

УДК 612.453.018:576.8.097.077.3:616—0025—092.4/9—0898843—08

К. Ф. Чернушенко, Л. С. Когосова, Е. Г. Ісаєва, Г. Ю. Аронов,
А. А. Чумак, С. І. Лернер, Н. О. Лаптева, Л. Є. Штейнбах

ВПЛИВ ПРЕДНІЗОЛОНУ НА ФОРМУВАННЯ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ У ВІДПОВІДЬ НА ВВЕДЕННЯ ІНФЕКЦІЙНИХ ТА НЕІНФЕКЦІЙНИХ АНТИГЕНІВ

Гормони надниркових залоз відіграють важливу роль у збереженні гомеостазу організму та визначають нормальний перебіг фізіологічних процесів. Завдяки протизапальній, протитоксичній дії, глюкокортикоїди широко застосовуються в клінічній практиці при лікуванні різних патологічних станів, пов'язаних з порушенням нормальної реактивності організму. Імунодепресивні властивості глюкокортикоїдів використовуються в трансплантології.

Проте, незважаючи на великий клінічний досвід застосування, механізм дії цих препаратів залишається недостатньо з'ясованим. Якщо в перше десятиріччя застосування глюкокортикоїдів їх терапевтичний ефект пов'язували з протизапальною дією, впливом на судинну проникність, колаgenoутворення, формування міжклітинної речовини сполучної тканини [1, 2, 3, 9], то в останні роки особливу увагу привертає їх вплив на різні етапи і вираженість імунологічних реакцій [4, 5].

Специфічна імунологічна відповідь є складним багатоступінчастим процесом, який включає переробку і розпізнавання антигену, проліферацію і диференціювання клітинних популяцій, їх кооперацію, синтез специфічних імуноглобулінів різних класів, літичні клітинні реакції. Тепер уже відомо, що глюкокортикоїди можуть впливати майже на всі етапи розвитку імунної відповіді. Будучи стабілізатором клітинних мембран органел [12], вони пригнічують як неспецифічний, так і специфічний фагоцитоз, уповільнюють вивільнення антигену перетравлюючими клітинами. Залежно від співвідношення згаданих явищ з іншими клітинними і гуморальними реакціями, це може спричиняти як позитивний, так і негативний вплив на остаточні результати розвитку імунної відповіді.

Особливу увагу останнім часом привертає вплив глюкокортикоїдів на тимусну і тимусзалежну лімфоїдну популяцію. Як виявилось, *T*-лімфоцити, що несуть на своїй поверхні рецептори до кортизолу [5, 8], є мішенями для цих гормонів: під впливом глюкокортикоїдів настає інтенсивна загибель лімфоцитів у тимусі та тимусзалежних зонах периферичних лімфоїдних органів. Досліджена дія гормонів на *T*-клітинні субпопуляції, на процеси клітинної кооперації *T-T* і *T-B* типу і міграцію *T*- і *B*-клітин [6, 10]. Встановлені відмінності в чутливості окремих субпопуляцій *T*-лімфоцитів до глюкокортикоїдних гормонів [10, 11].

Формування імунної відповіді на різні антигени пов'язані з участю кількох клітинних популяцій. В зв'язку з цим становить інтерес з'ясування особливостей впливу преднізолону на розвиток імунологічної реактивності, зумовленої інфекційними (мікобактерії туберкульозу) та

неінфекційними (еритроцити барана, шкірний клопот, стрептоміцин) антигенами.

У відділі імунології Київського інституту туберкульозу і грудної хірургії проведене комплексне дослідження дії преднізолону на імунологічні процеси на різних експериментальних моделях, а також у хворих на туберкульоз і саркоїдоз.

1. *Вплив преднізолону на антигенрозпізнавальні клітини при формуванні первинної і вторинної відповіді.* З допомогою тесту розеткоутворення вивчали вплив преднізолону в дозі 1 мг/кг на популяцію антигенрозпізнавальних клітин при первинній і вторинній імунній відповіді на еритроцити барана (ЕБ) і спонтанне розеткоутворення з ЕБ. Досліди проведені на 60 мишах лінії BAL B/c, у яких вивчали кількість розеткоутворювальних клітин (РУК) в тимусі, лімфатичних вузлах, селезінці і кістковому мозку.

Короткочасне застосування преднізолону протягом чотирьох днів до постановки реакції не спричиняло істотного впливу на кількість лімфоцитів, що утворюють спонтанні розетки в усіх досліджуваних органах. Чотириденне введення преднізолону, розпочате водночас з імунізацією ЕБ, сприяло збільшенню кількості РУК у всіх органах при первинній відповіді. Особливо зросла їх кількість у тимусі, становлячи $0,48 \pm 0,12/10^4$ у контролі і $3,48 \pm 0,027/10^4$ в досліді.

На фоні тривалого введення преднізолону (два і три тижні) при вторинній відповіді кількість РУК також зберігалась на більш високому рівні, ніж у контролі. Найвищий вміст їх відзначався в тимусі ($3,66 \pm 0,33/10^4$). На підставі цих даних ми гадаємо, що очевидно, субпопуляція Т-клітин, які утворюють спонтанні розетки, а також антигенрозпізнавальні лімфоцити Т- і В-клітинного походження є кортизонрезистентними. Збільшення їх кількості при первинній і вторинній відповіді під впливом преднізолону, можливо, може бути пов'язане з тим, що при пригніченні кортизончутливої фракції Т-лімфоцитів порушуються субпопуляційні взаємовідношення в Т-системі імунітету з накопиченням Т-клітин, які зв'язують антиген та утворюють спонтанні розетки. Про це свідчать і дані інших авторів, які показали, що у хворих, яких лікували преднізолоном, на фоні зниження абсолютної кількості лімфоцитів спостерігається збільшення вмісту РУК [7].

2. *Вплив преднізолону на розвиток протитуберкульозного імунітету.* Експериментальних тварин інфікували двотижневою культурою мікобактерій туберкульозу (штам Н-32). Морським свинкам (54 тварини) вводили по 0,01 мг сухої ваги мікобактерій в 0,5 мл фізіологічного розчину внутрішньо. Дослідження провадили на 5, 15, 30, 45, 60 і 75 добу після зараження морських свинок і на 5, 10, 15, 20, 25 і 30 добу у мишей. Як у заражених тварин контрольних груп, так і у тварин, яким вводили з моменту зараження преднізолон в дозі 1 мг/кг *per os* (піддослідні групи) досліджували такі показники: внутрішкірні туберкулінові проби; реакцію бласттрансформації (РБТ) лімфоцитів з неспецифічним (ФГА) і специфічним (РРД) стимуляторами; інгібіцію міграції макрофагів (ІММ) з туберкуліном; показник пошкодження нейтрофілів (ППН); титри протитуберкулінових антитіл; цитологічно досліджували пахові лімфатичні вузли і селезінку.

Проведені дослідження показали, що застосування преднізолону пригнічувало розвиток шкірних туберкулінових проб. Уже в ранні строки після зараження спостерігались зміни в клітинному складі лімфоїдних органів, що проявлялось пригніченням проліферації молодих клітинних форм, особливо пролімфоцитів: вміст їх у селезінці контроль-

них мишей становив $103 \pm 20,8^*$, в досліді $46,2 \pm 14,3^*$; у лімфатичних вузлах відповідно $187,0 \pm 17,8$ і $75,0 - 17,6$. Пригнічувалась і проліферація бластів у всі строки дослідження, але особливо виразне пригнічення відзначене на 30—45 день. Так, на 30 добу в лімфатичних вузлах кількість бластів становила $14,4 \pm 3,8$ у контролі і $5,1 \pm 1,8$ у досліді, в селезінці відповідно $7,0 \pm 3,5$ і $0,4 \pm 0,4$ ($p < 0,05$). У мишей вміст бластів починав зменшуватись на 20 добу і достовірно зменшувався на 25 (наприклад, у селезінці контрольних $33,3 \pm 5,6$, дослідних — $10,3 \pm 1,1$; $p < 0,01$).

Відзначені зміни клітинних реакцій *in vitro*: спостерігалась тенденція до ослаблення інгібіції міграції макрофагів на протязі усього досліді, а також пригнічувалось бластоутворення. Істотне ($p < 0,05$) пригнічення бласттрансформації, як у культурах з ФГА ($47,2 \pm 1,3\%$ в контролі і $18,3 \pm 2,1\%$ в досліді), так і з специфічним антигеном РРД ($24,7 \pm 1,5\%$ і $11,6 \pm 1,4\%$ відповідно) відзначено в більш пізні строки дослідження — на 60 день після зараження.

Титри протитуберкульозних антитіл у морських свинок, яким вводили преднізолон, були дещо вищі, ніж у контрольних. Туберкульозні ураження органів з'являлись раніше і швидше зазнавали деструкції у обох видів експериментальних тварин.

Отже, поряд з антипроліферативною дією на молоді клітинні елементи, преднізолон пригнічував гіперчутливість уповільненого типу. Це супроводжувалось більш бурхливим прогресуванням туберкульозу та більш виразним антитілоутворенням.

3. Вплив преднізолону на прояви реакції гістонесумісності. Для здійснення реакції відторгнення проводили пересадку повношарового шкірного клаптя на спину 157 безпородних і лінійних мишей та 180 безпородних щурів. Дослідження на 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14 доби після пересадки провадили при щоденному введенні преднізолону в дозі 1 мг/кг (I група — 69 мишей і 71 щур) або в дозі 15 мг/кг (II група — 25 і 45 тварин відповідно) та при трансплантації *per se* (контрольні групи — по 64 тварини). Вивчали тривалість проживання шкірних клаптів, строки появи і титри антилімфоцитарних антитіл, цитологічні зміни в пахових лімфатичних вузлах, селезінці, тимусі, кількість спонтанних розеткоутворювальних клітин з еритроцитами барана (Е-РУК) в тимусі і селезінці.

Проведені дослідження показали, що введення преднізолону подовжувало тривалість переживання шкірних алотрансплантатів з $8,7 \pm 0,7$ до $12,5 \pm 0,25$ доби у мишей і з $7,2 \pm 0,5$ до $11,4 \pm 0,67$ у щурів. Не виявлено різниці в динаміці між двома групами з різними дозами препарату, але відзначена токсичність дози 15 мг/кг . У тварин, яким вводили преднізолон, інфільтрація шкірного клаптя була менш виражена і пізніше з'являлись перші ознаки відторгнення.

Введення преднізолону істотно впливало на розвиток клітинних реакцій в лімфоїдних органах: гальмувалась проліферація лімфоїдних клітин у селезінці, регіонарних лімфатичних вузлах і тимусі. В селезінці контрольних тварин після алотрансплантації спостерігалось поступове наростання кількості бластів до $23,5 \pm 1,8$ на четверту добу (інтактні тварини — $2,0 \pm 0,6$; $p < 0,01$). У піддослідних тварин, яким давали преднізолон, кількість бластів у перші дні після пересадки не збільшувалась щодо вихідного рівня, а знижувалась і на десятю добу була достовірно нижча, ніж у контрольних та інтактних тварин: $0,8 \pm 0,2$ ($p < 0,05$). На 12—14 доби кількість бластів зростала до $4,7 \pm 1,3$. У кіль-

* В усіх випадках наведено абсолютний вміст на 5000 клітин.

кості пролімфоцитів статистично значимих змін не було, проте вміст їх у селезінці залишався меншим, ніж у контрольних тварин. Відзначені зміни й клітин плазматичного ряду, які полягають у тому, що, незважаючи на поступове наростання юних клітинних форм (з $2,0 \pm 0,6$ на другу добу до $8,5 \pm 3,7$ на дванадцяту), кількість зрілих плазматичних клітин залишалась низькою протягом усіх строків дослідження, коливаючись від $1,6 \pm 0,6$ до $2,8 \pm 0,8$. Це може свідчити про гальмування преднізолоном процесів дозрівання клітин плазматичного ряду.

При вивченні цитологічного складу тимуса у контрольних і піддослідних тварин вже на другу добу після пересадки було виявлене значне пригнічення проліферації пролімфоцитів ($61,0 \pm 12,3$ в контролі, $20,0 \pm 4,3$ — в досліді, $p < 0,05$) з наступним досить швидким відновленням та збільшенням їх кількості до $96,0 \pm 16,2$ на десяту добу. Закономірною виявилась поява в тимусі тварин піддослідної групи на 4—14 доби юних і зрілих клітин плазматичного ряду, тоді як у контрольній групі ці клітини траплялись лише в поодиноких препаратах.

При дослідженні динаміки і титрів антилімфоцитарних антитіл (аглютининів і цитотоксинів) встановлено, що у тварин, яким давали преднізолон, антитіла з'являлись раніше (на п'яту добу), ніж у контрольній групі (на восьму добу), а титри їх були достовірно ($p < 0,05$) вищі: цитотоксинів на десяту добу — $28,4 \pm 1,52$ ум. од. (у контролі — $8,8 \pm 0,71$); лімфаглютининів на 14 добу — $4,6 - 0,22$ (у контролі — $3,0 \pm 0,1$).

Для контролю за станом Т-системи імунітету при алотрансплантації користувались реакцією спонтанного розеткоутворення. Досліди проведені в динаміці на білих безпородних щурах (45 контрольних і 45 піддослідних щурів, які одержували з дня трансплантації по 1 кг/кг преднізолону). Джерелом лімфоцитів служили клітини тимуса і селезінки. Досліди показали, що для контрольних тварин характерні два піки збільшення кількості РУК в обох органах. Наростання їх кількості збігається з появою перших ознак відторгнення алотрансплантата на четверту добу після пересадки (в селезінці $214 \pm 4,1/10^4$ при пересадці і $102 \pm 3,4/10^4$ у тварин без пересадки; в тимусі $138 \pm 9,1/10^4$ і $76 \pm 10,1/10^4$ відповідно). Друге збільшення кількості РУК спостерігалось на десяту добу досліді, тобто після загибелі шкірного клаптя ($238 \pm 2,4$ в селезінці і $186 \pm 1,1/10^4$ в тимусі).

При застосуванні преднізолону перше підвищення кількості РУК на четверту добу досліді було менш виразним і становило в селезінці $172 \pm 2,3/10^4$ клітин, у тимусі — $94 \pm 1,3/10^4$ ($p < 0,05$). Згодом їх кількість продовжувала зменшуватись і на десяту добу становила в селезінці $82,0 \pm 1,8/10^4$, у тимусі — $61,1 \pm 3,0/10^4$ ($p < 0,01$).

Отже, дослідження впливу преднізолону на моделі розвитку реакції гістонесумісності показали, що терапевтичні дози препарату гальмують відторгнення алотрансплантата, пригнічують проліферативні процеси в лімфоїдних органах, особливо різко пригнічуючи розмноження бластів у лімфатичних вузлах і селезінці та пролімфоцитів у тимусі, гальмують дозрівання плазматичних клітин у селезінці та сприяють появі плазматичних елементів у тимусі. Це супроводжується більш ранньою появою антилімфоцитарних антитіл і в більш високих титрах. Реакція спонтанного розеткоутворення, яка відбиває стан клітинного імунітету *in vitro*, значно пригнічувалась у більш пізні строки дослідження.

4. Вплив преднізолону на розвиток експериментальної лікарської алергії. Досліди проведені на 50 морських свинках, яким внутрім'язово протягом трьох місяців вводили по 10000 од/кг стрептоміцину. Половині тварин щодня вводили 1 мг/кг преднізолону *per os*. Через один,

два і три місяці від початку дослідів вивчали клітинний склад пахових лімфатичних вузлів і селезінки, наявність циркулюючих антитіл до стрептоміцину.

У тварин контрольної групи вже з першого місяця введення антибіотика в лімфоїдних органах збільшилась кількість юних і зрілих плазматичних клітин і пролімфоцитів. До трьох місяців ці зміни ставали більш виразними, особливо в селезінці ($p < 0,05$). Вміст преципітуючих антитіл до першого місяця був незначним, але різко збільшився до трьох місяців.

У тварин піддослідної групи вже через місяць після початку лікування преднізолоном зменшилась кількість пролімфоцитів і повністю зникли бласти, що спостерігалось майже на протязі всього періоду дослідження. Проліферація клітинних елементів плазматичного ряду була менше виражена при введенні преднізолону, ніж у контрольних дослідженнях. Зменшувалась, в основному, кількість зрілих плазматичних клітин. Рівень циркулюючих антитіл до трьох місяців був зниженим щодо контролю.

Отже, й на моделі лікарської алергії встановлено, що преднізолон спричиняє більш значний вплив на проліферацію клітин лімфоїдного ряду (бластів) і менший — на процеси дозрівання плазмоклітинних елементів.

5. Вплив преднізолону та природних глюкокортикоїдів на стан лімфоцитів периферичної крові хворих на туберкульоз і саркоїдоз. Ми вивчали вплив глюкокортикоїдів (преднізолону, кортизону і кортизолу) на функціональний стан лімфоцитів периферичної крові у хворих на туберкульоз (50 осіб) і активний прогресуючий саркоїдоз (75 осіб). Для контролю обслідувано 20 здорових осіб. Досліджували вплив преднізолону (12 мкг/мл культури) і кортизону (10 мкг/мл) на бласттрансформацію лімфоцитів з ФГА, реакцію інгібіції міграції лейкоцитів (ІМЛ) з туберкуліном, показники виживання лімфоцитів у присутності різних доз кортизолу. Додавання преднізолону і кортизолу в культуру лімфоцитів хворих на туберкульоз різко пригнічувало бластоутворення на ФГА (без гормональних препаратів — $55,9 \pm 2,0\%$, при застосуванні преднізолону — $37,0 \pm 2,7\%$). У хворих на саркоїдоз такі ж дози препаратів не пригнічували бласттрансформацію на ФГА, а, навпаки, стимулювали трансформацію лімфоцитів, раніше слабо виражену. При цьому особливо значний вплив спричиняв кортизон ($14,9 \pm 2,7\%$ бластів у культурах з ФГА без кортизону і $58,5 \pm 4,4\%$ при додаванні гормону). Така сама закономірність була відзначена при вивченні впливу кортизону на інтенсивність реакції ІМЛ з туберкуліном.

Вивчаючи вплив різних доз кортизолу на життєздатність лімфоцитів периферичної крові *in vitro* встановлено, що у осіб контрольної групи кількість життєздатних лімфоцитів залежно від дози кортизолу (0,2 і 5 мкг/мл) відповідно становила $70,6 \pm 3,68$ і $42,0 \pm 5,57\%$. У хворих на саркоїдоз навіть великі дози кортизолу не спричиняли виразного літичного впливу на лімфоцити. Ці показники в групі хворих на саркоїдоз становили $84,3 \pm 5,13$ і $71,5 \pm 7,6\%$.

Отже, проведені дослідження показали, що хворі на туберкульоз і активний прогресуючий саркоїдоз мають різну чутливість до дії глюкокортикоїдів. Це свідчить про протилежний характер змін функціонального стану лімфоцитів у хворих цих двох груп. Якщо для хворих на туберкульоз характерний типовий для здорових осіб вплив преднізолону на клітинні реакції *in vitro*, то у хворих на саркоїдоз відзначалась не просто висока стійкість лімфоцитів до глюкокортикоїдів, а відновлення функції Т-системи лімфоцитів.

Отже, проведене комплексне дослідження глюкокортикоїдів дозволило встановити багатобічний вплив їх на різні імунологічні феномени. Малі дози преднізолону вже в ранні строки дослідження гальмують проліферацію клітин лімфоїдного ряду в імуокомпетентних органах, що сприяє менш виразній інфільтрації алотрансплантата і приводить до уповільненого його відторгнення. При інфекційному процесі преднізолон пригнічує проліферативні реакції та гіперчутливість уповільненого типу до туберкуліну, що супроводжується більш швидкою деструкцією осередків у заражених тварин.

Гуморальні реакції імунітету під впливом преднізолону змінюються в іншому напрямку. Препарат незначно пригнічує проліферацію плазматичних клітин при лікарській алергії, але сприяє збільшенню юних форм плазматичних клітин при алотрансплантації та інфікуванні мікобактеріями туберкульозу, що супроводжується посиленням специфічного антитілоутворення. Можливо, ці процеси пов'язані з порушенням взаємовідношень *T*- і *B*-популяцій лімфоїдних клітин, зокрема, з деяким розгальмуванням *B*-системи імунітету при пригніченні *T*-клітинних реакцій. Крім того, на підставі даних про збільшення вмісту розеткоутворювальних клітин під впливом преднізолону, ми гадаємо, що глюкокортикоїди можуть впливати й на взаємовідношення всередині окремих субпопуляцій імуокомпетентних клітин.

Література

1. Глин Л. Х. Кортизонотерапия. М., Медгиз, 1960. 319 с.
2. Горизонтов П. В. Роль гормонов в общем и адаптационном синдроме и болезни адаптации.— Советская медицина, 1960, № 8, с. 10—18.
3. Здродовский П. В. Проблемы инфекции, иммунитета и аллергии. М., «Медицина», 1963. 354 с.
3. Ковалев И. Е., Сергеев П. В. Введение в иммунофармакологию. Казань, 1972. 296 с.
5. Пыцкий В. И. Кортикостероиды и аллергические процессы. М., «Медицина», 1976. 183 с.
6. Хаитов Р. М. Новый принцип иммунодепрессии: угнетение отдельных этапов иммуногенеза (миграция стволовых *B*- и *T*-клеток и взаимодействия *B*- и *T*-лимфоцитов).— Мед. РЖ, 1975, разд. XXI, № 3, с. 9—20.
7. Bach J. F., Dardenne M., Davies A. J. Further development of the rosette inhibition test for the testing of antihuman lymphocyte serum.— Nature (L.), 1971, 231, p. 110—112.
8. Claman H. Signal theory in cellular immunology. Collaboration between *T*- and *B*-lymphocytes in the immune response.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, 249, p. 27—33.
9. Laskin D. M., Engel B. Effect of hyaluronidase and cortisone on connective tissue studied.— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1957, 94, p. 749—751.
10. Pierce C. W., Peave D. L., Tadakuma T. Suppressor *T*-cells as regulator of lymphocyte function.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, 256, p. 365—374.
11. Shortman K. The separation of the different cella classes from thymus.— Austr. J. exp. Biol. and Med. Sci., 1968, 46, p. 375—396.
12. Weissman G. Lysosomes, autoimmune phenomena and diseases of connective tissue.— Lancet, 1964, 2, N 7374, p. 1373—1375.

Відділ імунології
Київського інституту туберкульозу
та грудної хірургії

Надійшла до редакції
10.V 1977 р.