

УДК 612.017

О. Ф. Мельников

СТИМУЛЯЦІЯ *IN VITRO* КІЛЕРНОЇ ФУНКЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ ЛЮДИНИ АНТИЛІМФОЦИТАРНОЮ СІРОВАТКОЮ

Поряд з пошуками імунодепресантів, застосовуваних, переважно, в трансплантології, провадиться дослідження речовин, які стимулюють гуморальний і клітинний імунітет. Особливого значення це набуває при інфекційній патології в дитячому віці, в період формування імунологічної реактивності.

Антилімфоцитарна сироватка, застосовувана як імунодепресант, порівняно мало відома як стимулятор імунологічних реакцій [1, 2].

Ми вивчали можливість стимуляції антилімфоцитарною сироваткою цитотоксичної активності лімфоцитів мигдалин людини *in vitro* щодо інтактних гетероеритроцитів, еритроцитів, кон'югованих з мікробними антигенами і клітин-мішеней, вкритих антитілами до них.

Методика досліджень

Лімфоцити. Лімфоцитарну суспензію одержували з тканини мигдалин людей, яким була проведена тонзилектомія.

Мигдалини багаторазово відмивали в розчині Хенкса, що містить антибіотики (1 тис. од/мл пеніциліну, 200—300 мкг/мл стрептоміцину), видаляли некротизовані ділянки, нарізали на дрібні шматочки, знову відмивали середовищем 199 без антибіотиків, подрібнювали механічно, фільтрували крізь нейлон, тричі промивали середовищем 199 (+4°С). Після цього зважували в повному середовищі для культивування (середовище Ігла або 199; 10% інактивованої прогріванням при 56°С телячої сироватки; L-глутамін у кінцевій концентрації 2 ммоль; 100 од/мл пеніциліну і 60 мкг/мл стрептоміцину) до концентрації 5×10^7 лімфоцитів в 1 мл. Життєздатність клітин оцінювали в пробі з трипановим синім.

Клітини-мішені. Клітинами-мішенями служили стерильні еритроцити курчат. Одну частину еритроцитів у стерильних умовах мітили ізотопом хрому (Cr^{51}); другу частину таких еритроцитів заздалегідь навантажували антигенами гемолітичного стрептокока з допомогою танінової кислоти, а потім приєднували ізотопний маркер; третю частину гетероеритроцитів обробляли спочатку антитілами до них у сублітичній дозі [4], потім так само приєднували ізотоп хрому.

АЛС. Антилімфоцитарна сироватка одержана багаторазовою підшкірною імунізацією осла лімфоцитами мигдалин людини. Цитотоксичний титр на день дослідження становив 1:10 (за 50% виходом ізотопного маркера Cr^{51} з 5×10^6 життєздатних лімфоцитів мигдалин людини при 1,5 год культивуванні різних розведень сироватки і комплекменту у співвідношенні 1:10). В дослідях брали АЛС у дозі 0,5 мл на одну пробу.

Основний дослід. Постановку цитотоксичного тесту здійснювали за [6]. Клітини-мішені і лімфоцити змішували у співвідношенні 1:10 в загальному об'ємі середовища 1 мл. В контрольні флакони замість лімфоцитів додавали 2×10^7 немічених гетероеритроцитів або 10^7 мертвих лімфоцитів. Кожну лімфоцитарну суспензію ми досліджували на можливість стимуляції АЛС неспецифічного цитолізу, гадааної імунної клітинної реакції (навантажені мікробними антигенами клітини-мішені), а також цитолізу, зумовленого лімфоцитами щодо клітин-мішеней, оброблених антитілами. Контролем дії АЛС служила нормальна сироватка осла, яку додають у суміш клітин в тих самих дозах.

Флакони інкубували протягом доби при 37°С та визначали радіоактивність супернатанта на установі «Гамма-Угорщина». Процес лізису виражали формулою: $A\% =$

(Дослід — Контроль) $\times 100$

Радіоактивність 1 дози клітин-мішеней.

Одержані результати оброблені із застосуванням *t*-тесту.

Результати досліджень та їх обговорення

АЛС у кінцевому розведенні 1 : 100 була неефективною в стимуляції кілерної активності токсиларних лімфоцитів. АЛС у дозі 0,05 мл на пробу істотно стимулювала цитолітичну активність клітин мигдалин (табл. 1). Крім того, нами показано, що культивування лімфоцитів мигдалин з АЛС менше 5 хв і наступне дворазове відмивання лімфоцитарної суспензії не стимулювали цитотоксичного ефекту.

Інкубування АЛС з лімфоцитами протягом 15 хв, 1 год і 1 доби супроводжувалося виразною стимулюючою кілерну функцію лімфоцитів дією АЛС (табл. 2), навіть при наступному відмиванні моноклеарів.

Таблиця 1

Вплив АЛС на різні види цитолітичної активності лімфоцитів мигдалин

Досліджувані показники	Вихід Cr^{51} з клітин-мішеней, в %		
	Контроль (нормальна сироватка осла)	Дослід (АЛС)	Кількість дослідів
Неспецифічний цитоліз	$9,6 \pm 2,7$	$25,6 \pm 3,0$ $t=3,91$	15
Імунний цитоліз (клітини-мішені з мікробними антигенами)	$12,1 \pm 4,1$	$21,7 \pm 6,0$ $t=1,25$	15
Антитілозалежний цитоліз (клітини-мішені, вкриті антитілами)	$2,8 \pm 1,6$	$26,0 \pm 7,2$ $t=3,1$	16

Таблиця 2

Вплив часу інкубації лімфоцитів з АЛС на їх кілерну активність

Досліджувані показники	Вихід Cr^{51} з клітин-мішеней, в %			
	5 хв	15 хв	1 год	24 год
Неспецифічний цитоліз (n-3)	16,0	42,0	44,0	47,0
Імунний цитоліз (n-3)	13,0	52,3	39,6	41,6
Антитілозалежний цитоліз (n-3)	0,66	42,3	37,6	32,3

Отже, одержані нами дані свідчать про те, що антилімфоцитарна сироватка може *in vitro* істотно стимулювати кілерну функцію лімфоцитів мигдалин людини. Час мінімального контакту АЛС і лімфоцитів, необхідний для досягнення стимулюючого ефекту, перебуває в межах 5—15 хв.

При цьому слід відзначити, що найвиразніше посилення цитолізу спостерігається при додаванні лімфоцитів, оброблених АЛС, до чистих гетероеритроцитів, які несуть тільки ізотопний маркер, а також до гетероеритроцитів, заздалегідь оброблених гемолітичними гомологічними антитілами. Менше посилення цитолізу відзначено при культивуванні клітин-мішеней, вкритих мікробними антигенами, і лімфоцитів.

Популяція лімфоцитів, яка спричиняє неспецифічний деструктивний ефект без попередньої сенсibilізації, належить до Т-лімфоцитів [7, 8]. Одна з субпопуляцій Т-лімфоцитів може бути представлена сенсibilізованими до антигенів стрептокока лімфоцитами мигдалин [3].

Антитілозалежний цитоліз більшість дослідників пов'язують з рецептором В-лімфоцитів, здатних реагувати на комплекс антиген-антитіло [4, 5].

Отже, АЛС в умовах культивування *in vitro* з лімфоцитами здатна стимулювати ефекторну функцію як Т-, так і В-лімфоцитів. Механізм дії АЛС *in vitro* на лімфоцити багато в чому неясний і пов'язаний, очевидно, з мітогенною дією сироватки. Стимуляція цитотоксичної активності лімфоцитів АЛС може бути використана для посилення клітинного імунітету як в умовах клініки, так і в експерименті.