

9. Trainin N., Kook A. I., Umial T., Albala H. The nature and mechanisms of stimulation of immune responsiveness by thymus extracts.— *Annals of New York Academy of Science*, 1975, **249**, p. 349—361.
10. Wara D. W., Amman A. J. Activation of T-cells rosettes in immunodeficient patients by thymosin.— *Annals of New York Academy of Science*, 1975, **249**, p. 308—315.

Киевский институт отоларингологии

Поступила в редакцию
28. IX 1978 г.

УДК 612.017.1:615.363.018

Н. П. Коврикова

ВЛИЯНИЕ СУММАРНОЙ ДНК НА ФОРМИРОВАНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ИММУНИТЕТА У КРОЛИКОВ

Открытие исключительно важной роли нуклеиновых кислот в биосинтезе белка обусловило большой интерес патофизиологов, иммунологов и биохимиков к выяснению функциональной роли этих соединений в иммунологических реакциях организма, в частности, в трансплантационном иммунитете.

В наших предыдущих исследованиях [3, 4] было показано, что формирование трансплантационного иммунитета сопровождается изменениями в содержании нуклеиновых кислот в лимфоидной ткани, причем повышение суммарного количества РНК и ДНК предшествует пику обнаружения антител в сыворотке крови.

Придерживаясь точки зрения, что все процессы жизнедеятельности обусловлены свойствами биологических макромолекул, а развитие трансплантационного иммунитета реализуется на молекулярном уровне, можно предположить, что введенная животному аллогенная суммарная ДНК в организме реципиента, используя в качестве матрицы, «запустит» гомологичный биосинтез белков, оказывающих влияние на продолжительность жизни кожного лоскута.

Однако возможность полноценной реализации в клетке генетической информации экзогенных ДНК исследована недостаточно, а имеющиеся в этом направлении работы крайне разноречивы [5, 7, 13, 14]. В то же время положительные результаты генетической трансформации с помощью нуклеиновых кислот у бактерий служат основанием для изучения этого явления у млекопитающих.

Мы выделяли ДНК из лимфатических узлов интактных кроликов и изучали ее влияние на длительность приживания кожного аллотрансплантата.

Методика исследований

Препараты ДНК получали спиртово-детергентным методом по [11] с последующей очисткой и пересаживанием в этиловом спирте. Анализ полученных препаратов показал, что спектр поглощения в ультрафиолете имеет максимум при 260 нм и характеризуется отношением $E_{260}/E_{230}=2.0-2.6$; $E_{260}/E_{280}=1.8-1.88$, что говорит о нативности и чистоте используемых ДНК. Примеси белка, определенные по [12], составляли менее 1%, РНК — 5—8%. Судя по седиментограмме в градиенте плотности сахарозы, наибольший класс молекул представлен одним пиком.

ДНК растворяли в стерильном стандартно-солевом растворе (0,15M NaCl + 0,015 M лимоннокислый натрий) и вводили внутривентриально из расчета 100 мг/кг за день и в день пересадки аллогенной кожи. Контролем служили кролики, которым внутривентриально вводили ту же дозу стандартно-солевого раствора. Донорский кожный лоскут размером 2×2 см пересаживали на ухо кролика.

Кроликов-реципиентов обследовали в динамике на 3, 7, 14, 21 дни после пересадки и определяли содержание гемолизинообразующих клеток в периферической крови с эритроцитами донора по [9] и розеткообразования в аллосистеме [10]. За розетку принимали скопление вокруг лимфоцита, содержащее три и более эритроцитов донора, но при этом розетки не дифференцировали. Кроме того, определяли активность кислой ДНКазы в сыворотке крови [8].

Опыты проведены на 14 кроликах породы шиншилла, весом 1,9–2,1 кг. В качестве доноров использовались самки. Полученные данные подвергались статистической обработке по [6] с использованием непараметрического критерия «U» [2].

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что продолжительность жизни аллотрансплантата в контроле, т. е. на фоне предварительного двукратного введения стерильного стандартно-солевого раствора, в среднем составляет $12,0 \pm 1,1$ дня, тогда как при введении ДНК интакт-

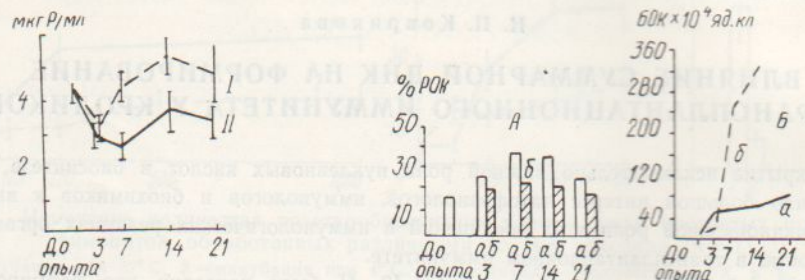


Рис. 1. Активность кислой ДНКазы при пересадке кожи на фоне введения ДНК интактных лимфоузлов (I) и стандартно-солевого раствора (II). По горизонтали — дни после пересадки.

Рис. 2. Содержание розеткообразующих (А) и бляшкообразующих (Б) клеток в периферической крови кроликов после аллотрансплантации кожи. а — на фоне внутрибрюшинного введения стандартно-солевого раствора; б — 100 мг/кг ДНК, выделенных из клеток интактных лимфатических узлов кроликов. По горизонтали — дни после пересадки.

ных лимфатических узлов — $26,0 \pm 1,2$ дня ($p < 0,001$). Следовательно, при применении ДНК интактных лимфатических узлов в дозе 100 мг/кг отмечается удлинение срока жизни аллотрансплантата.

В динамике наблюдения обнаружено изменение деполимеразной активности сыворотки крови реципиентов на третий и седьмой дни после пересадки по сравнению с исходными данными (рис. 1). Так, на третий день, независимо от качества внутрибрюшинно вводимого раствора, наблюдалось снижение ДНКазной активности. К седьмому дню после аллотрансплантации низкие показатели сохранялись только у животных контрольной группы, тогда как на фоне введения ДНК, выделенной из интактных лимфатических узлов кроликов, уровень деполимеразной активности сыворотки крови был близок к исходным данным. В последующие сроки наблюдения, обнаруженные колебания ферментативной активности статистически недостоверны. Можно предположить, что снижение активности кислой ДНКазы сыворотки крови в ранние сроки после трансплантации связано с действием аллотрансплантата, а не внутрибрюшинно вводимого раствора ДНК, поскольку и в опыте, и в контроле на третьи сутки изменения были однотипными и сохранялись на этом уровне до семи суток только в контроле. В то же время на седьмой день после пересадки у подопытных кроликов активность ДНКазы II увеличивалась, приближаясь к исходным данным и сохраняясь на высоком уровне до 14 дня наблюдений. Повышение функциональной активности кислой ДНКазы, возможно, обусловлено усиленной деградацией введенных аллогенных дезоксирибонуклеиновых кислот.

На третьи сутки после аллотрансплантации в периферической крови обследуемых реципиентов отмечается увеличение количества гемолизинирующих клеток с эритроцитами донора, причем в контроле их уровень достоверно выше, чем в условиях предварительного внутрибрюшинного введения ДНК, выделенной из интактных лимфатических узлов кроликов (рисунок 2, Б). Начиная с седьмых суток бляшкообразование у животных опытной группы становится значительно выше, чем в контроле и продолжает расти до 14 дня. К 21 сут наблюдения количество БОК в пери-

ферической крови у всех животных сохраняется на высоком уровне по сравнению с исходным количеством. Следовательно, аллотрансплантация кожного лоскута на фоне внутрибрюшинного введения ДНК интактных лимфоузлов уже с седьмых суток вызывает более выраженную, по сравнению с контролем, активацию показателей гуморального иммунитета, которая сохраняется до 21 дня наблюдений.

Кроме того, в условиях эксперимента обнаружено изменение процентного содержания розеткообразующих клеток в периферической крови кроликов контрольной и опытной групп. Так, после аллотрансплантации кожного лоскута на фоне введения стандартно-солевого раствора отмечается статистически достоверное увеличение количества РОК на 7 и 14 сут (рис. 2, А). При предварительном введении ДНК интактных лимфатических узлов процент розеткообразующих клеток во все сроки наблюдения сохраняется на уровне близком к исходному, то есть происходит торможение клеточного иммунного ответа на донорский антиген. Последнее, по-видимому, связано с каким-то еще неизвестным действием нашего препарата. Возможно, при введении ДНК макромолекулярные взаимодействия оказывают блокирующее влияние на генные локусы клеток донора, приводящие к нарушению синтеза специфических белков-антител.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что предварительное двукратное внутрибрюшинное введение суммарной ДНК, выделенной из клеток интактных лимфатических узлов, в дозе 100 мг/кг удлиняет продолжительность жизни аллотрансплантата кожи кролика более чем в два раза. Наряду с этим обнаружено изменение показателей, характеризующих состояние гуморального и клеточного иммунитета, причем, в условиях нашего опыта выраженность проявлений гуморальных реакций больше, чем клеточных. Отсутствие повышения деполимеразной активности сыворотки крови в ранние сроки наблюдения, по нашему мнению, может свидетельствовать о том, что введенный препарат начинает активно разрушаться между третьими и седьмыми сутками после пересадки.

Наши предварительные данные, в какой-то степени, подтверждают ранее высказанное предположение [1] о том, что под влиянием новой генетической информации изменяется функциональная способность клеток реципиента и может возникнуть взаимная толерантность.

Выводы

1. Предварительное двухразовое внутрибрюшинное введение аллогенной ДНК интактных лимфоузлов в дозе 100 мг/кг вызывает пролонгацию жизни кожного трансплантата у кроликов и на седьмые сутки после пересадки активирует кислую ДНКазу сыворотки крови.
2. В условиях опыта изучаемые показатели гуморального и клеточного иммунитета изменяются неравнозначно. На 7—14 сут после пересадки количество антителообразующих клеток в периферической крови значительно увеличивается, тогда как процентное содержание розеткообразующих клеток изменяется незначительно.

Литература

1. Антоненко В. Т. Взаимная комплементарность и трансплантационный иммунитет. Роль трансформации антигенности в преодолении тканевой несовместимости. — Патологическая физиология тканевой несовместимости. М.: Полиграфист, 1976, с. 5—9.
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико — биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.
3. Коврикова Н. П. Патогенез несовместимости аллогенного костного мозга на фоне гипореактивных состояний: — Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Киев, 1974. — 23 с.
4. Коврикова Н. П. Участие нуклеиновых кислот в формировании трансплантационного иммунитета. — Тезисы докладов II Всесоюзного симпозиума по ранним проявлениям тканевой несовместимости. М., 1976, с. 165.
5. Климов В. Ю. Изучение иммунологических свойств препаратов гомологичных ДНК: Автореферат дис. ... канд. биол. наук. — М., 1970. — 23 с.

6. Монцевичюте-Эрингене Е. В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе.— Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1964, № 4, с. 71—78.
7. Шутко А. Н., Шатина Н. Н. Об информационной активности экзогенной ДНК в облученных клетках.— Укр. биох. журн., 1977, 49, № 2, с. 42—48.
8. Шапот В. С., Чудинова И. А., Кречетова Г. Д. Методы выделения и определения активности нуклеаз.— В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1964, с. 267—277.
9. Cunningham A. Method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells.— Nature, 1965, 207, p. 1106—1107.
10. Haskill J. J., Elliott B. E., Karbel R., Axelrod M. A., Bdingeor B. Classification of thymus-derived and marrow derived lymphocytes by demonstration of their antigen binding characteristics.— J. Exp. Med., 1972, 135, N 6, p. 1410—1415.
11. Kay E. R. M., Simmons N. S., Dounce A. L. An improved preparation of sodium desoxyribonuclease.— J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, N 7, p. 1724—1726.
12. 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.
13. Vorbroadt A., Wilczok T., Schneiberg Kr., Gorski T. Losy obcokomorkowego DNA w ustroju muszypopodaniu dootrzewnum, — Przegl. lekars., 1964, 2, N 9, p. 413—415.
14. Yoon C. H., Sabo J. Bases for failure to induce transformation in vivo with exogenous homologous DNA in mice.— Exp. Cell. Res., 1964, 34, N 3, p. 599—603.

Центральная научно-исследовательская
лаборатория Киевского института
усовершенствования врачей

Поступила в редакцию
15.I 1979 г.

УДК 612.017.1:616.36—002

Т. И. Галенко

РАЗВИТИЕ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА НА ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИНЫ БЦЖ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ

Известно, что поражение печени сопровождается нарушением иммунного статуса организма, в частности изменением реакций на негепатогенные антигены. Однако сведения эти в значительной степени противоречивы.

Мы изучали развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) после введения вакцины БЦЖ в условиях различного функционального состояния печени. Введение животным больших доз антигепатотоксической сыворотки (АГПС) вызывает деструктивные изменения в печени, нарушение ее метаболизма и функций [1, 2]. АГПС, примененная в малых дозах на фоне токсического поражения печени, оказывает стимулирующее, нормализующее действие на структуру и функцию органа [6, 7, 8]. Нами были использованы две модели патологии печени. Первая модель создавалась введением животным больших доз гамма-глобулина, выделенного из АГПС (γ -АГПС); вторая — введением четыреххлористого углерода (токсическое поражение печени). Для решения поставленных задач был использован феномен ингибиции миграции макрофагов, который является одним из наиболее показательных тестов при исследовании клеточного иммунитета.

Работа выполнена на крысах-самках неинбредной линии Вистар. Сенсибилизацию животных вызывали однократным подкожным введением сухой вакцины БЦЖ в дозе 0,3 мг на крысу весом 200 г. Гамма-глобулин из сывороток выделяли по [9], содержание белка определяли по [11]. Большие дозы (21 мг белка на 100 г веса крысы) γ -АГПС вводили внутривенно ежедневно в течение пяти дней. В качестве контроля к действию γ -АГПС использовали γ -НКС (γ -глобулин, выделенный из нормальной кроличьей сыворотки) в аналогичных дозах. Токсическое поражение печени вызывали трехкратным, через два дня на третий введением 0,3 мл/100 г четыреххло-