

УДК 616.71—018:46:615.373.3

А. С. Тимченко, М. Ф. Скуратовский

ИММУНОДЕПРЕССИВНЫЕ СВОЙСТВА АНТИЛИМФОЦИТАРНОЙ СЫВОРОТКИ, ПОЛУЧЕННОЙ НА АЛС-РЕЗИСТЕНТНЫЕ ЛИМФОЦИТЫ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

Исследованиями последних лет доказано, что костный мозг является не только источником иммунокомпетентных клеток, но и активным анти-телообразующим органом [1, 6, 8, 14]. Поэтому интерес исследователей к антикостномозговой сыворотке (АКМС) теоретически оправдан. Показано [7, 10, 12], что АКМС действует на гуморальный и не оказывает существенного влияния на трансплантационный иммунитет. Это объясняется избирательным действием АКМС на В-клетки [12].

Учитывая гетерогенность популяций лимфоцитов [6], а также то, что не все они повреждаются при введении АЛС [2], возникает необходимость дальнейшего изучения роли АЛС-устойчивых лимфоцитов костного мозга в формировании гуморального и трансплантационного иммунитета.

Мы поставили перед собой задачу получить антилимфоцитарную сыворотку на лимфоциты костного мозга, резистентные к антикостномозговой сыворотке и изучить ее влияние на гуморальный и трансплантационный иммунитет при раздельном и комбинированном ее применении.

Методика исследований

Исследования проведены на белых беспородных крысах весом 180—200 г. АЛС-резистентные лимфоциты костного мозга выделяли на третьи сутки после двукратного введения антикостномозговой АЛС по 0,25 мл/100 г. Суспензию костномозговых клеток получали промыванием трубчатых костей охлажденной средой 199 с добавлением нормальной сыворотки крыс (конечная концентрация 20%) на гепарине. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 400—500 об/мин на центрифуге ЦЛР-1 при 4°C в течение 5 мин. Средний слой, содержащий костномозговые клетки, забирали и разбавляли средой 199. Лимфоциты из разбавленной суспензии костномозговых клеток выделяли в градиенте фикола-урографина [9]. Обогащенную лимфоцитами суспензию (70%) костномозговых клеток использовали для иммунизации с целью получения АЛС. Иммунизацию проводили по схеме [15], модифицированной в лаборатории применительно к мелким животным. На одно введение кролику использовали 1×10^8 , а на весь цикл иммунизации — до 1 млрд. клеток.

Кровь для получения сыворотки забирали на 8—11 день после последней инъекции клеток. Сыворотку после инактивации комплемента при 56°C в течение 30 мин истощали эритроцитами крыс. Титр лимфоцитоксинов по [11] в модификации [3] составлял 1:128. Иммунодепрессивные свойства сыворотки определяли по угнетению количества анти-телообразующих клеток в селезенке [13] и по времени пролонгации жизнеспособности аллотрансплантатов кожи.

Статистическую обработку сроков выживания трансплантатов проводили по методу Монцевичюте-Эрингене [5], а обработку количества антителообразующих клеток в селезенке с помощью непараметрических критериев, критерия U [4].

Результаты исследований

В первой серии опытов (четыре группы животных по шесть крыс) изучали влияние АЛС, полученной на лимфоциты костного мозга, резистентные к АКМС, на содержание антителообразующих клеток селезенки, как при раздельном ее введении, так и при совместном введении с АЛС, полученной на лимфоциты лимфоузлов и селезенки интактных животных.

Сыворотку вводили внутривенно ежедневно по 0,25 мл/100 г в течение четырех дней. Эритроциты барана (1×10^9) вводили внутривенно на следующий день после последнего введения сыворотки. На пятый день после введения ЭБ у животных определяли количество бляшкообразующих клеток селезенки. Животным контрольной группы вводили НКС в тех же количествах и в те же сроки.

Количество антителообразующих клеток в селезенке крыс после введения сывороток различной специфичности

Вид сыворотки	Число животных	Число антителообразующих клеток на 1×10^6 ядросодержащих клеток	p
I НКС+НКС+НКС+НКС	6	$274 \pm 21,7$	—
II НКС+НКС+АКМС _p + +АКМС _p	6	$268 \pm 33,8$	I—II >0,05
III НКС+НКС+АКМС+ +АКМС	6	$223 \pm 6,6$	I—III <0,05
IV НКС+НКС+АЛС+АЛС	6	$192 \pm 13,6$	I—IV <0,005
V АЛС+АЛС+НКС+НКС	6	$208 \pm 3,7$	I—V <0,005
VI АЛС+АЛС+АКМС _p + +АКМС _p	6	$176 \pm 14,4$	I—VI <0,001

Примечание. Для стандартизации групп по гетеробелку в контрольной группе (I) НКС вводили четыре раза, а дополнительно к АЛС два раза в группах II, III, IV, V.

Количество бляшкообразующих клеток в селезенке крыс контрольной группы после четырехразового ежедневного введения НКС составляло $274 \pm 21,7$ (см. таблицу). Крысам опытной группы в первые два дня вводили НКС, затем последующие два дня АЛС к резистентным лимфоцитам. Количество бляшкообразующих клеток у этих животных составляло $268 \pm 33,8$. При двукратном введении НКС, а затем АКМС количество бляшкообразующих клеток составляло $223 \pm 6,6$ (третья группа). В группе крыс, которым дважды вводили НКС, а затем АЛС, полученную на лимфоциты лимфоузлов и селезенки и в группе крыс, где дважды вводили АЛС на лимфоциты лимфоузлов и селезенки, а затем дважды НКС, количество бляшкообразующих клеток было $192 \pm 13,6$ и $208 \pm 3,7$ соответственно.

Как видно из полученных данных, сыворотка против резистентных лимфоцитов костного мозга незначительно влияет на количество антителообразующих клеток при иммунизации эритроцитами барана.

АКМС и АЛС, полученная на лимфоидные клетки лимфоузлов и селезенки при введении в различные сроки до антигенной стимуляции, значительно подавляет образование антителообразующих клеток в селезенке. Разница между контрольной и опытной группами статистически достоверна ($p < 0,05$ для АКМС и $p < 0,005$ для АЛС).

Учитывая гетерогенность популяций лимфоцитов костного мозга и то, что АЛС действует преимущественно на популяции Т₂- и В-лимфо-

цитов [16], представляло интерес исследовать совместное воздействие АЛС и сыворотки, полученной к резистентным лимфоцитам, на количество бляшкообразующих клеток в селезенке.

В этой группе опытов мы дважды вводили АЛС, а затем дважды сыворотку, полученную на лимфоциты костного мозга, устойчивые к АКМС. Количество антителообразующих клеток составляло $17,6 \pm 14,4$. В данной группе получено наиболее значительное снижение количества БОК.

Сопоставляя результаты опытов, где проводилось комбинированное введение АЛС и АКМС на резистентные лимфоциты (АКМС) и их раздельное введение, необходимо отметить, что совместное введение сывороток угнетает образование антителообразующих клеток в селезенке намного больше, чем раздельное их введение.

В следующей серии опытов мы изучали влияние исследуемой сыворотки на выживаемость аллотрансплантатов кожи у шести крыс. Сыворотку вводили внутривенно по $0,25 \text{ мл}/100 \text{ г}$ дважды до пересадки кожи и четыре раза через день после пересадки лоскута. Крысам контрольной группы вводили НКС. Средняя продолжительность жизни аллотрансплантатов у подопытных крыс составляла $11,0 \pm 0,3$ дня при $9,5 \pm 0,4$ дня у контрольных животных. АКМС пролонгировала выживание аллотрансплантатов до $12,1 \pm 0,7$ дня (при $14,8 \pm 0,4$ дня в опытах с введением АЛС, полученной на лимфоциты и селезенку крыс).

В группе опытов (шесть крыс) с комбинированным введением сывороток дважды вводили обычную АЛС, а затем после пересадки кожи дважды АКМС и дважды сыворотку на АЛС-резистентные лимфоциты костного мозга. Средняя продолжительность жизни аллотрансплантатов составляла $18,1 \pm 0,6$ дня (при $9,5 \pm 0,4$ дня у интактных крыс).

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о том, что комбинированное введение сывороток различной направленности пролонгирует сроки выживания аллотрансплантатов кожи больше, чем раздельное их введение. Сыворотка, полученная на лимфоциты костного мозга, резистентные к АКМС самостоятельно не влияла на продолжительность жизни аллотрансплантатов кожи. АКМС также существенно не изменяла сроков выживания, тогда как АЛС к лимфоцитам и селезенке продлевала срок выживания на 5,3 дня. Разница по сравнению с контрольной группой статистически достоверна ($p < 0,001$).

Можно предположить, что АЛС, полученная на АЛС-резистентные лимфоциты костного мозга, влияет на популяцию лимфоцитов, устойчивых к обычной АЛС, полученной на лимфоциты лимфоузлов и селезенки. Эта молодая популяция лимфоцитов в последующем, дифференцируясь, принимает активное участие в иммунных реакциях.

Выводы

1. АЛС, полученная на лимфоциты костного мозга, резистентные к АКМС, незначительно угнетает продукцию антителообразующих клеток в селезенке крыс при иммунизации эритроцитами барана и не продлевает сроки выживания кожного аллотрансплантата.

2. Совместное введение АЛС, АКМС и сыворотки, полученной на резистентные лимфоциты костного мозга, наиболее выражено угнетает количество БОК в селезенке на ЭБ и продлевает выживание аллотрансплантатов до $18,1 \pm 0,6$ дня.

Литература

1. Антоненко В. Т., Коврикова Н. П., Тимченко А. С. Аллотрансплантация костного мозга в условиях применения антилимфоцитарной сыворотки.— Гематология и переливание крови, Киев, «Здоров'я», 1973, № 8, с. 82—87.
2. Антоненко В. Т., Тимченко А. С., Бачинська Л. Ю. Участь сенсibilізованих I АЛС-резистентних лімфоцитів лімфоїдних органів у формуванні трансплантаційного імунітету.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1976, № 5, с. 646—649.
3. Капичников М. М. Методы, основанные на феномене цитоллиза. Руководство по иммунологии. М., 1973. 391 с.
4. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. М.—Л., 1973. 141 с.
5. Монцевичюте-Эрингене Е. В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе.— Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1964, 4, с. 71—78.
6. Петров Р. В., Зарецкая Ю. М. Радиационная иммунология и трансплантация. М., «Медицина», 1970. 542 с.
7. Протасова О. В., Перепечкина Н. П., Мац А. Н. Действие антилимфоцитарных сывороток на гетерогенную клеточную популяцию.— Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1971, № 11, с. 132—136.
8. Benner R., Meima F., Van der Menlen Gerda M., Ewijk W. Van. Antibody formation in mouse bone marrow. III. Effects of route of priming and antigen dose.— Immunology, 1974, 27, N 5, p. 747—760.
9. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes.— Tissue, Antigens, 1974, 4, N 4, p. 269—274.
10. Broen B. Von. Über einige Wirkungs eigenschaften eines heterologen Immunserum gegen Knochenmarkzellen der Maus.— Acta biol. et med. ger., 1974, 32, N 6, p. 681—690.
11. Gorer R., O'Gorman P. The cytotoxic activity of isoantibodies in mice.— Transpl. Bull., 1956, N 3, p. 142—156.
12. Gozzo J. J., Troughton D. S., Earle P. W. Humoral antibody suppression with rabbit antimouse bone marrow serum.— Transplantation, 1975, 20, N 3, p. 257—260.
13. Jerne N. K., Nordin A. A. Plavne formation in agar by single antibody-producing cells.— Science, 1963, N 140, p. 405—408.
14. Mc Millan R. e. a. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of Ig«G» production.— J. Immunol., 1972, 109, N 6, p. 1386—1394.
15. Traeger J. e. a. Production of human antilymphocytic serum in horse with thoracic duct lymphocytes and peripheral blood lymphocytes.— Fed. Proc., 1970, 29, N 1, p. 108—110.
16. Wood M. L., Monaco A. P. Differential effect of adult thymectomy in mice treated with ALS and AQS.— Transplantation, 1972, 14, N 6, p. 807—810.

Центральная лаборатория
Киевского института усовершенствования врачей

Поступила в редакцию
10.X 1977 г.

A. S. Timchenko, M. F. Skuratovskij

IMMUNODEPRESSIVE CHARACTERISTICS OF ANTILYMPHOCYTIC SERUM PREPARED AGAINST ALS-RESISTANT BONE MARROW LYMPHOCYTES

Summary

The antilymphocytic serum prepared against ALS-resistant bone marrow lymphocytes of rats was studied for its influence on antibody forming cells in the spleen as well as on the survival terms of skin allografts. Slight suppression of patch forming cells production in the spleen and absence of the prolongation effect on skin allografts are determined. The combined administration of ALS and ABMS against ALS-resistant lymphocytes markedly suppresses production of patch forming cells in the spleen. A successive administration of ALS, ABMS and the examined serum prolonged the survival of skin allografts more considerably (18.1 ± 0.6 days) than separate administration of the above sera (14.8 ± 0.4 , 12.1 ± 0.7 and 11.0 ± 0.3 days, respectively). It is supposed that ALS prepared against bone marrow lymphocytes resistant to ABMS affects the immature lymphocytes population which, getting matured, takes an active part in forming the transplantational immunity.