

УДК 612.017.12:576.8.097.3

І. М. Моргунов, В. Г. Бордонос, Л. О. Куюн, М. П. Новінська,
М. Г. Журавський, А. М. Борисевич, С. В. Комісаренко

ВИКОРИСТАННЯ МЕТИЛЕНДИФОСФОНОВОЇ КИСЛОТИ ДЛЯ ГАЛЬМУВАННЯ ДЕЯКИХ ІМУННИХ РЕАКЦІЙ У ТВАРИН

Регуляція імунної відповіді є актуальним завданням експериментальної і клінічної імунології. Раніше нами було показано, що введення синтетичного аналога неорганічного пірофосфату — метилендифосфонової кислоти (МДФК) значно гальмує рівень антитілоутворювальних клітин, а також активність неорганічної пірофосфатази [3, 4, 7, 11] у тварин. Для більш повного вивчення дії МДФК на імунні реакції при імунізації різними антигенами, нами була зроблена спроба дослідити її вплив на алотрансплантацію шкіри у мишей [1, 2], а також на первинну і вторинну імунні відповіді у щурів на білкові антигени.

Методика досліджень

Досліди по вивченню відторгнення клаптика шкіри проведені на чистолінійних (СВА) і нелінійних білих мишах-самцях вагою 20—25 г, яким пересаджували повношаровий клаптик шкіри на спину [1, 2]. Всього було проведено чотири серії дослідів і використано 122 нелінійні та 40 лінійних мишей. В перших трьох серіях дослідів донорами клаптиків шкіри і реципієнтами їх служили нелінійні білі миші. В четвертій серії дослідів донорами клаптиків шкіри були нелінійні білі миші, а реципієнтами — самці лінії СВА. Тварин кожної серії розподіляли на дослідні і контрольні. Препарат МДФК вводили підшкірно мишам-реципієнтам дослідної групи тричі в дозах 40 мкг/г живої ваги (мишам лінії СВА по 30 мкг/г) за такою схемою: за один день до, в день і наступного дня після операції. Реакцію оцінювали у тварин за строком повного відторгнення алотрансплантата.

Для більш повного з'ясування впливу МДФК на гуморальний імунітет, вивчали інтенсивність первинної та вторинної імунних відповідей на білкові антигени — очищений адсорбований правцевий анатоксин і чоловічий сироватковий альбумін (ЧСА). Досліди проводили як на лінійних («Вістар»), так і на нелінійних білих щурах-самцях, вагою 150—180 г. Кожній дослідній тварині внутріочеревинно вводили 20 оз правцевого анатоксину (оз — одиниця зв'язування) в об'ємі 0,15—0,2 мл чи 0,2 мл 5% розчину ЧСА. Як відомо, переваги анатоксину, як антигену, полягають у тому, що титр утвореного антиоксину виражається в інтернаціональних одиницях (іо). При вторинній імунній відповіді реімунізацію проводили через три тижні після первинного імунного стимулу. МДФК вводили в дозі 30 мкг/г, підшкірно тричі: за добу до імунізації, одночасно з антигеном, і через добу після ін'єкції антигену, а при вторинній відповіді введення МДФК проводили паралельно з реімунізуючою дозою антигену за тією ж схемою, що і при первинній імунній відповіді. Протиправцеві антитіла в сироватці крові піддослідних тварин визначали з допомогою реакції непрямої гемаглютинації. Правцевий анатоксин для сенсбілізації формалізованих еритроцитів барана хімічно зв'язували з допомогою 4-4 бідифенілдіазонію борофториду [5, 6, 9]. Антитіла проти ЧСА визначали за Бойденом [10] та виражали в розведеннях антисироватки.

Результати досліджень та їх обговорення

З наведених даних (табл. 1) видно, що МДФК вірогідно і значною мірою збільшує строки відторгнення алотрансплантата шкіри на 26—82% у дослідних тварин у порівнянні з тваринами контрольних груп. Ця властивість препарату МДФК особливо наочно проявляється у ми-

Таблиця 1

Вплив МДФК на відторгнення аллотрансплантату шкіри у мишей

Серія досліджу	Доза МДФК в мкг/г живої ваги	Контроль		Дослід		Порівняння	
		Кількість тварин	$M_1 \pm m_1$ (в днях)	Кількість тварин	$M_2 \pm m_2$ (в днях)	Вірогідність, p	$\left(\frac{M_2}{M_1} - 1\right) 100\%$
1	40	13	$9,80 \pm 0,06$	30	$12,50 \pm 0,04$	$<0,001$	+26
2	40	11	$10,00 \pm 0,07$	24	$13,80 \pm 0,04$	$<0,001$	+38
3	40	6	$9,80 \pm 0,01$	28	$13,50 \pm 0,04$	$<0,01$	+37
4	30	7	$9,80 \pm 0,09$	31	$17,90 \pm 0,50$	$<0,001$	+82

шей IV серії експерименту, в якій донорами клаптиків шкіри служили нелінійні білі миші, а реципієнтами — самці мишей лінії СВА.

Отже, можна твердити, що МДФК, як імунодепресант, є ефективним інгібітором реакції клітинного імунітету, який, як відомо, лежить в основі трансплантаційного імунітету.

З даних табл. 2 та 3 видно, що застосування МДФК як імунодепресанта значною мірою гальмує утворення протиправцевого антитоксину. Так, титр його при первинній імунній відповіді в дослідній групі на 14 добу після імунізації (табл. 2) був майже в 9 разів менший, ніж у контрольній групі тварин (1,2 проти 10,6 відповідно). При цьому слід звернути увагу на те, що на першому тижні після імунізації спостерігалось менше гальмування синтезу антитіл, ніж у період максимального збільшення їх кількості в сироватці крові на 14 день. Це вказує на те, що імунодепресант діє протягом тривалого часу і стійко. У контрольній групі тварин утворення антитіл відбувалося нормально з максимумом титру антитоксину на 14 добу і зниженням наприкінці місяця. Це підтверджує нормальний хід експерименту. У згаданому експерименті (табл. 2) привертає увагу те, що у тварин дослідної групи неповністю гальмувалась здатність до утворення антитіл, що в певних випадках може бути його перевагою в порівнянні з іншими імунодепресантами. Для підтвердження цього припущення і більш повного вивчення імунодепресивної дії МДФК нами були проведені експерименти по дослідженню її гальмівного впливу в умовах вторинної імунної відповіді. Відомо, що вторинна імунна відповідь менше піддається зовнішньому впливу. Тому априорно можна було чекати меншу гальмівну дію МДФК. Проте, відомо також, що імунна реакція за вторинним типом може розвиватися лише в тому випадку, якщо первинний стимул був достатнім для імунологічної перебудови організму.

Таблиця 2

Вплив МДФК на рівень протиправцевих антитіл при первинній імунній відповіді у щурів (титри виражені в інтернаціональних одиницях)

Строк після імунізації (дні)	Контроль		Дослід		Порівняння	
	$M_1 \pm m_1$	Кількість тварин	$M_2 \pm m_2$	Кількість тварин	$\left(\frac{M_2}{M_1} - 1\right) 100\%$	Вірогідність, p
6	$3,3 \pm 0,4$	3	$1,8 \pm 0,1$	10	-46	$<0,02$
9	$5,3 \pm 0,7$	3	$1,8 \pm 0,1$	10	-66	$<0,001$
14	$10,6 \pm 1,5$	3	$1,2 \pm 0,1$	10	-89	$<0,001$
19	$2,0 \pm 0,5$	3	$0,9 \pm 0,1$	10	-55	$<0,05$
26	$0,7 \pm 0,1$	3	$0,3 \pm 0,0$	10	-57	$<0,001$

Результати експериментів, які визначили ступінь впливу МДФК на вторинну імунну відповідь при імунізації правцевим анатоксином, свідчать, що при вторинній імунній відповіді МДФК значною мірою гальмує цю реакцію (табл. 3). На першому тижні ця різниця виражена меншою мірою, ніж на другому. Так, на шостий день титр анти毒素у в дослідній групі дорівнював 17 іо проти 24 іо в контрольній, а на 13 добу відповідно 4 іо 18 іо, тобто був менший в 4,5 рази. Пізніше титр анти毒素у продовжував знижуватись, залишаючись більш високим у контрольній групі. Максимум титру співпадав у контролі та досліді і відзначався на шосту добу після вторинної імунізації. Аналогічні результати були одержані в дослідях при імунізації тварин чоловічим сироватковим альбуміном. При первинній імунній відповіді введення МДФК щурам тричі в дозі по 30 мкг/г живої ваги значно зменшувало утворення відповідних антитіл. Цей ефект був особливо виражений на максимумі синтезу антитіл (табл. 4). Імунодепресивна дія МДФК проявлялася також при повторному введенні ЧСА, що приводило до зменшення титрів антитіл проти ЧСА у дослідній групі на 60—73% проти контролю.

Таблиця 3

Вплив МДФК на рівень протиправцевих антитіл при вторинній імунній відповіді у щурів (титри виражені в інтернаціональних одиницях)

Строк після імунізації (дів)	Контроль		Дослід		Порівняння	
	$M_1 \pm m_1$	Кількість тварин	$M_2 \pm m_2$	Кількість тварин	$\left(\frac{M_2}{M_1} - 1\right) 100\%$	Вірогідність, p
4	$2,1 \pm 0,3$	3	$3,3 \pm 0,2$	9	+57	<0,2
6	$23,6 \pm 2,2$	3	$17,3 \pm 1,0$	9	-27	<0,05
8	$21,6 \pm 2,5$	3	$11,5 \pm 0,7$	9	-47	<0,01
13	$18,3 \pm 2,2$	3	$4,2 \pm 0,5$	9	-77	<0,001
16	$10,6 \pm 1,5$	3	$4,0 \pm 0,2$	9	-62	<0,01
21	$5,3 \pm 0,7$	3	$2,5 \pm 0,1$	9	-53	<0,01
27	$2,1 \pm 0,4$	3	$1,0 \pm 0,1$	9	-62	<0,01

Таблиця 4

Вплив МДФК на титри антитіл проти чоловічого сироваткового альбуміну при первинній імунній відповіді у щурів

Строк після імунізації (дів)	Контроль		Дослід		Порівняння	
	$M_1 \pm m_1$	Кількість тварин	$M_2 \pm m_2$	Кількість тварин	$\left(\frac{M_2}{M_1} - 1\right) 100\%$	Вірогідність, p
4	436 ± 44	3	237 ± 20	7	-46	<0,01
13	1024 ± 82	3	274 ± 26	7	-73	<0,05
19	213 ± 25	3	86 ± 11	7	-60	<0,01
25	64 ± 0	3	36 ± 3	7	-44	<0,001

Підсумовуючи результати експериментів по вивченню імунодепресантної дії МДФК можна вважати, що МДФК гальмує як клітинний, так і гуморальний типи імунної відповіді. Маючи це на увазі, а також наші власні дані про те, що МДФК здебільшого впливає на гіперчутливість сповільненого, ніж негайного типів [8], біологічна дія МДФК на імунітет, очевидно, пояснюється її дією переважно на Т-лімфоцити

(що потребує експериментальних підтверджень), можливо, за рахунок пригнічення пірофосфатазної та ДНК залежної РНК-полімеразної реакції [3, 7].

Література

1. Аронов Г. Е., Лаптева Н. А. Подавление реакции гистосовместимости при аллотрансплантации кожи у крыс.— Иммунология. Киев, «Здоров'я», 1973, 6, с. 87—89.
2. Аронов Г. Е., Лаптева Н. А. Иммунологические сдвиги при аллотрансплантации в эксперименте.— Иммунология. Киев, «Здоров'я», 1974, 7, с. 91—93.
3. Гулая Н. М., Губенко К. П., Волчанська В. В., Комиссаренко С. В. Гальмуюча дія метилендифосфонової кислоти на активність неорганічної пірофосфатази та ДНК-залежної РНК-полімерази з тканини тварин.— Тези III Українського біохімічного з'їзду. Донецьк, 1977.
4. Гулый М. Ф., Журавский Н. И., Комиссаренко С. В., Борисевич А. Н., Карлова Н. П., Селезнева Т. Н. Торможение иммунного ответа метилендифосфоновой кислотой.— Иммунология. Киев, «Здоров'я», 1974, 7, с. 23—26.
5. Колесников М. М., Марченко Н. Н., Стежко В. А. Столбнячные эритроцитарные диагностикумы.— Современные проблемы специфической профилактики столбняка и дальнейшего снижения заболеваемости. Львов, 1975, с. 96—99.
6. Колесников М. М., Сергеева Т. И., Константинова Н. Д. Высокочувствительный столбнячный эритроцитарный диагностикум.— Современные проблемы специфической профилактики столбняка и дальнейшего снижения заболеваемости. Львов, 1975, с. 99—100.
7. Комиссаренко С. В., Гулая Н. М., Губенко Е. П. Ингибирование метилендифосфоновой кислотой активности неорганической пиросфатазы селезенки мышей.— Биохимия, 1977, 48, № 2, с. 238—242.
8. Комиссаренко С. В., Журавский Н. И., Карлова Н. П., Гулый М. Ф. Угнетение метилендифосфоновой кислотой гиперчувствительности замедленного и немедленного типов у морских свинок.— Бюл. эксперим. биол. и мед. 1977, № 9, с. 339—341.
9. Марченко Н. Н. Влияние агрегатного состояния столбнячного анатоксина на иммунный ответ животных при параллельном введении гетерологичной и изологичной противостолбнячной сыворотки.— Вакцины и сыворотки. Киев, «Здоров'я», 1974, 8, с. 133—137.
10. Boyden S. V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.— J. Exp. Med., 1951, 93, p. 107—120.
11. Zhuravsky N. I., Komissarenko S. V., Guly M. F. The effect of methylendiphosphonium acid on antibody synthesis.— Abstracts 9th FEBS mitings. Budapest, 1974, p. 301.

Лабораторія імунології Київського медичного інституту ім. О. О. Богомольця;

Лабораторія імунохімії Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна АН УРСР;

Лабораторія синтезу фізіологічно активних речовин Інституту органічної хімії АН УРСР

Надійшла до редакції
7.IV 1977 р.

I. N. Morgunov, V. G. Bordonos, L. A. Kujun, M. P. Novinskaja,
N. I. Zhuravskij, A. N. Borisevich, S. V. Komissarenko

APPLICATION OF METHYLENE DIPHOSPHONIC ACID TO INHIBIT SOME IMMUNE REACTIONS IN ANIMALS

Summary

The effect of methylene diphosphonic acid subcutaneous administration was studied as applied to the allogenic skin grafting in mice as well as to primary and secondary immune response in rats to antitetanic toxoid and human serum albumin. It was shown that methylene diphosphonic acid injected subcutaneously three times in doses of 30 or 40 μg per g of body weight during immunization or skin grafting prolongs the survival of skin allograft in mice (26-82%) and inhibits the antibody titres during primary and secondary immune responses to antitetanic toxoid and human serum albumin in rats.

Medical Institute, Kiev; Institute of Biochemistry,

Academy of Sciences, Ukrainian SSR;

Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences,
Ukrainian SSR