

УДК 576.8.097.5:612.112.94

АНТИЛІМФОЦИТАРНОГО Ig G
БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЇ

Сенко

ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

(С) і антилімфоцитарний глобулін цих препаратів, що дозволяють напружувати участь у реакціях уповільнення, присвячено питанням впливу імунітету, як приклад такого титру АЛС для імунодепресії при хронічних лімфолейкозах

обхідна наявність досить чистого рин з метою одержання АЛС для лімфоцитів здорових людей.

Важливою кількістю чистого антигену хворих на хронічний лімфолейкоз, що сироватки, одержані лімфоцитами, відрізняються високою титру. Так, є дані про те [21], що титр хворих становить 1 : 2048—1 : 8192, а здорових 1 : 0—1 : 4. Показано, що антилімфоцитарний виразний цитотоксичний ефект чистих [2].

Так, Дюко та ін. [11] не виявили різниці між здоровими і хворими з АЛС. Одержані сироватки для клітин донорів і хворих. Високій структурі лейкозних і здорових, питання про антигенні відмінності залишається спірним.

Одержанні якісної для клініки системи тестування активності її *in vitro*. Здебільшого, на методах визначення активності цитотоксичних антитіл з дією їх *in vivo*.

Імунодепресивної активності АЛС та її реакцію бласттрансформації

Залишили завдання одержати осласного матеріалу лімфоцитів хворих її до імуноглобуліну G(IgG) і вивчення оцінку цьому препарату лімфоцитів людини.

Методика досліджень

Для одержання антилімфоцитарної сироватки був використаний осел, який вперше зазнав імунізації. Антигеном служили лімфоїдні клітини брижових лімфовузлів людей, які померли від хронічного лімфолейкозу. Імунізацію проводили в три цикли з перервою між ними у п'ять днів. Кожен цикл складався з трьох підшкірних ін'єкцій в підлопаткову область суспензії лімфоцитів у кількості від 3×10^8 до $5,7 \times 10^8$ клітин на введення. Всього на курс імунізації вводили 27×10^9 клітин. Сироватку одержали на 13-й день після останньої ін'єкції антигену з титром цитотоксинів 1 : 128 і лімфаглютининів 1 : 512.

З сироватки сульфатним методом (33%-не насичення) виділяли загальну глобулінову фракцію (АЛГ) [17], а потім шляхом дальшого очищення її методом колонкової хроматографії [13] одержували Ig G. Гель-фільтрацію проводили в рефрижераторній кімнаті при $+4^\circ\text{C}$ на колонці ($3,4 \times 105\text{ см}$), заповненій сефадексом G-200. Елюцію здійснювали з допомогою 0,02 M розчину Трис-буфера (pH 8,0) з 0,2 M розчином NaCl. Елюат збирали на колекторі по 5 мл. Швидкість елюції становила 8,5 мл/год. Вміст білка у фракціях визначали методом Лоурі.

Трансформуючу активність Ig G вивчали в мікрометоді реакції бласттрансформації [5] з лімфоцитами периферичної крові здорових людей (20 донорів), хворих на гострий лейкоз (8 осіб) і хронічну форму лімфолейкозу (6 осіб). В реакції використовувалося 0,4 мл дефібринованої крові. Як мітоген для стимуляції бласттрансформації лімфоцитів застосовували 500 мкг/мл фітогемаглютиніну (ФГА) вітчизняного виробництва. Стимулюючи і імунодепресивну дози Ig G підібрали дослідним шляхом, вони дорівнювали 100 і 600 мкг/мл відповідно. В культурах з вивченням імунодепресивної активності препарату лімфоцити спочатку обробляли Ig G, інкубували протягом 30 хв при 37°C , відмивали середовищем 199, а потім додавали ФГА. Трансформацію лімфоцитів вивчали в чотирьох системах: 1) при культивуванні клітин без мітогену (контроль на середовищі), 2) в присутності ФГА (контроль на функціональну активність лімфоцитів), 3) в присутності Ig G, 4) в присутності АЛГ (250—750 мкг/мл).

Культивування тривало 72 год в середовищі 199 з 20% сироватки крупної рогатої худоби, без антибіотиків. Мазки забарвлювали азур-еозином. Для кількісної оцінки трансформованих лімфоцитів підраховували 500 і більше клітин у препараті. Клітини диференціювали у відповідності з наведеною в літературі номенклатурою [3, 6, 20]. Інтенсивність реакції виражали в процентах. При мікроскопічному вивченні препаратів ми спостерігали переважно чотири групи клітин: лімфобласти, макрофаги, перехідні клітини, які були крупніші, ніж нормальні лімфоцити, але менші, ніж лімфобласти, з наростаючою базофілією цитоплазми та малі лімфоцити, зрідка мітози.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень наведені в таблиці, з якої видно, що в триденних культурах лімфоцитів периферичної крові здорових людей без додавання ФГА або АЛГ зберігається високий процент нормальних лімфоцитів (у середньому $93 \pm 9,1\%$, рис. 1, а). І тільки незначна частина їх трансформується переважно в макрофаги ($4 \pm 0,6\%$, рис. 1, б).

Додавання до культури ФГА (500 мкг/мл) викликає виразний ефект трансформації лімфоцитів у різні клітинні форми. Високий процент лімфоцитів розвивається по лінії бластів ($59 \pm 5,23\%$), частина з них перетворюється на перехідні клітини ($13,8 \pm 2,91\%$). В окремих випадках відзначені мітози (рис. 2).

Аналогічну картину трансформації нормальних клітин викликає АЛГ (250 мкг/мл) і, особливо, імуноглобін G, який в дозі 100 мкг/мл, тобто в два з половиною рази меншій, ніж доза гамма-глобуліну, викликає майже такий самий ефект, як і перший препарат. Так, під впливом АЛГ трансформується в середньому 49% лімфоцитів, а під впливом IgG — 43%.

Паралельно з стимулюючою активністю в культурах нормальних лімфоцитів вивчали імунодепресивну здатність цих препаратів. Шляхом відбору доз було встановлено, що імунодепресивною дозою для АЛГ є 850 мкг/мл, для IgG — 600 мкг/мл. Результати цих досліджень наведені в тій же таблиці, з якої видно, що збільшення доз препаратів у

Результати реакції бласттрансформації лімфоцитів у культурі *in vitro* здорових людей і хворих на гострий і хронічний лімфлейкоз ($M \pm m$)

Група обслідуваних	Системи культивування					
	Без антигену			ФГА-500 мкг/мл		
	лімфоцити	перехідні клітини	макрофаги	бласти	лімфоцити	перехідні клітини
Здорові (20 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	93±6,1	2,58±0,32	4±0,6	0,42±0,01	37±3,4	3,8±2,91
						63
						59±5,23
Хворі на гострий лейкоз (8 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	42,5±7,31	9,8±2,76	3,8±0,99	44,2±8,17	28,7±4,65	5,2±1,0
						71,3
						64,1±13,3
Хворі на хронічний лімфлейкоз (6 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	94,5±13,11	1,4±0,04	4,1±1,21	0±0	60,0±9,83	11±1,62
						40
						13±3,73
Група обслідуваних	Системи культивування					
	Гамма-глобулін					
	250 мкг/мл					
Здорові (20 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	51±6,0	17±3,61	9±1,1	23±4,34	75±9,0	16,3±3,4
						25
						3,4±0,31
Хворі на гострий лейкоз (8 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	35±7,09	8,7±2,3	3,3±1,74	53±11,0	39±9,8	13,4±3,18
						61
						47±7,78
Хворі на хронічний лімфлейкоз (6 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	76±9,90	4,9±0,97	15±3,54	4,1±0,41	89±6,45	8±0,38
						11
						0,9±0,04
Група обслідуваних	Системи культивування					
	Імуноглобулін					
	100 мкг/мл					
Здорові (20 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	57±5,2	14±2,49	6±2,51	23±5,42	76,9±12,8	6,3±2,7
						23,1
						4,8±0,44
Хворі на гострий лейкоз (8 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	24±6,12	13±3,22	2±0,01	61±14,5	39±5,09	5,5±2,4
						61
						49±7,70
Хворі на хронічний лімфлейкоз (6 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	69±7,28	5±0,93	16±4,15	10±2,4	81±14,0	7±2,11
						10
						0±0

Вивчення активності антилімфоцитарно

3,5—6 разів викликає пригнічення, що заздалегідь протягом 30 хв о дозою досліджуваних препаратів чій дозі (500 мкг/мл), то в три значна кількість трансформовані проти 49% при застосуванні стиму 23,1 проти 43%. Слід відзначити зменшується, головним чи

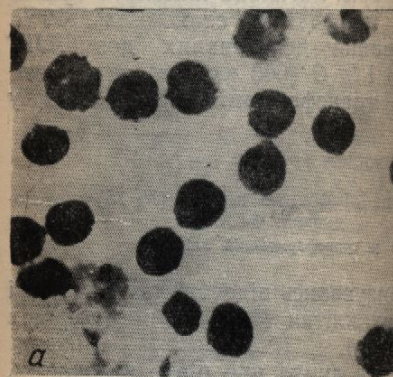


Рис. 1. Культура лімфоцитів до а — в препараті спостерігаються типові малі формовані

бластів. Процент їх у культурах виявляється зовсім незначним — застосуванні стимулюючих доз А.

Отже, вивчення стимулюючої реакції бласттрансформації показують достатню активність щодо вих людей.

Слід відзначити, що ці результати про те, що основна активність ажжена, головним чином, у фракції

Наступним етапом роботи було з лімфоцитами лейкозних хворих, ще згаданих літературних даних антигенному складі нормальних, ли в даних дослідках одержати бі пригнічення лейкозних лімфоцитів

Дослідження культур лімфоцитів ні цитостатичної терапії і трансформольних, тобто нестимульованих і гострий лейкоз, виявлено у серед ±1,7% перехідних клітин, 3,8±1 лімфоцитів. Додавання до культу цент трансформованих клітин у контролі. Збільшення відбулося в стів. Депресивні ж дози цих препаратів до перетворення в інші форми. С зою IgG виявлено в середньому 24 ли трансформованими, то в культурі

Хворі на гострий лейкоз (8 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	35±7,09	8,7±2,3	65	3,3±1,74	53±11,0	39±9,8	13,4±3,18	61	0,6±0,03	47±7,78
Хворі на хронічний лімфлейкоз (6 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	76±9,90	4,9±0,97	24	15±3,54	4,1±0,41	89±6,45	8±0,38	11	2,1±0,38	0,9±0,04
Група обстежуваних										
Системи культивування										
Імуноглобулін										
100 мкг/мл										
600 мкг/мл										
Здорові (20 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	57±5,2	14±2,49	43	6±2,51	23±5,42	76,9±12,8	6,3±2,7	23,1	12±1,17	4,8±0,44
Хворі на гострий лейкоз (8 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	24±6,12	13±3,22	76	2±0,01	61±14,5	39±5,09	5,5±2,4	61	6,5±1,2	49±7,70
Хворі на хронічний лімфлейкоз (6 осіб) Загальний процент трансформованих клітин	69±7,28	5±0,93	31	16±4,15	10±2,4	81±14,0	7±2,11	19	12±3,0	0±0

3,5—6 разів викликає пригнічення реакції бласттрансформації. Так, якщо заздалегідь протягом 30 хв обробляти нормальні лімфоцити великою дозою досліджуваних препаратів, а потім додавати ФГА в стимулюючій дозі (500 мкг/мл), то в триденних культурах спостерігається менш значна кількість трансформованих клітин: у культурах з АЛГ — 25% проти 49% при застосуванні стимулюючої дози і для IgG — у середньому 23,1 проти 43%. Слід відзначити, що кількість трансформованих клітин зменшується, головним чином, внаслідок зменшення утворення

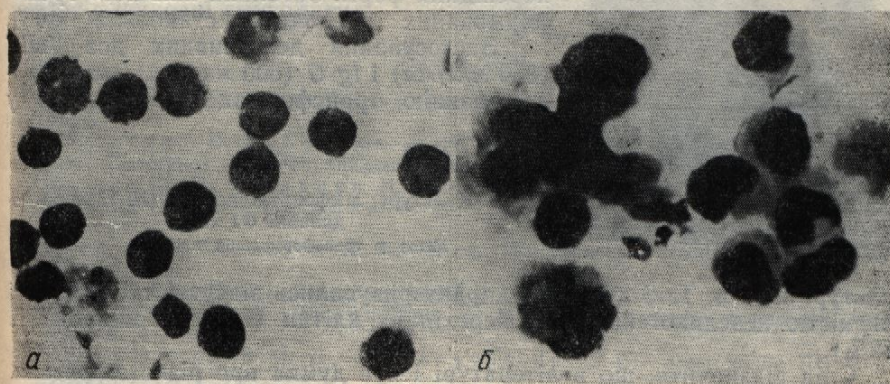


Рис. 1. Культура лімфоцитів донора (№ 17) без стимуляції (контроль). а — в препараті спостерігаються типові малі лімфоцити; б — в полі зору частина лімфоцитів, трансформованих у макрофаги.

бластів. Процент їх у культурах з імунодепресивними дозами препаратів виявляється зовсім незначним — $3,4 \pm 0,31$ — $4,8 \pm 0,44\%$ проти 23% при застосуванні стимулюючих доз АЛГ і IgG.

Отже, вивчення стимулюючих і імунодепресивних доз АЛГ і IgG в реакції бласттрансформації показало, що ці препарати, особливо IgG, мають достатню активність щодо лімфоцитів периферичної крові здорових людей.

Слід відзначити, що ці результати підтверджують літературні дані про те, що основна активність антилімфоцитарних препаратів зосереджена, головним чином, у фракції IgG сироватки (16).

Наступним етапом роботи було проведення аналогічних досліджень з лімфоцитами лейкозних хворих. При цьому, виходячи з деяких раніше згаданих літературних даних про можливі специфічні відмінності в антигенному складі нормальних і лейкозних лімфоцитів, ми передбачали в даних досліджах одержати більш виразний ефект трансформації або пригнічення лейкозних лімфоцитів у культурі *in vitro*.

Дослідження культур лімфоцитів лейкозних хворих проведено на фоні цитостатичної терапії і трансфузій крові. Як видно з таблиці, в контрольних, тобто нестимульованих культурах лімфоцитів людей, хворих на гострий лейкоз, виявлено у середньому $44,2 \pm 8,17\%$ лімфобластів, $8,8 \pm 1,7\%$ перехідних клітин, $3,8 \pm 0,9\%$ макрофагів і $42,5 \pm 7,31\%$ малих лімфоцитів. Додавання до культури ФГА (500 мкг/мл) збільшило процент трансформованих клітин у середньому до 71,3% проти 57,6% у контролі. Збільшення відбулося в основному за рахунок утворення бластів. Депресивні ж дози цих препаратів пригнічували здатність клітин до перетворення в інші форми. Якщо в культурах з стимулюючою дозою IgG виявлено в середньому 24% малих лімфоцитів, а 76% клітин були трансформованими, то в культурах з депресивною дозою процент

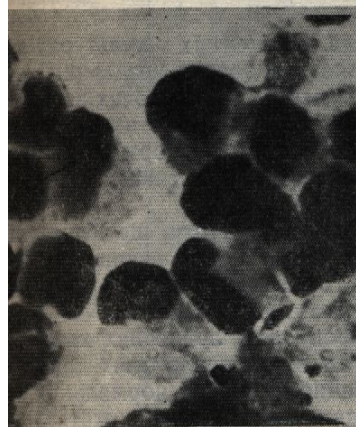
9%), а трансформованих — змен-
з лімфоцитами хворих на хроніч-
тобто контрольних культурах ви-
еажно малі лімфоцити — $94,5 \pm$

А-культурах містилось $13 \pm 1,7\%$
 $6 \pm 3,71\%$ макрофагів і $11 \pm 1,62\%$
х форм. Загальна кількість транс-
х лімфоцитів становила 40%.
сування депресивних доз АЛГ
м) і Ig G (600 мкг/мл) гальмува-
ю трансформації лімфоцитів у

тура лімфоцитів донора (№ 13) при до-
даванні ФГА.
тоз у трансформованій клітині.

геризувались відсутністю бластів і
дних клітин (7%) та макрофагів

існує думка про різке зниження,
оцитами хворих на хронічний лім-
ки при контакті з ФГА [4, 7].



хронічний лімфолейкоз (№ 2) при
ФГА.
макрофаги.

далося спостерігати культуру без
кі клітини були присутні завжди.
становили макрофаги (рис. 3).
вживування лімфоцитів хворих на
дійснене ще в 1913 р. [1], а згодом
ж в усіх культурах без стимуляції
мфоцитів у макрофаги і фібробла-
они зробили висновок про те, що
лімфолейкозу поведатся *in vitro*

приблизно так само, як і лімфоцити нормальної крові. Отже, на підставі
цих даних, очевидно, слід розглядати лімфоцити хворих на хронічний
лімфолейкоз, як клітини, серед яких тільки частина нездатна до транс-
формації під впливом ФГА і АЛГ.

Таким чином в результаті проведених досліджень нами встановле-
но, що ослячий IgG, одержаний проти лімфоцитів хворих на хронічний
лімфолейкоз, є досить активним імунодепресором. Водночас нам не
вдалося виявити відмінностей у дії цього препарату на нормальні і
лейкозні клітини. Його дія поширювалась рівною мірою як на нормаль-
ні, так і лейкозні лімфоцити.

Література

1. Авроров П. П., Тимофеевский А. Д.—Русский врач, 1913, XII, 17, 549; 19, 677.
2. Антоненко В. Т., Красюк А. Н., Бабенко Т. Ф., Бебешко В. Г.—В сб.: Патогенез, лечение и эпидемиология лейкозов, Рига, 1971, 314.
3. Брауде Н. И., Гольдман И. Л.—Изв. АН СССР, сер. биол., 1967, 6, 851.
4. Брауде Н. И., Гриншпун Л. Д., Крючков М. И.—Вестн. АМН СССР, 1968, 65.
5. Глан Л. В., Алексеев Л. П.—В сб.: Иммунологич. аспекты трансплантации, М., 1971, 57.
6. Самойлина Н. Л.—Лаб. дело, 1968, 9.
7. Самойлина Н. Л., Полянская А. М.—Пробл. гематол. и перелив. крови, 1969, 10, 3.
8. Тимофеевський О. Д., Беневоленська С. В.—Мед. журн. АН УРСР, 1945, 14, 1, 107.
9. Тимофеевский А. Д., Беневоленская С. В.—Архив патол., 1947, XIX, 3, 14.
10. Amiel J.—Brux. med., 1970, 50, 3, 185.
11. Ducos J., Ohayon E., Colombies P.—C. r. Soc. biol., 1970, 164, 3, 667.
12. Eilman L., Green I.—Cancer, 1971, 28, 3, 647.
13. Flodin P., Killander J.—Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 3, 403.
14. Horéjsi I., Bednarik T. et al.—Folia biol., CSSR, 1972, 18, 1, 66.
15. Huber H., Michlmayr G., Fudenberg H.—Clin. a. Exptl. immunol., 1969, 5, 6, 607.
16. James K., Pullar D., James V., et al.—Transplantation, 1970, 10, 3, 208.
17. Kendall F.—Цит. за: Е. Кэбот и М. Мейер, «Экспер. иммунохимия», М., 1968, 500.
18. Land W., Brendel W.—Therapie woch., 1971, 21, 7, 534.
19. Monaco A., Wood M., et al.—Antilymphocytic serum. London, 1967, 111.
20. Nowell P. Cancer Res., 1960, 20, 4, 462.
21. Sahasrabudhe M., Prema S., Madyastha K. et al.—Nature, 1971, 232, 5307, 197.

Надійшла до редакції
1.VI 1973 р.

STUDY OF ACTIVITY OF ANTILYMPHOCYTIC IgG FOR A MAN IN BLASTTRANSFORMATION REACTION

L. I. Antonenko

Department of Hypoxic States, the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Properties of the ass antilymphocytic globuline (ALG) and IgG fraction obtained against lymphoid cells of patients with chronic lympholeucosis were studied in the reaction of blasttransformation. A comparative estimation is given for the efficiency of these preparations relative to their action on the lymphocytes of healthy people and patients with lympholeucosis. A high transforming immunodepressive activity with respect to both lymphocytes of healthy people and those of patients with lympholeucosis was found for ALG, and IgG in particular. No differences were found in the effect of the preparations on the used normal and leucosis lymphocytes.