

УДК 615.365.12:612—017.1

В. Т. Антоненко, С. Ф. Городецкая, Н. П. Пеньковская

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИЦИТОХРОМОКСИДАЗНОЙ СЫВОРОТКИ К ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для подавления трансплантационного иммунитета применяются сыворотки, полученные к различным клеточным субстанциям лимфоцитов. По данным ряда авторов [1, 11, 12, 15, 18, 20, 21], АЛС к митохондриальным, рибосомальным и мембранным фракциям обладают выраженным депрессивным действием. В поисках путей и способов получения сывороток, лишенных побочных токсических свойств и обладающих специфическим действием, многие авторы используют различные ферменты, в том числе ключевые ферменты энергетического и нуклеинового обмена — фосфорилазу, ДНКазу, цитохромоксидазу [2, 7, 8, 17].

В литературе нет данных о получении и иммунологическом изучении антицитохромоксидазных антител из лимфоидных органов экспериментальных животных.

Целью нашей работы было выделение цитохромоксидазы из лимфоидных органов собак и кроликов, использование фермента для получения антицитохромоксидазных сывороток, изучение их иммунологической активности *in vitro* и эффективности *in vivo* по тесту пролонгации аллотрансплантата.

Методика исследований

Цитохромоксидаза была выделена из лимфоидных органов кроликов и собак по методу Окунуки [9], позволяющему получать фермент довольно высокой чистоты. Активность фермента определяли по методу Штрауса [22] и выражали в индофенольных единицах на 1 мг белка (5 мин инкубации при 37° С). Белок определяли по методу Лоури [16]. Для получения антицитохромоксидазной сыворотки (АЦХОС) двух собак и четырех кроликов породы шиншилла иммунизировали 1,5 мг/кг цитохромоксидазы подкожно с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда. Повторные инъекции фермента в тех же количествах делали через 28—30 дней. Затем два дня иммунизировали животных введением 1 и 1,5 мг цитохромоксидазы внутривенно. На седьмой — девятый день после последнего введения брали кровь и определяли наличие преципитирующих антител по методу Уанье [5] и Оухтерлони [19], а также цитотоксические антитела. При получении высоких титров цитохромоксидазных антител животных обескровливали, сыворотки хранили при +4° С.

Мы изучали действие АЦХОС на сроки выживания аллотрансплантатов. Животным за два дня до пересадки вводили внутрибрюшинно испытуемые сыворотки (в дозе 2 мл/кг кроликам и 0,25 мл/100 г крысам) и продолжали их вводить на следующий, третий, пятый и седьмой дни после пересадки кожных лоскутов. Аллотрансплантацию кожи осуществляли в стерильных условиях. Кожу от одного донора пересаживали нескольким реципиентам. Параллельно животным контрольной группы вводили нормальную кроличью сыворотку и нормальную собачью сыворотку, животным второй контрольной группы — сыворотку вообще не вводили. Пересадка лоскута (2×3 см) произведена у крыс в области спины, у кроликов в области уха.

Результаты исследований и их обсуждение

Проведено два выделения цитохромоксидазы (ЦХО) из лимфоидных органов собак; получено 50 мг фермента с активностью 3—4 индофенольных единицы на 1 мг белка. Фермент обладал высокой антигенной активностью, не оказывая при внутривенном введении токсического действия. Получено четыре серии кроличьих АЦХОС к лимфоидным органам собак. При изучении количества антител методом Уанье в сыворотке иммунизированных животных контролем служили результаты, полученные с НКС. Цифровые значения титров опытных серий сывороток в реакции Уанье представлены в табл. 1. Анализ полученных данных показал, что при выработанной схеме иммунизации титры цитохромоксидазных антител были довольно высокими. Для более полной характеристики иммунологических свойств полученных сывороток использовали метод иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони. Формирование линий преципитации наблюдали уже на следующий день после постановки реакции. Титры преципитирующих антител приведены в табл. 1. Титры цитотоксических антител составляли 1:32, 1:64.

Таблица 1

Титры преципитирующих антител в кроличьих антисобачьих сыворотках (метод Уанье и Оухтерлони)

Метод исследования	Серия АЦХОС			
	1	2	3	4
Уанье	1:1280	1:2560	1:2560	1:1280
Оухтерлони	1:8	1:16	1:8	1:4

Проведено четыре выделения цитохромоксидазы из лимфоидных органов кроликов; получено 100 мг фермента. Активность выделенного фермента составляла 2,8—4,6 индофенольных единиц на 1 мг белка; экстинкция индофенольной единицы — 0,330. Полученная при иммунизации собаки сыворотка содержала высокие титры преципитирующих антител, выявленные в реакциях Уанье и Оухтерлони. Титр реакции Уанье составлял 1:1280, Оухтерлони — 1:8; титр цитотоксических антител в РСК 1:320, в цитотоксическом тесте 1:256.

В реакции Оухтерлони проверяли специфичность полученной сыворотки. В центральную лунку наливали антиген-ЦХО из лимфоидных органов кроликов, в три окружающие лунки различные виды АЦХОС (АЦХОС полученная к ЦХО из лимфоидных органов кроликов, АЦХОС из сердечной мышцы собак и АЦХОС из бедренной мышцы собак). Учет реакции показал отличие лишь в скорости появления и выраженности линий преципитации. Наиболее быстро через 12—20 ч появилась линия преципитации с АЦХОС к лимфоидным органам собак. Линии с двумя другими видами АЦХОС появились позже и были менее четкими. Во втором варианте опытов в центральную лунку помещали АЦХОС, полученную к ЦХО из лимфоидных органов собак, в боковые лунки — различные антигены (ЦХО-1 — из лимфоидных органов, ЦХО-2 — из сердечной мышцы собак и ЦХО-3 — из бедренной мышцы). В этой постановке эксперимента проявились те же закономерности. Наиболее быстро и отчетливо линии преципитации появились с ЦХО-1 (две линии преципитации), менее отчетливо — с ЦХО-2 и ЦХО-3 (но линии наблюдались). Дополнительно были проведены

опыты с различными разведениями АЦХОС и антигена. Как показали наши данные, АЦХОС полученная к лимфоидным органам реагировала с ЦХО-2 и ЦХО-3, то есть выделенной из сердечной и бедренной мышц собак в более низком титре (1:2, 1:4), чем с ЦХО-1, полученной из лимфоидных органов собак. В контрольных опытах с тремя НКС формирования линий преципитации не наблюдалось.

Таким образом, сравнительное изучение свойств ЦХО, полученных из сердечной и скелетной мышц собак и лимфоидных органов, показало их высокую антигенную активность.

Однако все три антигена не проявляли выраженной тканевой специфичности, что, по всей вероятности, можно объяснить общностью антигенных свойств фермента цитохромоксидазы, выделенного из перечисленных органов. Различия в скорости появления и выраженности линий преципитаций, вероятно, можно объяснить различиями в изоферментном составе цитохромоксидазы из различных тканей и отличиями в антигенных свойствах изоферментов. Полученные антитела были высокоспецифичны к ЦХО, поскольку цитохром С (контроль) не реагировал в реакции Оухтерлони.

Активность АЦХОС проявлялась также по угнетающему эффекту на цитохромоксидазу в опытах *in vitro*. Кроличья антисобачья сыворотка № 3 в разведении 1:4 угнетала активность цитохромоксидазы в гомогенате селезенки крыс на 40% в течение 5 мин инкубации при 37°С. Разведение гомогената селезенки составляло 1:25. Цельная собачья антикроличья АЦХОС угнетала активность фермента в гомогенате селезенки кролика на 85%.

Указанные сыворотки испытывали *in vivo* по тесту пролонгации кожных лоскутов у крыс и кроликов. В первой серии опытов изучали действие кроличьих антисобачьих сывороток на сроки выживания аллотрансплантатов у белых лабораторных крыс. При однократном введении 0,25 мл/100 г АЦХОС отмечалось уменьшение в периферической крови циркулирующих лимфоцитов до 40—55% исходного уровня. Анализ полученных данных показал, что пересаженные лоскуты до 19 сут находились в удовлетворительном состоянии при избранной схеме введения антицитохромоксидазной сыворотки. Лоскуты были в лучшем состоянии у крыс № 1, 3, 5, 6 (рост волосяного покрова, мягкость лоскута), чем у крыс № 2, 4 (постепенное подсыхание лоскута началось с 14 сут); отторжение на 19 сут отмечалось у крысы № 4 и на 21 сут — у крысы № 2. У остальных крыс подсыхание трансплантатов происходило лишь к 23—25 сут. Наблюдалась корреляция между состоянием кожного лоскута и количеством лимфоцитов в периферической крови. Наименее выраженное уменьшение содержания лимфоцитов наблюдалось при введении АЦХОС у крыс № 2 и № 4, лоскут у них был в худшем состоянии.

Во второй серии опытов исследовали влияние собачьей антикроличьей сыворотки на удлинение жизни аллотрансплантатов у кроликов. Опыты проведены на 17 кроликах, 10 из которых вводили АЦХОС, четырем кроликам вводили нормальную собачью сыворотку, трем кроликам сыворотку не вводили. Полное отторжение кожных лоскутов у контрольных кроликов происходило на 7—12 сут. У животных получавших АЦХОС подсыхание лоскутов происходило на 16—27 сут. Средняя продолжительность жизни лоскутов у подопытных кроликов составляла 22 дня (табл. 2).

Сравнительное изучение влияния АЛС (полученных к антигенам гомогената [1, 3, 4, 6, 14] и митохондрий [10] лимфоидных органов экспериментальных животных) на сроки аллотрансплантации кожи по-

Таблица 2

Сроки выживания трансплантатов кожи у крыс и кроликов

Крысы				Кролики			
№ пп	Кроличья антисобачья АЦХОС	Контроль (интактные)	Контроль НКС (нормальная кроличья сыворотка)	№ пп	Собачья анти-кроличья АЦХОС	Контроль (интактные)	Контроль НКС (нормальная собачья сыворотка)
1	24	9	8	1	21	7	10
2	21	7	10	2	24	9	12
3	26	11	9	3	18	12	9
4	19			4	26		
5	23			5	17		
6	29			6	28		
				7	22		
				8	23		
				9	16		
				10	27		
	<i>M</i> 23,6	9,0	9,0		22,2	9,3	10,3
	$\pm m$ 1,494	1,162	0,581		1,797	1,452	0,871
	$p < 0,001$				$< 0,001$		

казало, что АЛС в применяемых нами дозах продлевает срок жизни кожных лоскутов в среднем на 14—18 дней, антимитохондриальная АЛС — на 20 дней.

Выводы

1. Цитохромоксидаза, полученная из лимфоидных органов по методу Окунуки, вызывает выраженный иммунный ответ у собак и кроликов.
2. Предложенная схема иммунизации способствует преимущественной выработке преципитирующих антител.
3. Полученные антитела специфичны к цитохромоксидазе лимфоидных органов и обладают относительной специфичностью к цитохромоксидазе сердечной и скелетной мышц.
4. Полученная АЦХОС может быть использована наряду с другими биологически активными веществами в качестве иммунодепрессивного средства для подавления трансплантационного иммунитета.

Литература

1. Антоненко Л. И. Порівняльне вивчення впливу АЛС проти нормальних і сенсibilізованих лімфоцитів на виживання аллотрансплантатів шкіри шурів.— Фізіол. журн., 1974, 20, № 5, с. 550—556.
2. Антоненко В. Т., Городецкая С. Ф., Пеньковская Н. П., Корниенко Т. И. Получение и иммунологическое изучение антицитохромоксидазных сывороток к сердечной и скелетной мышцам собак.— Физиол. журн., 1978, 24, № 4, с. 465—471.
3. Антоненко В. Т., Чорненька В. Д. Про участь Т- і В-лімфоцитів лімфоїдних органів у трансплантаційному імунітеті при імунodefіцитах, модельованих антитимусною сироваткою і циклофосфамідом.— Фізіол. журн., 1977, 23, № 6, с. 733—740.
4. Антоненко В. Т., Тимченко А. С., Бачинська Л. Ю. Участь сенсibilізованих і АЛС-резистентних лімфоцитів лімфоїдних органів у формуванні трансплантаційного імунітету.— Фізіол. журн., 1976, 22, № 5, с. 646—650.
5. Гитис Е. М., Казакевич Р. Л., Коврикова Н. П., Муравова Л. П. Использование модифицированной реакции Уанье для выявления циркулирующих антител.— Врачебное дело, 1974, № 4, с. 136—139.

6. Говалло В. И., Космиади Г. А. Изучение иммунодепрессивных свойств антилимфоцитарных сывороток. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1968, **66**, № 10, с. 77—80.
7. Гольдфарб Д. М., Замчук Л. А. Антитела к нуклеиновым кислотам.— М., 1975.— 182 с.
8. Дроженников В. А., Губерниев М. А., Перелазный А. А. К вопросу об ингибировании активности ДНКаз специфическими антителами.— Актуальные вопросы клеточной иммунологии и иммуногенетики. София, 1973, с. 224—228.
9. Окунуки К. Цитохромы из сердечной мышцы крупного рогатого скота.— Аналитические методы белковой химии. М., 1963, с. 37—39.
10. Тимченко А. С. Пересадка костного мозга при иммунодепрессии антилимфоцитарной сывороткой: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Киев, 1974.— 18 с.
11. Davis J. S., Bollet A. J. Effects of antibodies on mitochondria.— J. Clin. Invest. 1962, **1**, N 12, p. 2142—2149.
12. Grey I. G., Monaco A. P., Russel P. S. Heterologous mouse anti-lymphocyte serum to prolong skin homografts.— Surg. Forum., 1964, **15**, p. 142—144.
13. Gorer P. A., O'Gorman P. The cytotoxic activity of isoantibody in mice.— Transpl. Bull., 1956, N 3, p. 142—146.
14. Levey R. H., Medawar P. B. Some experiments on the action of antilymphoid antisera.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966, **129**, N 1, p. 164—177.
15. Levey R. H., Medawar P. B. Nature and mode of action of antilymphocyte serum.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1966, **56**, N 4, p. 1130—1137.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, **193**, p. 265—275.
17. Mochan B. S., Lang R. W., Elliott W. B. Studies on a cytochrome oxidase antibody.— Biochim. et biophys. acta, 1970, **216**, p. 96—121.
18. Nagaja H., Mcsenzie W. N. Immunosuppressive effects of antisera prepared with subcellular fractions of thymus, spleen and lymph nodes.— Transplantation, 1971, **12**, N 5, p. 384—388.
19. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels.— Acta pathol., microbiol., 1953, **32**, p. 231—235.
20. Sell S. Antilymphocytic and antibody. Effects in experimental animals and problems in human use.— Ann. Intern. Med., 1969, **71**, N 1, p. 177—196.
21. Singla O. Immunosuppressive properties of heterologous antilymphocytic sera prepared against thymocyte soluble fraction.— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1972, **140**, N 4, p. 1203—1206.
22. Straus W. Colorimetric microdetermination of cytochrome-c-oxidase.— J. Biol. Chem., 1954, **207**, p. 733—743.

Центральная научно-исследовательская
лаборатория Киевского института
усовершенствования врачей

Поступила в редакцию
15.I 1979 г.

V. T. Antonenko, S. F. Gorodetskaya, N. P. Penkovskaya

PRODUCTION AND IMMUNOLOGICAL STUDY OF THE EFFECTIVITY OF ANTICYTOCHROME OXIDASE SERUM TO THE LYMPHOID TISSUE OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Summary

The paper deals with a production and an immunological study of the effectivity of anticytochrome oxidase serum obtained to cytochrome oxidase from the lymphoid tissue of experimental animals. Cytochrome oxidase obtained by the Okunuki method evokes a distinct immune response in dogs and rabbits; precipitating antibodies are mainly synthesized. The obtained antibodies are specific to cytochrome oxidase of lymphoid organs and relatively specific to cytochrome oxidase of the myocardium and skeleton muscles. An evidence is given for the prolongation of skin allotransplant, which allows to use the obtained cytochrome oxidase sera, among other biologically active substances, as immunodepressive means for suppressing the transplantational immunity.