

УДК 615.373:611—018.46:611—018.834:611.438

Г. Н. Дранник

ПОЛУЧЕНИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММУННЫХ СЫВОРОТОК, ПРЕИМУЩЕСТВЕННО СПЕЦИФИЧНЫХ К Т- ИЛИ В-ЛИМФОЦИТАМ СОБАК

Тот факт, что лимфоциты, участвующие в реализации иммунного ответа, представляют собой неоднородную популяцию клеток [12], заставляет искать новые подходы к дифференциальному изучению участия Т- и В-лимфоцитов в иммунных реакциях организма. Весьма перспективным в этом отношении является получение иммунных сывороток, обладающих преимущественной специфичностью к одной из этих двух субпопуляций клеток. Предпосылками для проведения настоящей работы послужили данные о том, что лимфоидная и мозговая ткани мышей содержат общий антиген, который был назван Θ -антигеном [13] (по новой номенклатуре — Thy 1 антиген). Впоследствии было установлено, что Θ (Thy 1)-антиген является специфическим маркером для большинства Т-лимфоцитов. Оказалось, что сыворотки, полученные после иммунизации животных антигеном, приготовленным из ткани мозга мышей [7], цыплят [6] и крыс [5], обладают выраженным цитотоксическим действием против тимоцитов животных, которые были избраны в качестве донора антигена. Логично было предположить, что если ткань мозга собак также содержит Θ (Thy 1)-антиген, то анти-мозговая сыворотка будет включать антитела, направленные против Т-лимфоцитов. С другой стороны, исследованиями последних лет установлено, что лимфоциты костного мозга состоят в основном из В-лимфоцитов [10, 14], поэтому антисыворотка, полученная при иммунизации таким антигеном, содержит антитела, обладающие специфичностью преимущественно к В-лимфоцитам [1].

В нашу задачу входило получение антисыворотки против мозга собак (АМС); получение антисыворотки против лимфоцитов собак (АЛС) с использованием в качестве антигена лимфоцитов, выделенных из костного мозга; изучение серологических свойств полученных сывороток до и после последовательного многократного истощения сывороток различными антигенами и выделения IgG -глобулина.

Методика исследований

Антимозговую сыворотку получали путем трехкратной иммунизации коз 5 мл водно-солевого гомогената, приготовленного из ткани мозга собак в соотношении 1:3 (одна часть измельченного в гомогенизаторе головного мозга собак и три части 0,15 М раствора NaCl , взятых по объему). Антиген в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда вводили под кожу с недельными интервалами между инъекциями. Антилимфоцитарную — путем двукратной иммунизации лимфоцитами, выделенными из костного мозга. Первая инъекция — под кожу с полным адьювантом Фрейнда вводили 1,2 млрд лимфоидных клеток. Через две недели — внутривенно вводили 1,5 млрд лимфоцитов. Кровь в обоих случаях брали через 7—10 дней после последней инъекции антигена. Серологические свойства сывороток изучали в реакции лимфоцитотоксичности [8], в качестве клеток-мишеней в этой реакции использовали тимоциты, а также лимфоциты, выделенные из костного мозга и лимфоузлов; в реакции связывания комплемента [4]

с антигенами, при этом также в реакции с гетерологичными муринными сыворотками, тканью мозга мышей, проводили микроагрегацию на ДЭА, проводили до 10 мг при 4 °C.

Результаты серологического исследования. В таблице 1 приведены результаты серологического исследования сывороток, полученных из лимфоцитов костного мозга собак. Видно, что сыворотка обладает высокой специфичностью против лимфоцитов костного мозга собак, что подтверждается результатами микроагрегации на ДЭА и микроагрегации на ДЭА при 4 °C.

Результаты серологического исследования

Сыворотки

Антимозговая сыворотка
Антилимфоцитарная сыворотка
Нормальная козья сыворотка

Примечание. В таблице 1 приведены результаты серологического исследования сывороток, полученных из лимфоцитов костного мозга собак, в реакции микроагрегации на ДЭА и микроагрегации на ДЭА при 4 °C.

Напротив, в опытах с тимомоцитами в отношении лимфоцитов костного мозга собак в отношении лимфоцитов костного мозга собак.

Таким образом, полученные сыворотки обладают высокой специфичностью к лимфоцитам костного мозга собак.

Тот факт, что лимфоциты костного мозга собак обладают высокой специфичностью к лимфоцитам костного мозга собак, что подтверждается результатами микроагрегации на ДЭА и микроагрегации на ДЭА при 4 °C.

При изучении реакции связывания комплемента сыворотка, полученная из лимфоцитов костного мозга собак, проявляла высокую специфичность к лимфоцитам костного мозга собак, что подтверждается результатами микроагрегации на ДЭА и микроагрегации на ДЭА при 4 °C.

с антигенами, приготовленными из тканей мозга, сердца, легкого, печени и почки собак; а также в реакции гемагглютинации [2] с эритроцитами собак. Для удаления антител к гетерологичным тканям использовали последовательное многократное истощение иммунных сывороток тимоцитами, лимфоцитами, выделенными из костного мозга, эритроцитами, тканью мозга, печени и почки собак. Выделение фракций, содержащих IgG-глобулин, проводили методами высаливания сернокислым аммонием с последующей хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе [3]. Содержание белка в IgG-глобулиновой фракции довели до 10 мг % путем концентрации в целлофановых мешочках под током воздуха при 4 °С.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты серологического изучения антимозговой и антилимфоцитарной сывороток до истощения представлены в табл. 1, из которой видно, что антимозговая сыворотка проявляла высокую активность против тимоцитов и несколько меньшую против лимфоцитов, выделенных из лимфоузлов собак. В то же время, с лимфоцитами костномозгового происхождения АМС практически не реагировала. Полученные результаты подтвердили наличие общего антигена между мозговой тканью и тимоцитами собак [11].

Таблица 1

Результаты серологического исследования антимозговой и антилимфоцитарной сывороток до истощения

Сыворотки	Лимфоцитотоксичность			Связывание комплемента					Гемагглютинация
	Тимоциты	Л. к/м	Л. л/у	Мозг	Сердце	Легкое	Печень	Почка	
Антимозговая	91	28	65	1:320	—	—	—	1:60	1:128
Антилимфоцитарная	20	95	44	1:10	—	—	—	1:40	1:32
Нормальная козья сыворотка	20	22	15	—	—	—	—	—	1:2

Примечание. Учет производили в реакции лимфоцитотоксичности — по проценту мертвых клеток; в реакции связывания комплемента — по полной задержке гемолиза; в реакции гемагглютинации — по разведению сыворотки. Л. к/м — лимфоциты, выделенные из костного мозга; Л. л/у — из лимфоузлов.

Напротив, антилимфоцитарная сыворотка не реагировала в наших опытах с тимоцитами, обладая при этом очень высокой активностью в отношении костномозговых лимфоцитов и умеренной активностью в отношении лимфоцитов, выделенных из лимфоузлов.

Таким образом, изучение лимфоцитотоксической активности полученных сывороток показало достаточно высокую специфичность антимозговой сыворотки к тимоцитам (Т-клетки), а антилимфоцитарной сыворотки — к костномозговым лимфоцитам.

Тот факт, что и АМС, и АЛС реагировали с лимфоцитами, выделенными из лимфоузлов, не явился неожиданностью, поскольку известно, что лимфоцитарный пул этих лимфоидных органов содержит Т- и В-лимфоциты.

При изучении серологических свойств сывороток в реакции связывания комплемента оказалось, что наибольшую активность АМС проявляла с мозговым антигеном. АЛС с этим антигеном прореагировала всего лишь в разведении 1 : 10. Как АМС, так и АЛС не вступали в реакцию с антигенами, приготовленными из тканей сердца и легкого

собак. Обращает на себя внимание то, что обе сыворотки оказались также неактивными в реакции с печеночным антигеном, хотя проявили довольно высокую активность в реакции с антигеном, приготовленным из почки собак.

Анализ данных, полученных при изучении АМС и АЛС в реакции гемагглютинации показал, что АМС в более высоких титрах, чем АЛС содержала антиэритроцитарные антитела.

Таблица 2

Результаты исследования серологических свойств IgG-глобулинов антимозговой и антилимфоцитарной сывороток

Сыворотки	Лимфоцитотоксичность			Связывание комплемента					Гемагглютинация
	Тимоциты	Л. к/м	Л. л/у	Мозг	Сердце	Легкие	Печень	Почка	
Антимозговая	82	19	60	1:240	—	—	—	—	1:4
Антилимфоцитарная	15	89	35	—	—	—	—	—	1:2
Нормальная козья сыворотка	20	22	15	—	—	—	—	—	1:2

Проведенное серологическое исследование полученных антисывороток позволило более обоснованно провести их истощение. Антимозговую сыворотку истощали лимфоцитами, выделенными из костного мозга, тканью печени, почки и эритроцитами собак. Антилимфоцитарную сыворотку истощали тимоцитами, тканью мозга, печени, почки и эритроцитами собак (несмотря на то, что обе сыворотки в реакции связывания комплемента были неактивными в отношении печеночного антигена, тем не менее, мы посчитали нужным включить его в число абсорбентов).

После истощения из сывороток была выделена фракция, содержащая IgG-глобулин. Результаты исследования серологических свойств IgG-глобулиновых фракций антимозговой и антилимфоцитарной сывороток представлены в табл. 2, из которой видно, что истощение антисывороток и последующее выделение из них фракций IgG-глобулинов повышает их специфичность. Цифры, характеризующие активность IgG-глобулиновых фракций АМС (60 %) и АЛС (35 %) в реакции с лимфоцитами, выделенными из лимфоузлов, указывают, по всей вероятности, на процент содержания соответственно Т- и В-лимфоцитов в лимфоузлах собак. Примерно такое же содержание указанных субпопуляций клеток было обнаружено в лимфоузлах мышей [9].

Выводы

1. Ткань мозга и тимоциты собак обладают общим антигеном.
2. Козья антисыворотка против мозга собак проявляет преимущественную специфичность по отношению к тимоцитам (Т-лимфоцитам) собак.
3. Антисыворотка, полученная при иммунизации коз костномозговыми лимфоцитами собак, проявляет преимущественную специфичность по отношению к лимфоцитам костномозгового происхождения (В-лимфоцитам).

4. Антисыворотка Т- или В-лимфоцитов животного происхождения, полученная с помощью специального инструмента, р...

1. Белокрылов Г. И. Изучение клеток крови и лимфы.
2. Говалло В. И. Иммунология.
3. Кубица Ю. Ф. Иммунология.
4. Мурашова А. И. Иммунология.
5. Clagett I., Petersen J. H. The effect of thymus on the development of the immune system.
6. Feiglova C., Pichler G. The effect of thymus on the development of the immune system.
7. Golub E. S. Brain lymphoid cells.
8. Gorer R., O'Gara J. 1956, N 3, p. 14.
9. Gyöngyössi M. The effect of thymus on the development of the immune system.
10. Howard J. C., and thymus-derived cells.
11. Kongshavn P. The effect of thymus on the development of the immune system.
12. Miller J. F. A. J. 1972, 33, N 77, p. 1.
13. Reif A. E., Allen J. D. The effect of thymus on the development of the immune system.
14. Vyjanovic N., Kraljic M. The effect of thymus on the development of the immune system.

Киевский институт

PREPARATION AND SE
SERA

Goats antiserum against dog lymphocytes was obtained by immunizing goats with dog lymphocytes, but not with dog lymphocytes. The activity of the antiserum was tested by its ability to absorb dog lymphocytes. After this, IgG-globulin fraction was isolated. The specific activity of IgG-globulin fraction was tested by its ability to absorb dog lymphocytes. Experiments proved that B-lymphocytes of dog

Institute of Urology

4. Антисыворотки, обладающие преимущественной специфичностью к Т- или В-лимфоцитам собак, могут быть использованы в качестве инструмента, расширяющего возможности исследователя при изучении интимных механизмов иммунных реакций в эксперименте на собаках.

Литература

1. Белокрылов Г. А. Цитотоксическая сыворотка против В-л, полученная иммунизацией клеток костного мозга.— БЭБим, 1977, № 2, с. 194—196.
2. Говалло В. И. Реакции, основанные на феномене агглютинации.— В кн.: Лабораторная иммунология / Ред. О. Е. Вязов. М., 1967, с. 73—103.
3. Кубица Ю. Ф. Иммунофлюоресценция. М.: Медицина, 1967. 256 с.
4. Мурашова А. И. Реакция связывания комплемента.— В кн.: Лабораторная иммунология / Ред. О. Е. Вязов. М., 1967, с. 156—191.
5. Clagett I., Peter H. H., Feldman I. D., Welgite W. O. Rabbit antiserum to brain-associated thymus of mouse and rat. Analysis of species-specific and cross-reacting antibodies.— J. Immunol., 1973, 110, N 4, p. 1085—1089.
6. Feiglova C., Pihlicova L., Nouza K. Antilymphocytic activity of rabbit anti-chicken anti-brain sera.— Folia biolog., 1972, 18, N 4, p. 256—263.
7. Golub E. S. Brain-associated antigen. Reactivity of rabbit anti-mouse brain with mouse lymphoid cells.— Cell. Immunol., 1971, 2, N 4, p. 353—361.
8. Gorer R., O'Gorman P. The cytotoxic activity of isoantibodies in mice.— Transpl. Bull., 1956, N 3, p. 142—156.
9. Gyöngyössi M. I. C., Playfair I. H. L. Indirect immunofluorescence of mouse thymus-derived cells using heterologous anti-brain serum.— Cell. Immunol., 1973, 7, N 1, p. 118—123.
10. Howard J. C., Scott D. W. The identification of sera distinguishing marrow-derived and thymus-derived lymphocytes in the rat thoracic duct.— Immunology, 1974, 27, N 5, p. 903—922.
11. Kongshavn P. A. L., Gold P., Shuster J., Colquhoun B., Freedman S. O. Ability of antibrain hetero-antisera to distinguish thymus-derived lymphocytes in various species.— Clin. Immunol. and Immunopathol., 1974, 3, N 1, p. 1—15.
12. Miller J. F. A. P. Lymphocyte interaction in antibody response.— Intern. rev. cytol., 1972, 33, N 77, p. 77—136.
13. Reif A. E., Allen G. M. V. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemia and nervous tissues.— J. Exp. Med., 1964, N 120, p. 413—433.
14. Vyjanovic N., Kinsky R. G., Voisin G. A. Premiere demonstration des differences morphologiques entre lymphocytes appartenant des populations cellulaires thymo-dependentes et thymo-independantes.— C. R. Acad. Sci., 1972, D275, N 17, p. 1933—1936.

Киевский институт урологии

Поступила в редакцию
30.X 1978 г.

G. N. Drannik

PREPARATION AND SEROLOGICAL PROPERTIES OF IMMUNE SERA SPECIFIC CHIEFLY TO T- OR B-LYMPHOCYTES OF DOGS

Summary

Goats antiserum against brain tissues (ABS) and bone marrow lymphocytes (ABML) of dog were obtained. Serological analysis shows that the ABS reacted with canine thymocytes, but not with bone marrow lymphocytes; and vice versa, the ABML displayed primary activity with bone marrow lymphocytes, but not with thymocytes. These data suggest that brain tissue and thymocytes of dog have a common antigen. Then the ABS was absorbed by bone marrow lymphocytes, hepatic and renal tissues and red blood cells of dog, the ABML — by thymocytes, brain, hepatic and renal tissues and red blood cells. After this, IgG-globulin was fractionated. Serological studies showed an increase in specific activity of IgG-globulin obtained from the ABS as well as from the ABML. Our experiments proved that in principle antisera possessing primary specificity against T- or B-lymphocytes of dog can be produced.

Institute of Urology, Kiev