

УДК 616—089.843:615.363.018.532.015.44

В. Т. Антоненко, Н. П. Зюбіна, В. А. Кузьменко, В. І. Федорченко

ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ПРОЦЕСІВ
В ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНАХ КРОЛИКІВ І ЩУРІВ
ПРИ ФОРМУВАННІ ТРАНСПЛАНТАЦІЙНОГО ІМУНІТЕТУ
ТА ІМУНОДЕПРЕСІЇ АЛС

Недостатня дослідженість механізму формування імунної відповіді на молекулярному рівні при пересадці органів визначає необхідність вивчення патобіохімічних механізмів сенсibiliзуючої дії трансплантаційних антигенів на лімфоїдні елементи органів імуногенезу. Виходячи з сучасних уявлень про те, що біосинтез антитіл, як і інших білків, пов'язаний з динамікою окисно-відновних процесів у клітинах, ми поставили завдання вивчити деякі показники окисно-відновних процесів у лімфоїдних органах кроликів і щурів (тимус, селезінка, лімфовузли) при різних імунних станах: при сенсibiliзації трансплантаційними антигенами (пересадка шкіри, трансплантація лімфоїдних клітин і тимоцитів), а також при дії антилімфоцитарної сироватки (АЛС), як імунодепресивного препарату.

Оскільки одним з шляхів направленого впливу на регуляторні механізми імуногенезу є вплив на лімфоїдну систему специфічними антитілами, великий інтерес у дослідників протягом останніх десяти років викликає також з'ясування механізму імунодепресивної дії антилімфоцитарних антитіл, які містяться в АЛС. З літературних даних і власних спостережень відомо, що АЛС *in vitro* або *in vivo* виявляє цитотоксичний і лімфопенічний ефект. При вивченні впливу гетерологічних АЛС на метаболічні процеси в лімфоїдних органах (тимус, селезінка, лімфовузли) щурів і мишей є вказівки про інгібуючий вплив АЛС на синтез РНК, ДНК в дослідях *in vivo* [13, 17, 21, 22]; в дослідях *in vitro* показаний стимулюючий вплив АЛС на синтез РНК, ДНК в лімфоїдних клітинах [14], в культурі селезінкових клітин [18, 19]. Проте, описані в літературі теорії механізму дії АЛС, що ґрунтуються на результатах морфологічних і цитологічних досліджень, не можуть повною мірою пояснити цей ефект.

Водночас механізми дії цитотоксичних антитіл на метаболічні процеси органів ретикуло-ендотеліальної системи дещо глибше висвітлені на прикладі антиретикулярної цитотоксичної сироватки (АЦС), найближчого аналога АЛС, а також протиорганних цитотоксичних сироваток [1, 3, 8—10]. Так, було показано, що стимулюючі дози цитотоксичних сироваток посилюють обмінні процеси, зокрема окисно-відновні процеси [8—10]. Великі дози цитотоксинів приводять до пригнічення обмінних процесів [1, 4, 5, 7].

Методика досліджень

Для розв'язання поставленого завдання ми користувались методом парамагнітного резонансу (ЕПР), що дозволяє реєструвати вільнорадикальні проміжні продукти окисно-відновних реакцій у дихальному ланцюгу мітохондрій, визначення цитохром-

с-оксидазної активності та інтенсивності дихання в лімфоїдних органах щурів при ало-сенсibiliзації і введенні АЛС.

Вимірювання сигналів ЕПР ліофілізованих зразків лімфоїдних тканин здійснювали на радіоспектрометрі РЕ-1301 при кімнатній температурі. В усіх досліджуваних лімфоїдних органах кроликів і щурів виявлені характерні лінії ЕПР з *g*-фактором, близьким до *g*-фактора вільного електрона.

Антилімфоцитарні сироватки одержували імунізацією кроликів гомогенатом тимуса, селезінки, брижових лімфовузлів за схемою імунізації [23] в нашій модифікації. Активність АЛС досліджували в цитотоксичному тесті [15]. В ряді випадків АЛС одержували із застосуванням стимулятора Фрейнда. Дію АЛС *in vivo* вивчали на щурах неінбредної лінії Вістар, середньою вагою 120 г.

Цитохром-с-оксидазну активність в лімфоїдних органах щурів визначали за [20] і виражали в індофенольних одиницях на 1 мг білка. Білок у тканинах визначали за [16], дихання — методом Варбурга. Досліди проведені при трансплантації на восьми кроликах, 50 щурах, імунодепресії — на 240 щурах.

Результати досліджень

В дослідях на кроликах по пересадці алотрансплантата шкіри вуха (2·2,5 см) методом ЕПР було показано, що на третю добу після трансплантації вміст вільних радикалів у регіонарних по відношенню до трансплантата лімфовузлах збільшується на 13%, у селезінці — зменшується на 30%. В тимусі та віддалених лімфовузлах від трансплантата відхилення концентрації вільних радикалів не відзначено.

Сенсibiliзація кроликів антигенами тимуса і лімфовузлів на шосту добу після одноразового внутріочеревинного введення 450 млн лімфоцитів і 100 млн тимокитів на одного кролика викликає підвищення концентрації вільних радикалів в усіх лімфовузлах (мезентеріальних, підщелепових, під'язових, підколінних). В селезінці накреслювалась незначна тенденція до збільшення вмісту вільних радикалів, у тимусі не виявлено відхилення концентрації вільних радикалів.

Алотрансплантація шкіри щурам неінбредної лінії Вістар, вагою 150—180 г викликає підвищення концентрації вільних радикалів у тимусі на першу, третю доби після трансплантації: перша доба — на 16% ($p < 0,04$), третя доба — на 12% ($p < 0,1$).

У печінці кроликів на третю добу після алотрансплантації шкіри відзначалось підвищення концентрації вільних радикалів на 20%, на шостий день сенсibiliзації — зниження на 26%. На першу добу після алотрансплантації шкіри у щурів відзначалось підвищення концентрації вільних радикалів у печінці на 20% ($p < 0,09$), а на сьому добу — зниження на 36% ($p < 0,007$).

У зв'язку з проведеними дослідженнями впливу трансплантаційних антигенів на вільнорадикальні процеси в лімфоїдних органах щурів і кроликів становило інтерес вивчення дії АЛС *in vivo* на досліджувані показники в лімфоїдних органах щурів та їх взаємозв'язку з активністю цитохром-с-оксидази, кінцевої ланки дихального ланцюга і диханням в лімфоїдних органах. Дослідження показали, що вплив АЛС на вільнорадикальні процеси, а також на цитохромоксидазну активність у лімфоїдних органах щурів неоднозначно і істотно залежить від титру цитотоксичних антитіл. АЛС з титром 1 : 64, 1 : 256 при шестиразових внутріочеревинних щоденних введеннях по 0,2 мл/100 г ваги знижують концентрацію вільних радикалів у тимусі, селезінці, брижових лімфовузлах у середньому на 20% ($p < 0,001$). Концентрація вільних радикалів при чотириразовому щоденному введенні АЛС з титром цитотоксинів 1 : 128 знижується в тимусі на 17%, у селезінці на 21%. Водночас при введенні АЛС з титром 1 : 128 цитохромоксидазна активність знижується в тимусі на 15% ($p < 0,03$), у селезінці на 17% ($p < 0,3$, рис. 1).

При дії АЛС з титром 1 : 10 калів підвищувалась у тимусі і селезінці при внутріочеревинному введенні АЛС чотириразовому щоденному введенню (рис. 1). Для вивчення прямої дії антилімфоцитарних сироваток на окисно-відновні процеси мітохондрій клітин

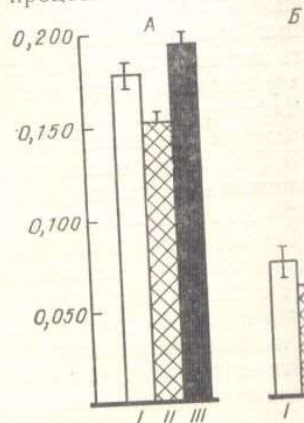


Рис. 1. Вплив кролячої анти-АЛС (титр 1 : 128) — II і АЛС (титр 1 : 64) — III на цитохром-с-оксидазну активність в тимусі (А) і селезінці (Б) щурів (чотириразові щоденні введення).

По вертикалі — індофенольна од. білка. По горизонталі: I — інтактні тварини, II — після одноразового введення, III — після чотириразового введення.

Рис. 2. Вплив кролячих анти-АЛС (титр цитотоксинів 1 : 100, 1 : 2048 — III) на вміст вільних радикалів у лімфоїдних органах щурів. А — через 30 хв після одноразового введення АЛС, Б — при чотириразовому щоденному введенні АЛС, В — на третю добу після п'ятиразових щоденних введення. I — інтактні тварини, IV — шестиразові щоденні введення нормальної кролячої сироватки.

антимітохондріальною антилімфоцитарною сироваткою кроликів мітохондріальна активність АМхАЛС також діє неоднозначно в лімфоїдних органах щурів залежно від титру. АМхАЛС (титр 1 : 16) підвищує концентрацію вільних радикалів у тимусі і селезінці при чотириразовому щоденному введенні. Проте, АМхАЛС (титр 1 : 128) знижує концентрацію вільних радикалів у тимусі і селезінці при чотириразовому щоденному введенні (рис. 1), зниження на 47% ($p < 0,003$). Спостереження за активністю при дії АМхАЛС на мітохондріальний комплекс уражуючою дією комплекс

При дії АЛС з титром 1 : 1024 і 1 : 2048 концентрація вільних радикалів підвищувалась у тимусі і селезінці через 30 хв після одноразового внутріочеревинного введення АЛС, а також у лімфатичних органах при чотириразовому щоденному введенні і на третю добу після п'ятиразових щоденних введень ($p < 0,05$, $p < 0,001$; див. рис. 2).

Для вивчення прямої дії антилімфоцитарних антитіл на окисно-відновні процеси мітохондрій клітин лімфатичних органів користувались

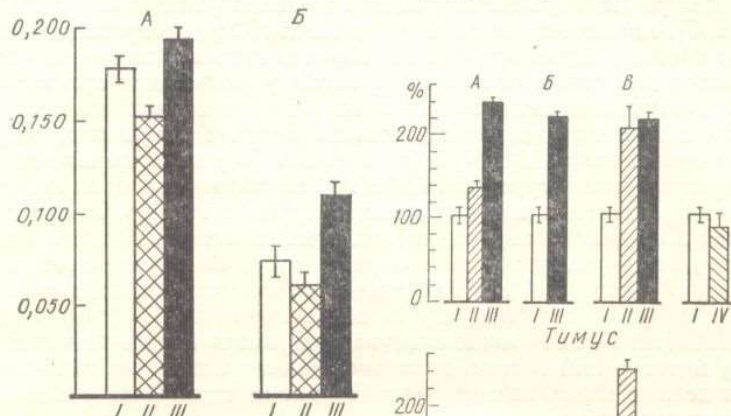


Рис. 1. Вплив кролячої антищурячої АЛС (титр 1 : 128) — II і АМхАЛС (титр 1 : 64) — III на цитохромоксидазну активність в тимусі (А) і селезінці (Б) щурів (чотириразові щоденні введення).

По вертикалі — індофенольна одиниця/мг білка. По горизонталі: I — інтактні тварини.

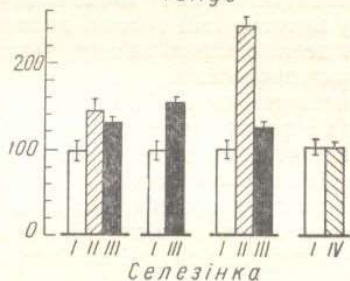
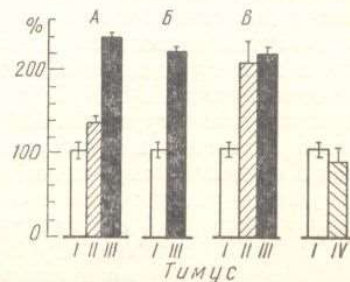


Рис. 2. Вплив кролячих антищурячих АЛС (титр цитотоксинів 1 : 1024 — II, 1 : 2048 — III) на вміст вільних радикалів у лімфатичних органах щурів. А — через 30 хв після одноразового введення АЛС, Б — при чотириразових щоденних введеннях АЛС, В — на третю добу після п'ятиразових щоденних введення АЛС. I — інтактні тварини, IV — шестиразові щоденні введення нормальної кролячої сироватки.

антимітохондріальною антилімфоцитарною сироваткою, одержаною імунізацією кроликів мітохондріями лімфатичних органів щурів (АМхАЛС). АМхАЛС також діє неоднозначно на вільнорадикальні процеси в лімфатичних органах щурів залежно від титру цитотоксичних антитіл.

АМхАЛС (титр 1 : 16) викликала тенденцію до зниження концентрації вільних радикалів у тимусі і селезінці при чотириразових щоденних введеннях. Проте, АМхАЛС (титр 1 : 64) в менших титрах, ніж АЛС, підвищувала концентрацію вільних радикалів (на 55%, $p < 0,08$) у селезінці при чотириразовому щоденному введенні. Водночас у селезінці було відзначено підвищення цитохромоксидазної активності на 45% ($p < 0,05$; рис. 1), зниження інтенсивності дихання (споживання кисню) на 47% ($p < 0,003$). Спостережуване підвищення цитохромоксидазної активності при дії АМхАЛС (титр 1 : 64) можна, очевидно, пояснити уражуючою дією комплексів антиген — антитіло на мембрани мітохон-

дрій, що може зумовити вихід зв'язаного з мембраною ферменту цитохромоксидази, в результаті чого її ферментативна активність може підвищуватися. В контрольних дослідженнях при введенні щурам нормальної кролячої сироватки при шестиразових щоденних введеннях не виявлено істотних змін вмісту вільних радикалів у лімфоїдних органах щурів.

Отже, одержані результати по вивченню змін окисно-відновних процесів у лімфоїдних органах щурів, як і раніше опубліковані нами результати [2, 6], є додатковими даними в механізмі імунодепресивної дії АЛС на клітини лімфоїдних органів. На користь висновку про те, що спостережувані зміни окисно-відновних процесів у лімфоїдних органах щурів зумовлені імунодепресивною дією антилімфоцитарних антитіл (АЛС вводили в депресивних дозах), можуть свідчити результати, одержані при вивченні впливу АМхАЛС (титр 1:64) [11] на приживлення шкірного алотрансплантату щурів. АМхАЛС викликала подовження строків виживання алогенних шкірних клаптів щурів до 20 днів. У контрольних дослідах з введенням нормальної кролячої сироватки відторгнення алотрансплантатів відзначалось на восьму добу. Виявлена однозначність відхилення концентрації вільних радикалів і цитохромоксидазної активності в тимусі і селезінці щурів під впливом АЛС (титр 1:128) і АМхАЛС (титр 1:64) може вказувати на зміни окисно-відновних процесів у цитохромній системі дихальної ланки мітохондрій і характеризувати деякою мірою зв'язок функціонування цитохромів з вільнорадикальними процесами.

Спостережувані відхилення вмісту вільних радикалів у лімфоїдних органах і печінці кроликів та щурів при сенсibiliзації трансплантаційними антигенами, а також при дії АЛС *in vivo*, можна, очевидно, пояснити змінами активності ферментів у дихальній ланці мітохондрій клітин лімфоїдних органів, що веде до зміни функціональної активності імунокомпетентних клітин та виключає можливість їх трансформації у повноцінно функціонуючі клітини при імунодепресії АЛС.

Висновки

1. Алогенна сенсibiliзація кроликів і щурів трансплантацією шкіри, лімфоїдних клітин лімфовузлів або тимуса підвищує на третю добу концентрацію вільних радикалів у лімфовузлах, тимусі, печінці, та знижує у селезінці. У щурів на сьому добу концентрація вільних радикалів у печінці знижується.

2. Зміна концентрації вільних радикалів і цитохромоксидазної активності залежить від титру антилімфоцитарних антитіл: АЛС (титр 1:64—1:256) знижує в тимусі, селезінці, лімфовузлах щурів концентрацію вільних радикалів у середньому на 20%, при чотирьох і шестиразових щоденних введеннях, а АЛС (титр 1:1024, 1:2048) підвищує концентрацію вільних радикалів у тимусі, селезінці і лімфовузлах. Антимітохондріальна АЛС (титр 1:64) підвищує концентрацію вільних радикалів і цитохромоксидазну активність, знижує тканинне дихання у селезінці щурів при чотирьохразових введеннях.

3. В механізмі імунодепресивної дії АЛС певне місце належить зміні окисно-відновних процесів у мітохондріях лімфоїдних органів, що позначається на функціональній активності імунокомпетентних клітин.

1. Антоненко В. Т. Изменение т алергических поражений сердца. Киев, 1969, 21.
2. Антоненко В. Т., Зюбина Н. Влияние АЛС на свободнорадика в лимфоидных органах. — Актуал 1974, 58.
3. Барченко Л. І., Ільчевит М. ления про механізм дії цитото УРСР, 1974, 20, № 5, 579.
4. Быкорез А. И. Морфологическ кратным введением гепатоцитот различных видов. — Цитотоксин
5. Быкорез А. И., Кулик Г. И. сыворотками. — Физиологическ де физиологов Сев. Кавказа, Махач
6. Зюбина Н. П. О механизме де держание сульфгидрильных грут токсинны в современной медицин
7. Кулик Г. И., Быкорез А. И. держание сульфгидрильных грут токсинны в современной медицин
8. Пашаев Т. Б. Некоторые итоги ных состояниях его реактивнос 1956, 44.
9. Савицкий И. В. Влияние АЛС ны в современной медицине. Ки
10. Савицкий И. В. Биохимическ в современной медицине. Киев, 19
11. Тимченко А. С. Пересадка к тарной сывороткой. Авторефера
12. Эстрин И. М. О плазмолитари нениях белковых фракций сы рующих доз АЛС. — Цитотокс
13. Everett N., Schwarz M. the mechanism of action of anti
14. Foerster J., Lamelin J., G the stimulation of DNA synthe serum specific antigen and phy
15. Corer P., O'Gorman P. Th Bull., 1956, 3, 146.
16. Lowry O., Rosenbrough with the Folin phenol reagent. —
17. Nagaya H., Sieker H. Effe radioautographic study. — J. Im
18. Nagaya H., Sieker H. Effe leukemia. — Proc. Soc. Exp. Bi
19. Skamene E., Sejkorova thesis in the culture of mouse and antiglobulin sera. — Folia l
20. Straus W. Colorimetric micro 1954, 207, 733.
21. Taub R. Effects of heterologo Proc., 1970, 29, 1, 142.
22. Tyler R., Everett N., Sc lymphocytes. — J. Immunol., 1
23. Traeger J., Fries D., Di Production of human antilymp and peripheral blood lymphocy

Центральна науково-дослідна лаб
Київського інституту удосконален

Література

1. Антоненко В. Т. Изменение тканевых белков миокарда при нейрогенно-ауто-аллергических поражениях сердца.— Сб.: Нервная трофика и дистрофический процесс. Киев, 1969, 21.
2. Антоненко В. Т., Зюбина Н. П., Федорченко В. И., Кузьменко В. А. Влияние АЛС на свободнорадикальные процессы и активность цитохромоксидазы в лимфоидных органах.— Актуальные вопросы клинической иммунологии. Москва, 1974, 58.
3. Барченко Л. И., Ильчевич М. В., Спасокукоцкий Ю. О. Сучасні уявлення про механізм дії цитотоксичних сироваток.— Фізіологічний журнал АН УРСР, 1974, 20, № 5, 579.
4. Быкорез А. И. Морфологические изменения в печени крыс, вызванные многократным введением гепатоцитотоксических сывороток, полученных от животных различных видов.— Цитотоксины в современной медицине. Киев, 1966, 61.
5. Быкорез А. И., Кулик Г. И. Хроничне ураження печінки гепатоцитотоксичними сироватками.— Фізіологічний журнал АН УРСР, 1964, 10, 2, 271.
6. Зюбина Н. П. О механизме действия АЛС.— Материалы IV конференции патофизиологов Сев. Кавказа, Махачкала, 1974, 105.
7. Кулик Г. И., Быкорез А. И. Влияние гепатоцитотоксической сыворотки на содержание сульфгидрильных групп в ткани печени и сыворотке крови крыс.— Цитотоксины в современной медицине. Киев, 1966, 69.
8. Пашаев Т. Б. Некоторые итоги изучения влияния АЛС на организм при различных состояниях его реактивности.— Цитотоксины в современной медицине, Киев, 1956, 44.
9. Савицкий И. В. Влияние АЛС на функции некоторых ферментов.— Цитотоксины в современной медицине. Киев, 1966, 195.
10. Савицкий И. В. Биохимические исследования действия АЛС.— Цитотоксины в современной медицине. Киев, 1960, 111.
11. Тимченко А. С. Пересадка костного мозга при иммунодепрессии антилимфоцитарной сывороткой. Автореферат дисс., Киев, 1974.
12. Эстрин И. М. О плазмолитических реакциях в тканях здоровых кроликов и изменениях белковых фракций сыворотки крови при подкожном введении стимулирующих доз АЛС.— Цитотоксины в современной медицине. Киев, 1966, 204.
13. Everett N., Schwarz M., Tyler R., Perkins W.— Observation relative to the mechanism of action of antilymphocyte serum.— Fed. Proc., 1970, 29, 1, 212.
14. Foerster J., Lamelin J., Green I., Benacerraf B. A quantitative study of the stimulation of DNA synthesis in lymph node cells cultures by anti-gammaglobulin serum specific antigen and phytohemagglutinin.— J. Exp. Med., 1969, 129, 2, 295.
15. Corer P., O'Gorman P. The cytotoxic activity of isoantibody in mice.— Transpl. Bull., 1956, 3, 146.
16. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
17. Nagaya H., Sieker H. Effect of antithymus serum on thymic lymphopoiesis: a radioautographic study.— J. Immunol., 1969, 103, 4, 778.
18. Nagaya H., Sieker H. Effects of antithymus serum on the incidence of lymphoid leukemia.— Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1969, 131, 3, 891.
19. Skamene E., Sejkorova J., Nouza K., Ivanyi J. Stimulation of DNA synthesis in the culture of mouse spleen cells by means of heterologous antilymphocytic and antiglobulin sera.— Folia biol. (CSSR), 1968, 14, 4, 289.
20. Straus W. Colorimetric microdetermination of cytochrome-c-oxidase.— J. Biol. Chem., 1954, 207, 733.
21. Taub R. Effects of heterologous cells labeled with 5-iodo-2-deoxyuridine J¹²⁵.— Fed. Proc., 1970, 29, 1, 142.
22. Tyler R., Everett N., Schwarz M. Effect of antilymphocytic serum on rat lymphocytes.— J. Immunol., 1969, 102, 1, 179.
23. Traeger J., Fries D., Durix A., Revillard J., Carras M., Plan M. Production of human antilymphocytic serum in horse with thoracic duct lymphocytes and peripheral blood lymphocytes.— Fed. Proc., 1970, 29, 1, 108.

Центральна науково-дослідна лабораторія
Київського інституту удосконалення лікарів

Надійшла до редакції
2.IV 1975 р.

V. T. Antonenko, N. P. Zjubina,
V. A. Kuz'menko, V. S. Fedorchenko

CERTAIN INDEXES OF REDOX PROCESSES IN LYMPHOID ORGANS OF RABBITS AND RATS DURING FORMATION OF TRANSPLANTATION IMMUNITY AND IMMUNODEPRESSION WITH ALS

Summary

Changes in the content of free radicals, tissue respiration and cytochrome oxidase activity in the lymphoid organs were studied in 290 rats and 8 rabbits with allogenic sensitization (transplantation of skin, lymphonodi and thymus cells) and administration antilymphocytic sera different by the titre. A tendency to changes in the concentration of free radicals in the lymphonodi, thymus, spleen, liver depending on the sensitization time was found. Immunodepression with ALS produced a different effect on the free-radical processes and cytochrome oxidase activity in the lymphoid organs of rats. ALS (titre 1:64, 1:128, 1:256) lowers the concentration of free radicals in the thymus, spleen, lymphonodi by 20% on the average with 4-, 6-fold daily administrations. ALS (the titre of cytotoxins 1:1024, 1:2048) produces a 30-150% increase in the concentration of free radicals in the same lymphoid organs with single and multiple administrations of ALS.

Central Research Laboratory,
Advanced Training Institute for Doctors, Kiev

УДК 612.67.017.12.018.2:612.453

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ НА КІЛЬКІСТЬ АНТИ- ТА ТИТРИ ГУМОРА ПРИ АНТИГЕННОМУ

Процеси імуногенезу в організмі регулюються різними механізмами. Одним з них є гіпофіз — кора надниркових залоз. Ця система представлена гор-
лий інтерес до вивчення їх впливу на віковому плані. З віком, процес імуногенезу — лімфоїдний тиск імунологічні реакції — гіпоталамус [6, 24, 26], а, по-друге, зміни нервових і гуморальних подразників. Априорно можна припустити, що імуногенезу (і, зокрема, процесу) на мати свої особливості, від

Деструктивний ефект створюється виявлений і досліджений відносини титри антитіл у різних умовах. Відомо, введення гормону в різні дози, застосування різних доз титру (стовбурових, антигенів IgG, IgM, короткоживучих і довгоживучих) в дослідженні проведено достатньо і приводять до однакових результатів [25, 27]. У віковому ж аспекті дослідженням.

Ми вивчали вплив одного з гормонів — гідрокортизону на утворення антитіл.

Методика

Досліди проведені на білих мишах (рослих (8—10 місяців) і старих (24—30 місяців)). Антиген — баранячі еритроцити (тервалами сім днів), у дозах $4 \cdot 10^6$ шт.

Для зручності викладу дозу «велика» доза антигену. Застосування сили ґрунтується на даних про залежність від дози антигену [1].

Гідрокортизон марки «Ріхтер» застосовували внутрішньовідно, по 0,25 мг/100 г тіла, оскільки, за даними літератури, новітнього вироблюваного в організмі у самців і дещо більше — у самок, цієї кількості мало за мету створити постійний