

УДК 616.365.0.185:612.017

В. Т. Антоненко, М. І. Лісяний

МОДЕЛЮВАННЯ ІМУНОЛОГІЧНОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ У ДОРОСЛИХ МОРСЬКИХ СВИНОК АНТИГЕНАМИ ШКІРИ НА ФОНІ ВВЕДЕНЬ АНТИТИМОЦИТАРНОЇ СИРОВАТКИ

Відтворення імунологічної толерантності у дорослих становить складну проблему біології і водночас вкрай необхідну для практичної медицини. Стан невідповідності моделюють на фоні пригніченої імунологічної реактивності, що досягається при впливі на організм опромінення, різних хімічних імунодепресантів, кортикостероїдів і антилімфоцитарних сироваток [6, 8—9, 21, 22, 25, 26].

Антилімфоцитарні сироватки (АЛС), на відміну від інших імунодепресивних препаратів, специфічно впливають, переважно, на лімфоїдну систему і здатні викликати стан толерантності до алотрансплантатів при введенні антисироваток і трансплантаційних антигенів донора [3, 4, 15, 19, 20, 23].

Стан толерантності до алотрансплантата формується в умовах імунодепресії антилімфоцитарної сироватки під впливом антигенів алотрансплантата і згодом підтримується як антигенними впливами алотрансплантата, так і додатковими дозами введених ззовні антигенів [15, 19, 23].

Такий спосіб індукції толерантності значно відрізняється від моделювання толерантності в ранньому постнатальному періоді, коли імунологічно незрілому реципієнту вводять антиген, а потім після імунологічного дозрівання реципієнта здійснюється алотрансплантація шкіри [1, 2, 11, 12, 24].

Отже, способи моделювання толерантності у дорослих тварин відрізняються від спостережуваних у імунологічно незрілих реципієнтів тим, що алотрансплантація у дорослих здійснюється на фоні імунодепресії, а у незрілих — на фоні незрілої імунологічної реактивності.

Методика досліджень

Ми відтворювали імунологічну толерантність у дорослих морських свинок за схемою толерантності, індукованою у імунологічно незрілих реципієнтів. Для цього у морських свинок індукували стан вираженої імунодепресії з допомогою АЛС і на цьому фоні вводили алогенні трансплантаційні антигени донора. Алотрансплантацію шкіри здійснювали через десять днів після введення антигену (це строк, протягом якого у дорослих тварин формується імунологічна толерантність при введенні їм «толерогенних» антигенів типу бичачого гамма-глобуліну) [14, 18].

Як антиген для індукції толерантності використаний водно-сольовий екстракт з антигенів шкіри майбутнього донора алотрансплантатів. Вибір шкірних антигенів для індукції толерантності зумовлений, з одного боку, необхідністю надходження шкірних антигенів з алотрансплантата для підтримання стану толерантності [14], з іншого — в шкірі є велика кількість лімфоїдних елементів, на яких, як відомо, антигени гістосумісності представлені більшою мірою, ніж на інших клітинних елементах.

Досліди проведені на чотирьох групах морських тварин вагою по 350—400 г по шість — десять тварин у кожній групі.

Антитимоцитарну сироватку (АТС) одержували на кроликах за незначно зміненою схемою [19], вводячи по $3,5-4 \cdot 10^8$ клітин тимуса морських свинок у два-три місяці

підшкірно на 1, 3 і 15 день. Кров для одержання сироватки брали на восьмий день після останньої ін'єкції антигену. Одержану сироватку прогрівали при температурі 56°C протягом 30 хв і адсорбували еритроцитами морської свинки. Титр гемаглютининів після адсорбції знижували від 1:128 до 1:8. Титр лімфоцитотоксинів за [16] у пропису [6] становив 1:128.

Антигени шкіри вилучали методом сольової екстракції фізіологічним розчином з подрібненої на заморозувальному мікротомі шкіри майбутніх донорів алотрансплантатів.

У піддослідних тварин досліджували вміст лейкоцитів, лімфоцитів у периферичній крові на шосту добу після введення АТС, за день до пересадки шкіри і на 4, 9, 12 день після пересадки алотрансплантатів.

У тварин деяких груп визначали вміст розеткоутворювальних T і B лімфоцитів у периферичній крові за [17], для чого у тварин вилучали 0,04 мл крові на розчині Олсена (рН розчину доводили до 7,2 та видаляли еритроцити лізісом 0,83% розчином NH_4Cl). Лізовані еритроцити відділяли дворазовим відмиванням середовищем 199, центрифугуючи клітини крові при 1000 об/хв протягом 5–6 хв. Згодом ці клітини крові застосовували в реакції розеткоутворення.

Метод постановки реакції розеткоутворення за [16] полягає в тому, що певну дозу клітин лімфоїдного органа змішували з еритроцитами барани і центрифугували при 800 об/хв протягом 5 хв, після чого інкубували протягом 1 год при 4°C . Потім осад клітин ресуспензували пастерівською піпеткою і додавали 1,2% розчин глутаральдегіду (ФРН) в однаковому об'ємі. Суспензію клітин знову інкубували протягом 30 хв, при 4°C та відмивали клітини після інкубації від глутаральдегіду довольним об'ємом H_2O . Після відмивання осад ресуспензували і наносили клітини на предметні скельця, які після висушування фіксували та забарвлювали за Романовським. У препаратах підраховували 500 лімфоцитів, оточених різною кількістю еритроцитів.

Схема досліду була такою: морським свинкам внутрім'язово вводили по 0,5 мл АТС або нормальної кролячої сироватки (НКС) — контрольна група тварин. На п'ятий і шостий день внутріочеревинно вводили по 1 мл антигенів шкіри, одержаних від майбутніх донорів алотрансплантатів. Кожна тварина одержувала по 16–20 мг білка. Через дев'ять-десять днів після введення антигенів шкіри здійснювали пересадку клаптика шкіри в область спини. Результати досліджень оброблені статистичним методом Монтевічюте—Ерінгене [7].

Результати досліджень

У першій групі семи морським свинкам, яким вводили по 0,5 мл АТС протягом шести днів щодня і по 16 мг білка на п'яту і шосту доби після початку введення АТС, на десятий день здійснювали алотрансплантацію шкіри.

При дослідженні лейкоцитів і лімфоцитів периферичної крові, результати якого наведені на рис. 1 і 2, відзначено різке зменшення вмісту як лейкоцитів, так і лімфоцитів. Так, абсолютний вміст лейкоцитів зменшувався до 3200 ± 1600 при нормі $10\,900 \pm 1100$ в 1 мм^3 , а лімфоцитів — до 2113 ± 518 при нормі 7260 в 1 мм^3 . Отже, до моменту введення антигенів в організмі виявлено знижений вміст лейкоцитів і, особливо, лімфоцитів, що свідчить про виражену антилімфоцитарну активність сироватки.

До десятого дня перед алотрансплантацією кількість лейкоцитів і лімфоцитів у периферичній крові збільшувалась і наближалась до вихідних величин. На четвертий день після алотрансплантації вміст клітин практично відновлювався до норми. Згодом у тварин відзначалось збільшення вмісту лейкоцитів з помітним лімфоцитозом.

У контрольній групі морських свинок, яким замість АТС вводили НКС, на шостий день після її введення виявлено незначне зменшення вмісту лейкоцитів і лімфоцитів у периферичній крові. Так, вміст лейкоцитів становив 8000 ± 2000 в 1 мм^3 , а лімфоцитів 5830 ± 1500 . Після алотрансплантації у морських свинок також відзначався лейко- і лімфоцитоз. Крім того, у тварин, яким вводили АТС або НКС, у периферичній крові визначались у досить високому проценті базофіли. Так, перед алотрансплантацією на фоні імунідепресії у тварин першої групи їх було 7%, а у тварин контрольної групи — 3%. Згодом як у тварин

першої, так і контрольної групи периферичної крові.

Отже, шестиразове введення крові, які поступово відновлювали алотрансплантації, яку проводили в периферичній крові. Після депресії і введення алоантигенів

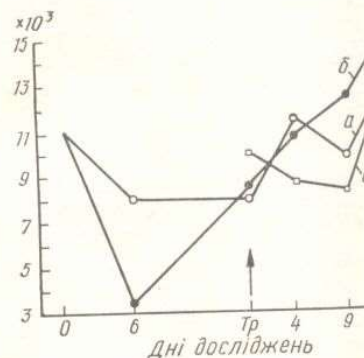


Рис. 1. Зміна вмісту лейкоцитів морських свинок під впливом АТС (а) і НКС (б) при алотрансплантації шкіри.

а — вміст лейкоцитів у периферичній крові тварин, яким вводили два цикли АТС.

алотрансплантатів не вдалося $12,8 \pm 1,2$ дні у тварин першої наставало на $9,2 \pm 1,3$ дні. Отже, АТС і антигенів шкіри донорів на тривалість приживлення шкіри.

В зв'язку з тим, що ефект в чому визначається дозою введення, що в наших дослідженнях стаття для індукції імунологічної толерантності.

Тому для з'ясування цього питання (8 морських свинок) ввели дозу антигенів — 250,0 мг в периферичній крові нага, торгнення трансплантатів у $11,2 \pm 0,8$ дні. Отже, збільшенню живленню алотрансплантатів.

В останній, четвертій групі алотрансплантацією на фоні депресії повторний курс введення крові впливу на імунореактивність по 0,05; 0,1; 0,15 мл з інтервалом.

Повторний курс введення лейкоцитів і лімфоцитів у периферичній крові після алотрансплантації вміст клітин відзначалось його збільшенням цієї групи спостерігалось на

нь після
рі 56°С
ів після
ису [6]

инном з
отранс-

ричний
2 день

юцитів
Олсе-
чином
цент-
крові

певну
и при
і клі-
тегду
при
H₂O,
які
дра-

і мл
ятий
май-
Че-
лап-
дом

ГС
ля
ю

е-
гу

т-
-

т-
-

і

і

першої, так і контрольної групи знижувався вміст базофілів у периферичній крові.

Отже, шестиразове введення АТС викликало зміни в периферичній крові, які поступово відновлювались до десятого дня, тобто до моменту алотрансплантації, яку проводили на фоні нормального вмісту лімфоцитів у периферичній крові. Проте, незважаючи на попередню імунодепресію і введення алоантигенів шкіри, одержати тривале приживлення

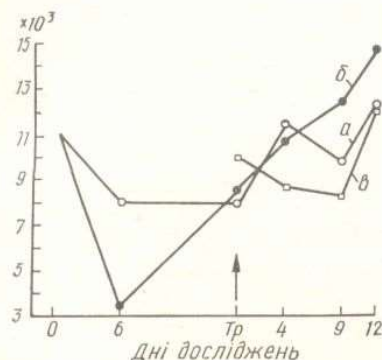


Рис. 1. Зміна вмісту лейкоцитів у морських свинок під впливом АТС (б) і НКС (а) при алотрансплантації шкіри.

а — вміст лейкоцитів у периферичній крові тварин, яким вводили два цикли АТС.

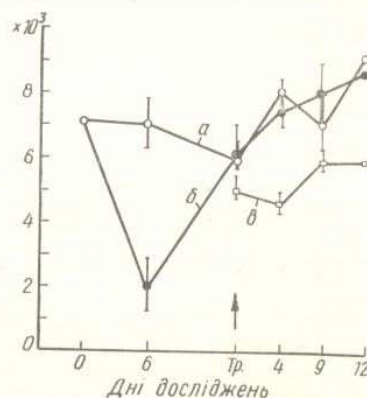


Рис. 2. Зміна вмісту лімфоцитів у морських свинок під впливом АТС (б) або НКС (а) при алотрансплантації шкіри.

а — вміст лімфоцитів у периферичній крові тварин, яким вводили два цикли АТС.

алотрансплантатів не вдалося. Алотрансплантати відторгались на $12,8 \pm 1,2$ дні у тварин першої групи. В контрольній групі відторгнення наставало на $9,2 \pm 1,3$ дні. Отже, тривале введення морським свинкам АТС і антигенів шкіри донора алотрансплантатів істотно не впливало на тривалість приживлення шкіри.

В зв'язку з тим, що ефективність моделювання толерантності багато в чому визначається дозою введенного антигену [13, 24], можна припустити, що в наших дослідах застосована доза антигенів шкіри була недостатня для індукції імунологічної толерантності.

Тому для з'ясування цього питання в наступній групі піддослідних тварин (8 морських свинок) на фоні імунодепресії АТС ми вводили велику дозу антигенів — 250,0 мг цільного гомогенату шкіри. Динаміка змін периферичної крові нагадувала спостережувану в першій групі. Відторгнення трансплантатів у тварин цієї групи відбувалось протягом $11,2 \pm 0,8$ дні. Отже, збільшення дози введенного антигену не сприяло приживленню алотрансплантатів.

В останній, четвертій групі дослідів (10 морських свинок) перед алотрансплантацією на фоні нормалізації вмісту лімфоцитів було проведено повторний курс введення АТС по 0,3 мл тричі через день для додаткового впливу на імунореактивність. Сироватку вводили дрібними дозами по 0,05; 0,1; 0,15 мл з інтервалами 30 хв.

Повторний курс введення АТС в цілому незначно знижував вміст лейкоцитів і лімфоцитів у периферичній крові. Так, на четверту добу після алотрансплантації вміст лімфоцитів становив 4438 ± 1160 . Згодом відзначалось його збільшення. Відторгнення трансплантатів у тварин цієї групи спостерігалось на $11,8 \pm 0,8$ дні.

Отже, нам не вдалося виробити імунологічну толерантність у дорослих індивідів, аналогічну толерантності до високоочищених антигенів або толерантності в період імунологічної незрілості. В умовах імунодепресії відзначалось лише невелике подовження життя трансплантатів, що вказує на більш складний механізм формування толерантності до алотрансплантатів у дорослих морських свинок, ніж у мишей і щурів.

Висновки

1. Введення морським свинкам АТС по 0,5 мл протягом шести днів викликало зменшення вмісту лімфоцитів у периферичній крові до 2113 в 1 мм^3 , зниження вмісту РУК до 37% (при 63% в контролі), а також зменшення фракції T_2 лімфоцитів.

2. Введення морським свинкам антигенів шкіри в дозі 16 або 250 мг на фоні імунодепресії АТС незначно подовжувало життя алотрансплантатів щодо контролю. Специфічної імунологічної толерантності у дорослих морських свинок не вдалося виявити описаним способом.

3. Відторгнення алотрансплантатів у морських свинок, які одержували антигени шкіри і тривалий курс АТС, здійснювалося на фоні зниженого вмісту розеткоутворювальних T -лімфоцитів та збільшеного вмісту B -лімфоцитів.

Література

1. Антоненко В. Т. Сравнительная патофизиологическая характеристика иммунологической толерантности у различных видов животных. — В кн.: Доклады II Украинской конференции патофизиологов. Ужгород, 1962, с. 2—4.
2. Антоненко В. Т. О возможности получения иммунологической толерантности у некоторых животных. — В кн.: Вопросы патол. физиол. Киев, 1963, с. 104—111.
3. Антоненко В. Т., Тимченко А. С. Получение иммунологической толерантности у взрослых животных с помощью антилимфоцитарной сыворотки. — В сб.: Четвертая всесоюзная конференция по иммунопатологии. Ленинград, 1973, с. 54.
4. Антоненко В. Т. Иммунологическая толерантность у взрослых индуцируемая с помощью «моноклональной» антилимфоцитарной сыворотки. — В сб.: Актуальные вопросы клинической иммунологии. М., 1974, с. 29—31.
5. Говалло В. И. Иммунология тканевой несовместимости. М., 1971.
6. Капичников М. М. Методы, основанные на феномене цитолиза. — В кн.: Руководство по иммунологии. М., 1972, с. 325—328.
7. Монцевичюте-Эрингене Е. В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе. — Пат. физиол. эксп. терапия, 1964, 4, с. 71—78.
8. Певницкий Л. А., Фонталлин Л. Н., Соловьев В. В., Новикова Т. К. О роли персистенции антигена в поддержании иммунологической толерантности. — В сб.: Материалы всесоюзной конференции по общей и прикладной иммунологии, М., 1974, в. 2, с. 16—18.
9. Петров Р. В., Зарецкая Ю. М. Трансплантационный иммунитет и радиационные химеры. Атомиздат, 1965.
10. Фонталлин Л. М., Певницкий Л. А., Соловьев В. В. Анализ иммунодепрессивной активности некоторых химиопрепаратов и их использования для создания иммунологической толерантности в постнатальном периоде. — Вестник Академии Медицинских наук СССР, 1970, № 7, с. 75—81.
11. Barnes L., Loutit J., Micklem H. Secondary disease in lethally irradiated mice restored with syngenic or allogenic foetal liver cells. — In: Mechanisms of immunological tolerance, Prague, 1962, 371—379.
12. Billingham R., Silvers W. Quantitative studies in the induction of tolerance of skin homografts by inoculation of newborn mice and rats with homologous cells of different types. — In: Mechanisms of immunol. toler., Prague, 1962, 21—31.
13. Brent L., Gowland A. Induction of tolerance of skin homografts in immunologically components mice. — Nature, 1962, 196, 1298—1299.
14. Dresser D. Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigens. — Immunology, 1962, 5, 378—386.
15. Fisher J., Davis R., Mannick J. The role of the graft in the induction of tolerance by antilymphocyte serum and cellular antigen. — Immunology, 1971, 20, 6, 901—907.

16. Gorer R. H., O'gorman P. The cytotoxic activity of isoantibodies in mice.— *Transpl. Bull.*, 1956, 3, 142—156.
17. Haskill J. J., Ellioff B. E., Kerbel R., Axelrod M. A., Edinger D. Classification of Heymus — derived and Marrow derived lymphocytes by demonstration of their antigen-binding characteristics.— *J. Exp. Med.*, 1972, 6, 135, 1410—1415.
18. Horiuchi A. G., Waksman B. H. Role of the thymus in tolerance. IV. Tolerance to bovine gammaglobulin in rats given a low dose of irradiation and injection of nonaggregated or aggregated antigen into the shielded thymus.— *J. Immunol.*, 1968, 100, 5, 974—978.
19. Lance E. M., Medawar P. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IX. Induction of tolerance with antilymphocytic serum.— *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 1969, 173, 1033, 447—472.
20. Levey R. H., Medawar P. B. Some experiments on the action of antilymphoid antisera.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1966, 129, 164—169.
21. Levey R. H., Medawar P. V. Nature and mode of action of antilymphocytis antiserum.— *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1966, 56, 1130—1140.
22. Medawar P. B. Theories in immunological tolerance immunity aspects.— In: *Ciba Foundation Symposium Antilymphocytic serum*, London, 1967, 134—148.
23. Monace A. P., Abbott W., Othersen H., Simmons R., Wood M. L., Gray M. H., Russel R. Antiserum to lymphocytes: Prolonged survival of canine renal allografts.— *Science*, 1966, 153, 1264—1267.
24. Mitchison N. H. Long-term processes in paralysis.— In: *Mechanisms of immunological tolerance*, Prague, 1962, 245—257.
25. Murray J. E. Skin grafts in irradiated rabbits treated with marrow from single and multiple donors.— In: *Biol. Probl. Grafting*, Liege, 1959, 354—361.
26. Schwartz R., Domeshek W. Drug-induced Immunological Tolerance.— *Nature*, 1959, 183, 4676, 86—87.
27. Waksman B. H., Arbouys S., Arnason B. The use of specific «lymphocyte» antisera in inhibite hypersensitive reactions of the delyed type.— *J. Exp. Med.*, 1961, 114, 997—1013.

Центральна науково-дослідна лабораторія
Київського інституту удосконалення лікарів

Надійшла до редакції
1. IV 1975 р.

V. T. Antonenko, N. I. Lisjany

MODELLING OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN ADULT GUINEA PIGS BY SKIN ANTIGENS AGAINST A BACKGROUND OF ANTITHYMOCYTIC SERUM

Summary

Possibility to model immunological tolerance by means of ATS and donor skin antigens with allotransplantation 10 days after introduction of antigens was studied in guinea pigs.

It was found that irrespective of the introduced dose of antigens (16 mg or 250 mg) or additional course of ATS, no essential differences were detected in prolongation of allotransplants survival time, in spite of a decrease in the amount of lymphocytes and number of rosette-forming cells in circulation under multiple administrations of ATS. It is supposed that B lymphocytes simultaneously with other factors might be of significance for the mechanism of transplantation immunity formation in guinea pigs.

Central Research Laboratory, Advanced Training
Institute for Doctors, Kiev

УДК 616—089.843:615.363.018.532.015.44

В. Т. Антоненко, Н. П. Зюбіна

ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ О В ЛІМФОЇДНИХ ОР ПРИ ФОРМУВАННІ ТРА ТА ІМУ

Недостатня дослідженість на молекулярному рівні при вивчення патобіохімічних механізмів дії антигенів на лімфоїдні з сучасних уявлень про те, що в'язаний з динамікою окисно-вуглеводного обміну, вивчення деяких лімфоїдних органів кроликів різних імунних станів: при се-ми (пересадка шкіри, трансплантація) при дії антилімфоцитного препарату.

Оскільки одним з шляхів нізми імунотенезу є вплив на ми, великий інтерес у дослідженні клімає також з'ясування механізмів антитілу, які містять спостережень відомо, що АЛ-ний і лімфопенічний ефект. П-метаболічні процеси в лімфо-вузлах) щурів і мишей є вказівкою РНК, ДНК в дослідних *in vivo* ний стимулюючий вплив АЛ нах [14], в культурі селезінки ратурі теорії механізму дії А-логічних і цитологічних досліджень цей ефект.

Водночас механізми д-процеси органів ретикуло-ен-лені на прикладі антиретин-найближчого аналога АЛС, ваток [1, 3, 8—10]. Так, бу-сичних сироваток посилюють процеси [8—10]. Великі до-обмінних процесів [1, 4, 5, 7]

Me

Для розв'язання поставленого резонансу (ЕПР), що дозволяє окисно-відновних реакцій у диха-