з константою седиментації 19S.

У адреналектомованих тварин на висоті розвитку ГУТ відзначається аналогічна динаміка змін кількості клітин. Проте абсолютні показники відрізнялись від відповідних даних групи неоперованих тварин. Якщо кількість клітин, що утворюють 7S-глобуліни, у адреналектомованих тварин практично не відрізнялась від показників у неоперованих тварин ($p < 0,05$), то кількість 19S-утворювальних клітин у адреналектомованих тварин була майже в три рази меншою ($p < 0,05$). Слід відзначити, що саме цей тип клітин включається в антитілоутворення при первинному антигенному впливі на організм [5, 6].

Таблиця 1

Вміст клітин, що продукують 7S і 19S-глобуліни

Тип глобуліну	Дні після сенсibilізації	Відношення кількості світних клітин у неоперованих сенсibilізованих тварин та у інтактних	Дні після сенсibilізації	Відношення кількості світних клітин у адреналектомованих сенсibilізованих та у інтактних тварин	Відношення кількості світних клітин у неоперованих сенсibilізованих та у адреналектомованих сенсibilізованих тварин
7S	8	2,04	11	2,57	0,795
	11	3,34	12	3,9	0,856
	13	4,48	13	4,15	1,08
18S	8	14,9	11	5,0	2,98
	11	4,0	12	3,0	1,33
	13	2,34	13	2,89	0,81

Застосування додаткового корпускулярного антигенного впливу провадилось без застосування ад'юванта. Це дозволяло чекати імунної відповіді, яка розвивається за гуморальним шляхом. Одержання такої відповіді у заздалегідь сенсibilізованих ЛСА тварин дозволяло характеризувати здатність організму з активними проявами клітинного імунітету (реакція ГУТ) до розвитку гуморального імунітету. Адреналектомія в подібних умовах давала можливість глибоко оцінити вплив надниркових залоз на взаємовідношення клітинного і гуморального імунітету.

Результати визначення титрів аглютининів до еритроцитів барана наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Обернені величини середньгеометричних титрів гемаглютининів та їх довірчі межі

Назва групи	Загальний показник	Відсутність РГУТ в ранні строки	Позитивна РГУТ	Відсутність РГУТ у пізні строки
Неоперовані + ЛСА і еритроцити	19 28—13	20 31,6—13,3	20 26,4—15,5	27 38,8—11,8 $p < 0,01$
Адреналектомія + ЛСА і еритроцити	13 17—10	14 25,5—7,9	15 22,7—10,3	4,49 4,96—4,0

У графі «загальний показник» порівнюються середні титри всіх сенсibilізованих адреналектомованих і неоперованих тварин, що були в досліді, без урахування строків сенсibilізації. Оскільки ці строки у тварин обох груп були однаковими, дані такого роду в порівнянні з I групою характеризують насамперед вплив адреналектомії на формування антитіл до еритроцитів барана.

З табл. 2 видно превалювання середньгеометричного титру у неоперованих тварин, яке хоч і не дістало статистичного підтвердження ($p > 0,05$), збігається з відзначеною раніше низькою чутливістю адреналектомованих тварин щодо гуморальних імунологічних проявів.

Інші показники табл. 2 служать для визначення того, чи позначається етап розвитку ГУТ на рівні циркулюючих антитіл до додаткового антигенного подразника.

Статистично достовірні відмінності між I і II групами були констатовані тільки у тварин у пізні строки після сенсibilізації. На цьому етапі середньгеометричний титр гемаглютининів у неоперованих тварин понад 8,5 раз перевищував аналогічний показник у адреналектомованих морських свинок.

Слід відзначити, що в умовах нашого досліді час між видаленням другої надниркової залози і взяттям сироватки для визначення антитіл був постійним. Незмінним залишався і строк дослідження тварин після імунізації еритроцитами барана (на шостий день після введення), варіювали тільки строки сенсibilізації ЛСА в ад'юванті Фрейнда.

Отже, інтенсивний розвиток ГУТ у адреналектомованих тварин зменшує рівень циркулюючих антитіл до додаткового антигенного впливу. Причини такого впливу ГУТ і механізм його здійснення потребують дальшого дослідження.

Висновки

1. У період розвитку ГУТ до сенсibilізувальної дози ЛСА (20 μ в ад'юванті Фрейнда) в сироватці крові морських свинок, як правило, не виявляються преципітуючі антитіла, а реакцією пасивної гемаглютинації виявляються антитіла тільки в низьких титрах (1:20).

2. У окремих тварин, незважаючи на сенсibilізацію ЛСА в ад'юванті Фрейнда, виявляється високий рівень антитіл до періоду розвитку ГУТ. Згодом такі тварини дають негативну або слабо виражену шкірну реакцію, що, видимо, слід пояснити імунним відхиленням у бік гуморального імунітету.

3. На висоті розвитку ГУТ в сироватці тварин з'являються речовини, що викликають запальні і некротичні зміни при введенні в шкіру інтактних морських свинок.

4. Адреналектомія знижує прояви гуморального імунітету. Це позначається як у реакції на розчинний антиген, застосований для сенсibilізації, так і на додатковий вплив корпускулярним антигеном.

У сенсibilізованих тварин з видаленими наднирковими залозами значно зменшується кількість клітин, що синтезують 19S-імуноглобуліни, які зумовлюють первинну відповідь на антиген.

5. Інтенсивність зниження рівня циркулюючих антитіл до додаткового антигену у адреналектомованих тварин залежить від етапу розвитку ГУТ. Найбільше зниження рівня антитіл до еритроцитів барана в умовах нашого досліді відбувалося на висоті проявів ГУТ до ЛСА.

1. Белокрылов Г. А., Осипов А. В.— Патол. физиол. эксп.
2. Валуева Т. К., Чеботарьов В. Ф.— Патол. физиол. эксп.
3. Иванов В. М.— Вестн. Акад. наук СССР.
4. Иванов В. М.— Патол. физиол. эксп.
5. Незлин Р. С.— Биохим. журн.
6. Фриденштейн А. Я.— Докл. АН СССР, 1968, XIII, 4, 396.
7. Asberson G.— Brit. med. j.
8. Möller G.— J. Exp. med.
9. Ovary Z., Bloch K., E.
10. Perla D. et al.— J. Exp. med.
11. Roitt J., Creaves M.

HUMORAL FACTORS OF IMMUNITY IN ADRENALECTOMIZED AND NON-OPERATED GUINEA PIGS

T. K. Valuyeva,

Laboratory of Immunology

In guinea pigs with induced adrenalec-tomy decreases humoral immunity. The antigen used for sensibilization were lower in adrenalectomized animals. Intensity of level decrease in the level of delayed hypersensitivity reaction. In adrenalectomized animals the number of cells

Література

1. Белокрылов Г. А., Островский А. Д.—ЖМЭИ, 1968, 5, 33.
2. Валуева Т. К., Чеботарев В. Ф., Старикова О. Н., Антоненко А. В.—Патол. физиол. exper. therap., 1972, XVI.
3. Иванов В. М.—Вестн. АМН СССР, 1963, 11, 19.
4. Иванов В. М.—Патол. физиол. и exper. тер., 1964, 8, 3, 16.
5. Незлин Р. С.—Биохимия антител, М., 1966.
6. Фриденштейн А. Я., Чертков И. А.—Журн. ВХО им. Д. И. Менделеева, 1968, XIII, 4, 396.
7. Asberson G.—Brit. med. Bull., 1967, 23, 1, 24.
8. Möller G.—J. Exp. med., 1961, 114, 4, 415.
9. Ovary Z., Bloch K., Benacerraf B.—J. Exp. med., 1963, 117, 1954.
10. Perla D. et al.—J. Exp. med., 1964, 119, 1027.
11. Roitt J., Creaves M. et al.—Lancet, 1969, 11, 7616, 367.

Надійшла до редакції
21.IX 1971 р.

HUMORAL FACTORS OF IMMUNITY IN ADRENALECTOMIZED AND NON-OPERATED GUINEA PIGS IN STATE OF DELAYED HYPERSENSITIVITY

T. K. Valuyeva, V. F. Chebotarev, A. V. Antonenko,
L. T. Vanyurikhina

Laboratory of Immunochemistry of Hormones, Institute of Endocrinology
and Metabolism, Kiev

Summary

In guinea pigs with induced delayed hypersensitivity to human serum albumin adrenalectomy decreases humoral immunity manifestations. Antibody titres to both antigen used for sensibilization and additional antigenous irritant—ram erythrocytes were lower in adrenalectomised guinea pigs than in animals with intact adrenals. Intensity of level decrease in antibodies to the ram erythrocytes was the greatest at a level of delayed hypersensitivity manifestation. In sensibilized guinea pigs with ablated adrenals the number of cells synthetising 19 S-globulins is considerably less.