

УДК 615.365:616.001.17

М. Ю. Повстаний, Ю. Г. Тимошенко, В. С. Кульбака, Ю. М. Кленус

ДИНАМІКА ВИЯВЛЕННЯ ПРЕЦИПІТУЮЧИХ ТА КОМПЛЕМЕНТФІКСУЮЧИХ АНТИТІЛ У ОПІКОВИХ ХВОРИХ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ АЛГ

Відомо, що у відповідь на пересадку чужорідних органів та тканин в організмі реципієнта виникає імунологічна перебудова, яка приводить до появи гуморальних антитіл. При опіковій хворобі поряд з пригніченням імунологічної реактивності спостерігається явище аутоенсибілізації хворого продуктами розпаду уражених тканин.

Циркулюючі в сироватці реципієнта антитіла спрямовані проти різних антигенних детермінант трансплантата. Літературні дані свідчать про те, що преципітуючі антитіла виявляються як при пересадці шкіри, так і при пересадці кісткового мозку, рогівки тощо [4—7, 9, 12]. Описані досліди, що демонструють наявність преципітуючих антитіл при алотрансплантації [1, 2, 3], а також свідчать про вирішальну роль преципітинів у порівнянні з гемаглютинінами в загибелі алотрансплантатів [13].

В зв'язку з цим становить інтерес вивчення динаміки гуморальних антитіл різних видів при алотрансплантації шкіри у опікових хворих та застосуванні антилімфоцитарного глобуліну (АЛГ).

Ми вивчали преципітуючі та комплементфіксуючі аутоантитіла до еритроцитів та антитіла до алотрансплантата шкіри у хворих з опіками і наступною алопластикою із застосуванням АЛГ.

Методика досліджень

Одержання та застосування АЛГ. Нами одержано 15 серій антилімфоцитарних сироваток (АЛС), специфічних для людини, з титрами в РЗК 1:100—1:160. Для одержання сироваток проводилась дворазова імунізація тварин (кроликів), внутрішньо з інтервалом 14 днів. Кількість клітин для першої імунізації становили $3 \cdot 10^7$. З антилімфоцитарної сироватки за методом Кендала виділяли глобулін (АЛГ). Для застосування в клініці АЛГ пропускали через фільтр Зейтца, змонтований з стерилізуючими пластинами. Застосування препаратів у хворих проводилось таким способом: спочатку підшкірно вводили 0,5, потім 1,5 мл, а також підшкірно через 2 год. Курс введення АЛГ складав дві—п'ять ін'єкцій АЛГ починали вводити через одну добу після операції. Беручи до уваги тяжкий стан опікових хворих, введення антилімфоцитарного глобуліну, проводилось тільки після операції алотрансплантації шкіри.

Метод Уаньє. Для виявлення преципітуючих антитіл використовувалась методика Уаньє в модифікації Клемпарської та Раєвої [8]. Принцип методу полягає у визначенні з допомогою фотоелектронефелометра помутніння, яке настає в результаті реакції, що здійснюється при додаванні до сироватки крові хворого антигену в оптимальній концентрації. В інших дослідах, як антиген, застосовувався лізат формених елементів крові реципієнта, а також антиген, виготовлений із шкіри донора. Ми користувалися 10% водно-сольовим екстрактом шкіри алотрансплантатів. Антиген додавали послідовно по 0,1 мл, як в кювету з плазмою крові, так і в кювету з дистильованою водою. При відсутності антитіл у дослідній плазмі додавання антигену викликало поступове зниження оптичної щільності. При наявності антитіл поступове додавання різних концентрацій антигену створювало оптимальне співвідношення для комплексу антиген—антитіло та випадіння преципітату, що супроводжувалось виникненням плато чи підйому на низхідній кривій. Оптичну щільність визначали з допомогою ФЕКН-57. При

перенесенні цифрових значень оптичної щільності на графік позитивна реакція виражалася у вигляді «плато» (затримка зниження оптичної щільності) чи підйому (підвищення оптичної щільності). Відсутність плато чи підйому на низхідній кривій свідчить про негативну реакцію.

Для визначення протитканинних комплементфіксуючих антитіл до трансплантата в сироватці крові була використана реакція споживання комплементу (РСпК) в модифікації Кондрашової [10]. Принцип методу полягає у визначенні споживання комплементу при реакції антигену з досліджуваними антитілами. Це визначали за величиною часткового гемолізу еритроцитів дослідної та контрольної порцій досліджуваної сироватки, взятої в однакових об'ємах. Цифра, що відповідає різниці величин гемолізу в дослідній та контрольній пробірках, служила для обліку реакції в умовних одиницях, що дозволило порівнювати результати дослідів у кількісному відношенні. Всі одержані результати статистично оброблені.

Реакції Уанье та РСпК в описаних постановках були використані при обстеженні 16 хворих з опіками III—IV ступеня з наступною алопластикою шкіри, п'яти хворим вводили після операції антилімфоцитарний глобулін (АЛГ).

Результати досліджень

Серологічні обстеження хворих проводились у різні строки після операцій в проміжках між першою та тридцятою добою: на 5, 10, 15, 20 добу. При постановці реакції Уанье з лізатом еритроцитів крові у хворих з опіками аутоантитіла були виявлені в 45, 4% випадків. При застосуванні цієї реакції, де використовувався як антиген водно-сольовий екстракт алотрансплантатів шкіри, антитіла були виявлені тільки у трьох випадках з 16, 5—10 доби характеризуються появою преципітуючих аутоантитіл в значно більшій кількості. Проведене на третю добу обстеження виявило, що реакція Уанье при постановці з лізатом еритроцитів позитивна в 72,4% випадків, в 27,3% — сумнівна, негативних реакцій не виявлено. При постановці з антигеном, виготовленим з шкіри алотрансплантатів у ці строки, реакція Уанье була позитивною в 54,5% випадків і в 27,3% — негативною. В 18,2% випадків реакція була сумнівна.

Преципітуючі антитіла в найбільшій кількості у опікових хворих виявлялися на десяту добу після проведеної операції — алопластики шкіри. В ці ж строки, як при постановці з лізатом еритроцитів крові, так і при постановці з антигеном, виготовленим з шкіри алотрансплантатів, реакція Уанье була позитивною в 81,7% випадків з лізатом еритроцитів, і в 66,6% з антигеном, виготовленим з шкіри алотрансплантатів. На 15 добу преципітуючі антитіла виявлялись у значно меншій кількості випадків, а двадцята доба характеризується поступовим зменшенням антитіл. Отже, преципітуючі антитіла визначались переважно на десяту добу, тобто в строки початку лізису алотрансплантатів шкіри. Тривалість життя алотрансплантатів у хворих, яким не вводили препарат, коливалась у межах восьми—десяти днів, а у хворих, яким вводили антилімфоцитарний глобулін, тривалість життя трансплантатів становила 20—25 дів. В трьох випадках лізис трансплантатів спостерігався значно пізніше вказаного часу, і в цих випадках пізнього лізису трансплантатів реакція Уанье залишалась негативною на протязі довгого часу (в середньому 30,4 дів). На рис. 1 і 2 наведені графіки виявлення антитіл до трансплантату шкіри та аутоантитіл до еритроцитів методом Уанье в плазмі хворих.

При введенні антилімфоцитарного глобуліну після алопластики шкіри у опікових хворих преципітуючі антитіла виявлені наступного дня після введення препарату в чотирьох з п'яти випадків; при додаванні антигену виготовленого з шкіри алотрансплантату — в трьох випадках.

П'ята — десята доба після введення АЛГ характеризується збільшенням кількості преципітинів які виявлялись у всіх випадках. На 15 добу після введення препарату відзначалась найбільша кількість пре-

ципітинів, як при додаванні антигену з еритроцитів, так і антигену, виготовленого з шкіри алотрансплантатів. Встановлено, що при введенні АЛГ антитіла у хворих визначались пізніше і довше, ніж без застосування препарату.

Поряд з визначенням преципітуючих антитіл нами в ці ж строки з допомогою реакції споживання комплементу у хворих визначались комплементфіксуючі антитіла. Встановлено, що після алотрансплантації шкіри у хворих, яким не вводили антилімфоцитарний глобулін, реакція споживання комплементу з антигеном з лізатів еритро-

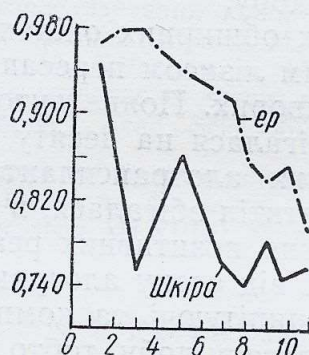


Рис. 1. Виявлення антитіла методом Уаньє на десяту добу після операції (хворий Д.).

По вертикалі — оптична щільність, по горизонталі — розведення антигену: 1 — 1:15340, 2 — 1:7680, 3 — 1:3840, 4 — 1:1920, 5 — 1:960, 6 — 1:480, 7 — 1:240, 8 — 1:120, 9 — 1:160, 10 — 1:30.

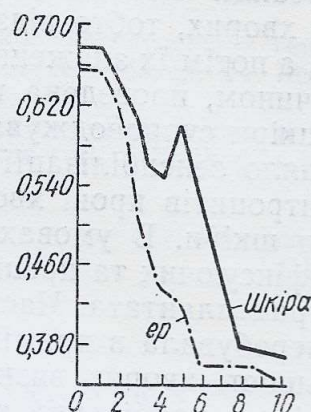


Рис. 2. Виявлення антитіла методом Уаньє на 15 добу після операції (Хворий Д-ко).

По вертикалі — оптична щільність, по горизонталі — розведення антигену. 1 — 1:15340, 2 — 1:7680, 3 — 1:3840, 4 — 1:1920, 5 — 1:960, 6 — 1:480, 7 — 1:240, 8 — 1:120, 9 — 1:160, 10 — 1:30.

цитів була наступної доби позитивною в 25% випадків і слабо позитивною в 50% випадків, 16,5% — характеризувалися негативно. Коли антиген був виготовлений з шкіри алотрансплантатів, частота позитивних сумнівних та негативних реакцій становила відповідно 50—20—40%. Наступні строки, тобто п'ята — десята доба характеризуються збільшенням процента позитивних реакцій споживання комплементу. На 15—20 добу частота позитивних реакцій знижувалася, і в ці ж строки алотрансплантати лізувалися, так що наступні реакції проводилися з еритроцитами хворих.

При використанні двох антигенів (лізату еритроцитів та водно-сольового екстракту шкіри алотрансплантатів) було встановлено, що аутоантитіла в умовних одиницях становили наступної доби після операції $11,7 \pm 3,4$ ($p < 0,05$) до еритроцитів та $12,5 \pm 2,1$ ($p < 0,05$) до антигену, виготовленого з шкіри алотрансплантатів, а на 10 добу — $15,0 \pm 1,4$ та $18,1 \pm 1,3$ ($p < 0,05$) до еритроцитів та шкіри відповідно.

Отже, у хворих на десяту добу відзначалось збільшення кількості позитивних реакцій споживання комплементу і з антигеном з еритроцитів, і з антигеном, виготовленим з шкіри алотрансплантата. При обстеженні в післяопераційному періоді у опікових хворих з алотрансплантацією шкіри та наступним введенням АЛГ встановлено, що наступної доби після введення препарату титр аутоантитіл в умовних одиницях становив $10,0 \pm 1,0$ ($p < 0,05$), як з антигеном, що був водно-сольовим екстрактом кіри алотрансплантатів, так і з антигеном-лізатом еритроцитів ($10,0 \pm 2,4$; $p < 0,05$). П'ята доба характеризується більш високим титром аутоантитіл в реакціях з еритроцитами ($25 \pm 9,1$; $p < 0,05$), тоді як у ре-

акціях з алотрансплантатами титр становив $10,0 \pm 1,0$ ($p < 0,05$) умовних одиниць.

При дальшому обстеженні хворих відзначене найбільше підвищення титру аутоантитіл на 15 добу після операції в тому випадку, коли антигеном була шкіра алотрансплантатів ($23,3 \pm 5,11$; $p < 0,05$), та на 20 добу при використанні антигену з лізату еритроцитів. ($30,0 \pm 1,0$; $p < 0,05$).

Отже, встановлено, що при введенні антилімфоцитарного глобуліну показники реакції споживання комплементу змінювалися у всіх обслідуваних нами хворих, тобто відзначалося підвищення титрів досліджуваних антитіл, а потім їх зниження на 20—30 добу.

Таким чином, проведена при глибоких обширних опіках алотрансплантація шкіри супроводжувалась значним лізисом пересащеної шкіри, що сприяло сенсibilізації організму хворих. Поява аутоантитіл до власних еритроцитів крові хворих спостерігалася на десяту добу після алопластики шкіри. В умовах приживлення алотрансплантатів поява комплементфіксуючих та преципітуючих антитіл збігалася, в основному, з лізисом трансплантата. Частота виявлення позитивних реакцій аутоімунізації перебувала в прямій залежності від стану алотрансплантата. Так, у більшості хворих визначались преципітуючі та комплементфіксуючі антитіла в найбільшій кількості на десяту добу, тобто до початку лізису трансплантата. Застосування антилімфоцитарного глобуліну сприяло подовженню строків виживання алотрансплантатів шкіри і чим пізніше наставало руйнування трансплантата, тим пізніше виявлялись вказані антитіла. Так, підвищення титру виявлених антитіл відзначено на 15 добу при застосуванні АЛГ.

Отже, можна припустити існування взаємозалежності між показниками аутоімунних процесів та процесів відторгнення алотрансплантата.

Визначення аутоантитіл до еритроцитів у хворих з опіками так само як і виявлення антитіл до гомологічної тканини донорів свідчать про зміну імунологічної реактивності організму при алотрансплантації шкіри у хворих з опіковою хворобою. Певний паралелізм між появою гуморальних антитіл та наростанням їх титру з руйнуванням трансплантата свідчить про їх участь у розвитку процесів тканинної несумісності. Проте тепер питання про участь тих чи інших сироваткових антитіл в деструкції трансплантата не можна вважати остаточно з'ясованим. Розбіжність експериментальних та клінічних даних, пов'язана зі складністю дослідження гуморальних антитіл, викликає необхідність продовження досліджень у цьому напрямі.

Л і т е р а т у р а

1. Антоненко В. Т. Явление иммунологической толерантности и некоторые вопросы гомотрансплантации. Автореф. дис., К., 1962.
2. Дорошенко А. Г. Влияние многократной гомотрансплантации кожи на некоторые показатели иммунологической реактивности организма. Автореф. дис., Львов, 1967.
3. Дреков Г. А. Влияние изофосфатидов на иммунологические свойства организма при гомотрансплантации кожи.— В сб.: Матер. IX респ. конф. по перелив. крови, Минск, 1964, 57—59.
4. Гитис Е. И. Гомотрансплантация кожи с применением кортизона в эксперименте.— В сб.: Гематол и перелив. крови, К., 1966, 185—191.
5. Гитис Е. И., Дзык Г. М. Моделирование ожоговой травмы. Принципы экспериментального моделирования патологических процессов.— В сб.: Труды Респ. конф. патофизиол., Ивано-Франковск, 1967, 35—37.
6. Гитис Е. И. Иммунологические аспекты ожоговой болезни и пересадки кожи. Автореф. дис., К., 1973.

7. Гельднер Л. Б., Рубина Т. А., Бажина Т. Л., Чередниченко Р. П. Применение серологических реакций для изучения иммунитета при гомотрансплантации кожи.— Бюлл. exper. биол. и мед., 1967, 5, 67—69.
8. Клемпарская Н. П., Раева Н. В. Исследование аутоенсибилизации при лучевой болезни. Бюлл. exper. биол. и мед., 1961, 5, 77—81.
9. Коврикова Н. П. Иммунологические сдвиги при гомотрансплантации костного мозга в условиях экспериментальной гипоплазии кроветворной системы.— В сб.: Гематол. и перелив. крови, К., 1966.
10. Кондрашова Н. И. Реакция потребления комплемента в новой постановке для выявления противотканевых антител.— Лаб. дело, 1974, 9, 552—555.
11. Славкина Г. М. Иммунологическая реактивность у детей с ожоговой болезнью.— Казанский мед. журн., 1974, 4, 14—15.
12. Мондрус К. А. Сравнительное изучение микропреципитинов и гемагглютининов при гомотрансплантации кожи у животных.— В сб.: Матер. IV Всесоюзн. конф. по транспл. органов и тканей, М., 1966, 339—340.
13. Haskova V., Chutna J., Hasek M., Hort S. Destruction of tolerates skin heterografts by means of serum antibodies and the roll of antibodies in graft resection.— Ann. N. Y. Acad., Sci., 1962, 99, 3, 602—605.

Відділ імунології та цитотоксичних
сироваток Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Надійшла до редакції
1.III 1976 р.

N. E. POVSTJANOJ, Ju. G. TIMOSHENKO,
V. S. KUL'BAKA, Ju. N. KLENUS

DYNAMICS OF PRECIPITATING AND COMPLEMENT-FIXING ANTIBODIES DETECTION IN PATIENTS WITH BURNS AS AFFECTED BY ALG

Summary

The precipitating and complement fixing antibodies to the transplantat and auto-antibodies to erythrocytes are found in blood serum of patients suffering from burns and with skin allotransplantation.

The precipitating and complement fixing antibodies in the greatest amount were observed by the tenth day, that corresponded mainly, to the period of the skin transplantat lysis. Application of antilymphocytic globulin to the patients with skin allotransplantation prolongs the time of transplantats survival and the peak of the antibodies formation shifts toward later periods.

Department of Immunology and Cytotoxic Sera,
the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev