

УДК 612.017

Н. И. Лисяный, М. А. Меньшова

ВЛИЯНИЕ АНТИЛИМФОЦИТАРНОЙ СЫВОРОТКИ НА ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ТИМУСА И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ИНТАКТНЫХ И СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ГЕТЕРОЭРИТРОЦИТАМИ МЫШЕЙ

Применение антилимфоцитарной сыворотки (АЛС) вызывает угнетение реакций клеточного и гуморального иммунного ответа на тимус-зависимые антигены и в то же время усиление иммунного ответа на тимуснезависимые антигены [1, 2, 8, 13, 19]. Изучение кооперативных клеточных процессов гуморального ответа показало, что АЛС воздействует на T -лимфоциты-помощники, участвующие в формировании реакции на тимусзависимые антигены [2, 16], и на T -лимфоциты-регуляторы интактных животных, тормозящие иммунный ответ на тимуснезависимые антигены [8, 13].

О влиянии АЛС на клетки-регуляторы гуморального иммунного ответа к тимусзависимым антигенам имеются единичные данные [18]. Важное значение в этом виде регуляции придается клеткам тимуса, которые оказывают на формирование ответа как *in vivo*, так и *in vitro*, по данным одних авторов, депрессивное действие [12, 15, 20], по данным других — стимулирующее [19].

Мы изучали влияние АЛС на иммунорегуляторную функцию клеток тимуса — органа, содержащего преимущественно T_1 -лимфоциты, а также клеток лимфатических узлов, где среди субпопуляции T -клеток содержатся в основном T_2 -лимфоциты [9]. Известно, что адаптивный перенос лимфоидных клеток у мышей может усиливать или угнетать иммунный ответ реципиентов, в зависимости от особенностей их генотипа [6].

В наших опытах использованы мыши линии А, у которых адаптивный перенос лимфоидных клеток лимфоузла вызывает угнетение иммунного ответа реципиентов [6].

Методика исследований

Опыты проведены на мышах линии А, полученных из питомника АМН СССР «Столбовое». АЛС получали против клеток лимфатических узлов мышей этой линии на кроликах [10]. Титр лимфоцитотоксиков в сыворотке составлял 1:512. Клетки для адоптивного переноса получали из тимуса и лимфоузлов на четвертый или седьмой день после внутрибрюшинной сенсibilизации эритроцитами барана 0,2 мл 5% взвеси. Выделение тимоцитов и лимфоцитов производили на среде 199. Жизнеспособность выделенных клеток, оцениваемых по 0,1% трипановому синему, составляла 90—93%. Полученные клеточные взвеси ($5 \cdot 10^6$ или $15 \cdot 10^6$ клеток) вводили внутрибрюшинно интактным реципиентам одновременно с внутрибрюшинным введением 0,5 мл 5% взвеси эритроцитов барана.

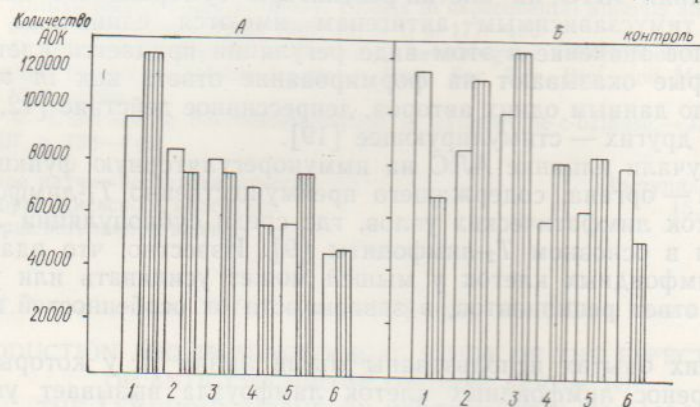
В I серии опытов (шесть—восемь животных в каждой группе) клетки для адоптивного переноса получали от интактных доноров; во II серии опытов (восемь—десять животных в каждой группе) клетки для переноса забирали у доноров, получавших за четыре дня до опыта 0,25 мл АЛС (доза, вызывающая 60—55% угнетения иммунного ответа на эритроциты барана). В III серии опытов (по 10—12 животных в

каждой группе), клетки для адоптивного переноса получали у доноров, сенсibilизированных эритроцитами барана. Донорам вводили по 0,2 мл 0,5% взвеси эритроцитов барана и 0,25 мл нормальной кроличьей сыворотки, а на четвертый и седьмой день забирали клетки для адоптивного переноса. В IV серии опытов (по 10—12 мышей в каждой группе), клетки для адоптивного переноса получали у животных, сенсibilизированных эритроцитами барана на фоне введения 0,25 мл АЛС. Клетки для переноса в этой серии забирали на четвертый и седьмой день после начала сенсibilизации. У реципиентов на четвертые сутки после введения лимфоидных клеток и эритроцитов барана методом локального гемолиза определяли содержание антителообразующих клеток в селезенках [11].

Статистическая обработка материала выполнена по [3] с применением непараметрического критерия «U». Расчет статистической достоверности полученных данных в опытных группах всех четырех серий производился по отношению к данным контрольной группы животных (около 20 мышей), иммунизированных только эритроцитами барана.

Результаты исследований

Рис. 1 иллюстрирует результаты исследований влияния адоптивного переноса сингенных тимоцитов от интактных, сенсibilизированных или сенсibilизированных на фоне введения АЛС доноров на интенсивность иммунного ответа реципиентов. Как видно из рисунка, А, перенос $5 \cdot 10^6$ и $15 \cdot 10^6$ клеток тимуса от здоровых животных существенно не влиял на содержание антителообразующих клеток (АОК) в селезенке реципиентов. Различия между данными этих групп и контрольной группы — животными, иммунизированными только эритроцитами барана — недостоверны ($p > 0,05$). Трансплантация клеток тимуса, полученных на четвертый день после введения донорам 0,25 мл



Содержание антителообразующих клеток в селезенках мышей при адоптивном переносе тимоцитов (А) и клеток лимфатического узла (Б).

Светлые столбики — перенос 5×10^6 , заштрихованные — 15×10^6 клеток тимуса (лимфатического узла). 1 — перенос клеток от интактных мышей; 2 — от животных, получивших за четыре дня до опыта 0,25 мл АЛС; 3 — от животных, получивших за четыре дня до опыта 0,25 мл НКС (норм. крол. сывор.) и 0,5 мл 5% взвеси эритроцитов барана; 4 — от животных, получивших за четыре дня до опыта 0,25 мл АЛС и 0,5 мл 5% взвеси эритроцитов; 5 — от животных, получивших за четыре дня до опыта 0,25 мл НКС и 0,5 мл 5% взвеси эритроцитов; 6 — от животных, получивших за семь дней до опыта 0,25 мл АЛС и 0,5 мл 5% взвеси эритроцитов.

АЛС, вызывала значительное угнетение иммунного ответа реципиентов. Увеличение дозы переносимых клеток тимуса еще более усиливало угнетение иммунного ответа. Статистически достоверное различие между результатами исследований этой серии опытов и данными контрольной группы наблюдалось лишь у мышей, которым трансплантировали $15 \cdot 10^6$ клеток тимуса ($p < 0,05$).

В III серии опытов при переносе тимоцитов от животных с четырехдневной сенсibilизацией эритроцитами отмечалось статистиче-

ски достоверное угнетение иммунного ответа реципиентов, которое усиливалось с увеличением дозы адоптивно переносимых клеток. Способность тимоцитов вызывать угнетение антителообразования у реципиентов сохранялась на седьмые сутки после сенсibilизации доноров эритроцитами барана.

Введение донорам 0,25 мл АЛС одновременно с эритроцитами барана (IV серия опытов) усиливало супрессивное действие на иммунный ответ реципиентов адоптивно переносимых клеток тимуса. Особенно выраженное угнетение иммунного ответа наблюдалось при переносе реципиентам $15 \cdot 10^6$ клеток тимуса от животных с четырех- и семидневной сенсibilизацией.

Таким образом, проведенные опыты показывают, что перенос тимоцитов от животных, получавших АЛС, или от животных, сенсibilизированных эритроцитами барана на фоне введения АЛС, вызывает более выраженное угнетение количества антителообразующих клеток в селезенках реципиентов, чем введение клеток тимуса от интактных или только сенсibilизированных эритроцитами животных.

Адоптивный перенос клеток лимфатических узлов оказывал несколько иное действие на иммунный ответ реципиентов, чем перенос тимоцитов. Так, трансплантация клеток лимфатических узлов от интактных животных (см. рисунок, Б) вызывала угнетение иммунного ответа реципиентов, которое особенно выражено при переносе $15 \cdot 10^6$ клеток, где имелись статистически достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$), тогда как трансплантация клеток лимфатических узлов от животных, получивших 0,25 мл АЛС за четыре дня до опыта, не вызывала угнетения иммунного ответа у реципиентов, что указывает на зависимость этого эффекта от действия АЛС.

При введении реципиентам клеток лимфатических узлов от мышей с четырехдневной сенсibilизацией эритроцитами барана, угнетение иммунного ответа наблюдалось в меньшей степени, чем при переносе интактных клеток лимфоузлов, тогда как трансплантация клеток от доноров с семидневной сенсibilизацией вызывала статистически достоверное снижение иммунного ответа реципиентов.

Увеличение дозы адоптивно переносимых клеток лимфоузлов от сенсibilизированных мышей вызывало уменьшение депрессивного влияния указанных клеток на содержание антителообразующих клеток в селезенке реципиентов.

Введение донорам АЛС одновременно с эритроцитами барана усиливало тормозное влияние адоптивно переносимых клеток лимфоузлов на иммунный ответ реципиентов. Угнетение количества антителообразующих клеток у реципиентов наблюдалось как при переносе клеток лимфоузлов от четырех-, так и семидневно сенсibilизированных доноров на фоне иммунодепрессии АЛС. Различия между данными этой серии опытов и результатами контрольной группы статистически достоверны ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенные опыты показывают, что влияние адоптивно переносимых клеток лимфоузлов на иммунный ответ реципиентов зависит от состояния иммунореактивности доноров. Так, перенос интактных клеток лимфоузлов вызывал уменьшение иммунного ответа реципиентов, тогда как введение АЛС интактным донорам снимало тормозное влияние клеток лимфоузлов.

Сенсibilизация доноров эритроцитами барана также сказывалась на иммунорегуляторных свойствах клеток лимфоузлов, в частности, перенос клеток от животных с четырехдневной сенсibilизацией не оказывал тормозного влияния на иммунный ответ, тогда как перенос

клеток от животных с семидневной сенсибилизацией вызывал угнетение иммунного ответа реципиентов.

При адоптивном переносе клеток лимфоузлов от доноров с четырех- или семидневной сенсибилизацией эритроцитами на фоне иммунодепрессии АЛС отмечалось наиболее выраженное угнетение иммунного ответа реципиентов.

Обсуждение результатов исследований

Изучение иммунорегуляторных свойств клеток тимуса и лимфатических узлов intactных мышей линии А или сенсибилизированных в условиях иммунодепрессии, вызванной однократным введением АЛС, или только сенсибилизированных эритроцитами барана показало, что данные свойства изменяются в зависимости от условий постановки опытов.

У intactных животных ведущую роль регуляции иммунного ответа в условиях адоптивного переноса играют клетки лимфоузлов, которые вызывают угнетение иммунного ответа реципиентов, тогда как клетки тимуса intactных животных не оказывают в подобных экспериментах значительного влияния на иммунный ответ реципиентов.

Сопоставимые с нашими данными результаты были получены другими авторами [5, 6], которые показали, что в основном клетки лимфоузлов (а не тимуса, и не клетки селезенки) intactных животных способны вызывать угнетение иммунного ответа реципиентов.

В то же время при воздействии на организм донора АЛС или сенсибилизации гетероэритроцитами качественно изменяется распределение иммунорегуляторных функций среди клеток лимфоидных органов. Так, введение intactным животным 0,25 мл АЛС вызывает, с одной стороны, исчезновение тормозного влияния на иммунный ответ клеток лимфоузлов, с другой — приобретение указанных свойств клетками тимуса, что позволяет думать о чувствительности иммунорегуляторных клеток лимфоузлов intactных животных к действию АЛС, а также о каких-то изменениях в свойствах тимоцитов. Как указывалось раньше, в лимфоузлах находятся две популяции лимфоцитов, из них наиболее чувствительны к действию АЛС Т-лимфоциты, особенно субпопуляции Т₂-лимфоцитов, которая обладает свойством рециркуляции и составляет основную часть Т-лимфоцитов, заселяющих лимфоузел [9].

Известно, что введение АЛС усиливает иммунный ответ к тимуснезависимому антигену, что рассматривается как признание существования Т-клеток-депрессоров в intactном организме, ограничивающих иммунный ответ на независимые от тимуса антигены и указывает на возможность элиминации этих клеток АЛС [8, 13].

В наших опытах с помощью реакции адоптивного переноса показана возможность потери иммунодепрессивных свойств клетками лимфоузлов при введении intactным животным АЛС. Таким образом, можно предположить, что в лимфатических узлах intactных животных имеются клетки, чувствительные к действию АЛС и ограничивающие интенсивность иммунного ответа на тимусзависимый антиген. Появление иммунорегуляторных клеток в тимусе при введении АЛС или сенсибилизации или, более того, при сенсибилизации на фоне иммунодепрессии АЛС, согласуется с данными о способности клеток тимуса выявлять иммунодепрессивные свойства при воздействии антигенов, митогенов [15, 18], а также об исчезновении способности к развитию супрессивной активности сенсибилизированных животных в условиях тимэктомии у взрослых животных [18].

Помимо этого, клетки тимуса под воздействием АЛС более активны по сравнению с клетками других лимфоидных органов в продуцировании фактора, влияющего на дифференциацию и формирование клеточных популяций лимфоидных органов [7].

Развитие супрессивной активности клеток периферических лимфоидных органов иммунизированных животных наблюдалось при adoptивном переносе спленоцитов на 4 и 7 день [17, 19], а также 7, 14 и 21 день [5] после сенсibilизации гетерозрiтритроцитами доноров. Причем, эти супрессивные свойства связываются с функцией T -лимфоцитов, которые не проявляются у интактных животных. В наших опытах клетки лимфоузлов позже чем клетки тимуса иммунизированных мышей приобретали способность угнетать иммунный ответ реципиентов. Но, если сенсibilизация доноров осуществлялась на фоне введения АЛС, то уже на четвертые сутки клетки лимфоузлов способны угнетать иммунный ответ реципиентов. Эти данные свидетельствуют о том, что при действии АЛС и антигена в тимусе и затем в лимфоузлах появляются иммунорегуляторные клетки, и их накопление или, возможно, распределение с тимуса происходит в данном случае быстрее, чем в условиях одной лишь сенсibilизации.

О появлении T -клеток-депрессоров при применении АЛС свидетельствуют данные о формировании трансплантационной толерантности, вызванной введением АЛС [14], при индукции толерантности к растворимым антигенам [4].

Учитывая литературные данные о ведущей иммунорегулирующей функции T_1 -лимфоцитов в реакциях иммуногенеза [18], а также об органном распределении клеток-регуляторов в селезенке [5, 17], в тимусе [12] и позже в лимфоузлах, при сенсibilизации животных тимусзависимым антигеном можно высказать предположение, что клетки-иммунорегуляторы относятся к популяции T_1 -лимфоцитов. Причем в условиях иммунодепрессии АЛС и введения антигена ускоряется генерация этих клеток, хотя в последнем случае возможны и другие предположения, такие как элиминация клеток-хелперов АЛС и т. д.

Таким образом, обобщая изложенное, можно предположить, что в саморегуляции иммунного ответа можно условно выделить два уровня: первый уровень саморегуляции осуществляется в интактном организме, второй — в «активизированном» сенсibilизированном организме.

В первом случае важную роль в саморегуляции играют T -лимфоциты, чувствительные к действию АЛС, возможно, в этой роли выступают T_2 -лимфоциты.

Во втором случае, в организме в процессе сенсibilизации или сенсibilизации в условиях иммунодепрессии АЛС в тимусе, а затем в периферических лимфоидных органах возникает популяция клеток, способных специфически регулировать иммунный ответ к определенному антигену. Эти лимфоциты устойчивы к действию однократно введенной АЛС. Таким образом, можно согласиться с высказыванием, «что угнетение является составным компонентом нормального иммунного ответа» [18].

Помимо указанного выше предположения о различных уровнях саморегуляции иммунных реакций в интактном и сенсibilизированном организме не исключаются и другие возможные механизмы, в частности, нарушение количественного соотношения в составе субпопуляций лимфоцитов, регулирующее влияние макрофагов, B -лимфоцитов и т. д.

Выводы

1. Введение донорам АЛС усиливало депрессивное действие адоптивно переносимых тимоцитов и лимфоцитов лимфоузлов, сенсibilизированных гетероэритроцитами мышей.

2. Адоптивный перенос клеток тимуса и лимфоузлов от сенсibilизированных эритроцитами на фоне введения НКС животных вызывал угнетение иммунного ответа реципиентов, тогда как при переносе этих клеток от интактных животных депрессивными свойствами обладали лишь клетки лимфоузлов.

3. Тормозное влияние клеток тимуса и лимфатических узлов проявлялось как на четвертый, так и на седьмой день сенсibilизации доноров и зависело от дозы вводимых клеток.

Литература

1. Антоненко В. Т. Об особенностях развития анафилактического шока в условиях применения антилимфоцитарной, антиtimoцитарной и антимакрофагальной сывороток.— В кн.: Аллергия, Киев, 1974, с. 5—7.
2. Вихман А. А., Карасик О. А., Софронов Б. Н. Чувствительность лимфоидных клеток к действию антилимфоцитарной сыворотки на различных этапах иммуногенеза.— Бюл. эксперим. биол. мед., 1971, № 5, с. 77—80.
3. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медикобиологических исследованиях.— Ленинград, 1973.—141 с.
4. Лопатина Т. К. Экспериментальный анализ механизмов толерантности к Ви-антигену *Sal. Lyphu*.— В кн.: Современные методы экспериментальной иммунологии и применение их в медицине. М., 1976, с. 16—20.
5. Писарев В. М., Певницкий Л. А. Изучение феномена специфической супрессии иммунного ответа в системе адоптивного переноса.— Бюл. эксперим. биол. мед., 1975, № 5, с. 571—573.
6. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Батырбеков Л. А. Супрессивное действие сингенных В-клеток на иммунный ответ у мышей, относящихся к высоко- или низкореагирующим генотипам.— Докл. АН СССР, 1976, 226, № 6, с. 1446—1448.
7. Ригвава С. А. Изучение влияния лимфоцитарного гуморального фактора на функцию стволовых гемопоэтических клеток: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1977.—19 с.
8. Barker Ph., Percoft B., Stashek Ph., Amsbough D. Regulation of antibody response to type III pneumococcal polysaccharide by thymic derived cells.— Immune Syst., Genes, Receptors Signals. 3-rd YCN-UCLA Symp. Mol. Biol. N. Y.—L., 1974, p. 415—429.
9. Cauter H., Asofsky R. Synergy among lymphoid cells mediating the graft-versus-host response. II. Synergy in graft-versus-host reaction produced by BA1B/c lymphoid cells of different anatomic origin.— J. Exp. Med., 1970, 131, p. 236—246.
10. Gray G., Monaco P., Wood M., Russel M. Studies of heterologous antilymphocyte serum in immunity.— J. Immunol., 1966, 96, N 2, p. 229—308.
11. Jerne N., Nordin A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells.— Science, 1963, 140, p. 407—412.
12. Ha Tai Gou, Waksman B., Treffer H. The thymic suppressor cell. I. Separation of subpopulation with suppressor activity.— Jour. Exp. Med., 1974, 139, N 1, p. 13—23.
13. Kerbel R., Edinger D. Variable effect of ALS on humoral antibody role of thymus dependence of antigen.— Jour. Immunol., 1971, 106, p. 917—931.
14. Kilshaw P., Brent L., Pinta M. An active suppressor mechanism preventing skin allograft rejection in mice.— Transp. Proc., 1975, N 2, p. 225—228.
15. Lawrence D. H., Weigle W. Stimulation of antibody productions the hapten 2-4-dinitrobenzene by affinity Lateled murine lymphoid cells. II. Suppressive activity of on excess of thymocytes.— Cell. Immunol., 1976, 23, p. 117—125.
16. Martin W., Miller J. Cell to cell interaction in the immune response. IV Site of action of antilymphocyte globulin.— Jour. Exp. Med., 1968, 128, N 4, p. 855—873.
17. Simpson M., Tuffle S., Gozzo L. J. In vivo induction of suppressor activity with rabbit antimouse thymocyte serum and antigen.— Transp. Proc., 1977, N 1, p. 1041—1044.
18. Taylor R. B., Basten P. Ph. Suppressor cells in humoral immunity and tolerance.— British Med. Bullet., 1976, 33, N 2, p. 152—157.

19. Whisler R., Stobo J. D. Heterogeneity of murine regulatory T cells. I Subpopulation of amplifier and suppressor T cells.—*Jour. Exp. Med.*, 1976, 144, N 2, p. 398—413.
20. Wu C. J., Lance P. Immunoregulation by spleen checking thymocytes. II. Role in the response to sheep erythrocytes.—*Cell. Immunol.*, 1974, 13, p. 1—11.

Центральная научно-исследовательская лаборатория
Киевского института усовершенствования врачей

Поступила в редакцию
23.II 1978 г.

N. I. Lisyany, M. A. Men'shova

THE EFFECT OF ANTILYMPHOCYTIC SERUM (ALS) ON IMMUNOREGULATORY
PROPERTIES OF THE THYMUS AND LYMPHATIC NODE CELLS
IN INTACT AND HETEROERYTHROCYTE-SENSITIZED MICE

Summary

The effect of the 0.25 ml ALG single administration was studied as applied to the immunoregulatory properties of the thymus and lymphatic node cells in intact and sensitized mice. It is established that in adoptive transfer either of the thymus or lymphatic node cells to intact syngeneic recipients only the lymphatic node cells possessed immunodepressive activity; ALS administered to donors removed the depressive effect of these cells on the immune response of recipients. In donors sensitized with sheep erythrocytes the immunodepressive activity was higher in the thymus cells than in the lymphatic node cells. Administration of ALS to donors simultaneously with a sensitizing dose of erythrocytes did not remove, and, on the contrary, intensified the depressive effect of the adoptively transferred cells of the thymus and lymphatic nodes on the immune response of recipients. The data obtained are discussed from the position of the immune response self-regulation by T_1 - and T_2 -lymphocytes depending on the functional state of immune reactivity and the ALS effect on the regulation processes.

Central Research Laboratory,
Advanced Training Institute for
Doctors, Kiev