

УДК 616.092.18/19—097—092.9

С. А. Бобровник, В. А. Бехало

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ КОРПУСКУЛЯРНОГО АНТИГЕНА СТАФИЛОКОККА ЛИМФОЦИТАМИ МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА

Распознавание антигена специфическими рецепторами лимфоидных клеток является необходимым этапом в индукции иммунного ответа. Связывание антигена В-клетками не зависит от температуры и присутствия метаболитических ядов, но блокируется антииммуноглобулиновой сывороткой [10]. Т-клетки либо вообще не связывают многие растворимые антигены, либо связывают их значительно слабее В-клеток. В тех случаях, когда было продемонстрировано связывание антигена Т-лимфоцитами, этот процесс значительно замедлялся при понижении температуры, а также блокировался ингибиторами дыхания, окислительного фосфорилирования и синтеза белка [1]. Эти данные свидетельствуют о том, что активный клеточный метаболизм необходим для фиксации антигена на клеточной мембране Т-лимфоцита. Следовательно, количество обнаруживаемых антиген-связывающих клеток (АСК) может зависеть от условий инкубирования лимфоидных клеток с антигеном. Кроме того, антиген может неспецифически связываться фагоцитирующими клетками, а также поврежденными лимфоцитами [2], в результате чего эти клетки могут служить источником «ложных» АСК, что также усложняет интерпретацию полученных результатов.

Мы изучали зависимость специфического связывания корпускулярного антигена стафилококка лимфоцитами мышей от температуры, наличия антииммуноглобулиновой сыворотки, азида натрия, а также влияние фагоцитов и поврежденных клеток на обнаружение АСК. Кроме того определяли частоту АСК к корпускулярному антигену стафилококка в лимфоидных органах нормальных мышей линии СВА.

Методика исследований

Использовали *Staphylococcus aureus* штамм Wood-46. Суточную культуру стафилококка, выращенную на мясо-пептонном агаре при 37 °С, смывали физиологическим раствором NaCl (ФР) и инактивировали нагреванием при 85 °С в течение 30 мин на водяной бане. Затем клетки отмывали три раза ФР, ресуспендировали в карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,0) и окрашивали изотиоционатом флуоресцеина (ФИТЦ) как описано ранее [4]. Отмытые от несвязавшегося красителя клетки стафилококка лиофильно высушивали и использовали в опытах в виде суспензии в ФР.

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) конъюгировали с ФИТЦ по [3] и отделяли от несвязавшегося красителя на колонке с сефадексом G 50.

18 ч культуру *Escherichia coli* штамм R 17, инактивированную нагреванием, окрашивали основным карболовым фуксином, обрабатывали 10 мин 1 % раствором танниновой кислоты, тщательно отмывали ФР и хранили при 4 °С.

В опытах использовали мышей линии СВА. Лимфоциты выделяли из костного мозга, селезенки, тимуса и лимфоузлов. Лимфоидные органы гомогенизировали в 0,1 % растворе ЧСА в забуференном физиологическом растворе (ЧСА-3ФР) и фильтровали через нейлоновую ткань. Эритроциты костного мозга и селезенки разрушали гипотоническим шоком, инкубируя клетки 5 мин в 0,83 % NH_4Cl при 4 °С. Затем клетки два раза промывали ЧСА-3ФР, доводили до концентрации $2-6 \times 10^7$ клеток/мл и определяли количество мертвых клеток, окрашивая 0,1 % раствором трипановой синьки. Обычно количество мертвых клеток было меньше 5 %.

В части случаев очистку лимфоидной суспензии от мертвых клеток проводили на градиенте плотности фикал-верографин ($d-1,09$).

Для блокирования иммуноглобулиновых антиген-связывающих рецепторов 0,5 мл суспензии спленоцитов (4×10^7 клеток/мл) инкубировали 30 мин в ледяной бане с 0,05 мл сыворотки против глобулинов мыши, разведенной 1:20 (титр антисыворотки 1:40 000) и отмывали в ЧСА-3ФР.

Для удаления фагоцитов из клеточной суспензии осуществляли инкубацию спленоцитов с карбонильным железом (10 мг/мл) при 37 °С в среде следующего состава: 50 % забуференного ФР, 47 % 199 среды, 3 % сыворотки крупного рогатого скота. В предварительных опытах было установлено, что такой состав инкубационной смеси позволяет очищать суспензию от фагоцитов без увеличения процента мертвых клеток. Частицы железа и захватившие их фагоциты удаляли с помощью сильного магнита. Для контроля эффективности удаления фагоцитов клетки окрашивали акридином оранжевым по методу, описанному ранее [6].

Для обнаружения АСК к 0,5 мл клеточной суспензии ($2-6 \times 10^7$ клеток/мл) добавляли 0,05 мл суспензии бактерий *E. coli* (6×10^8 клеток/мл), окрашенных как описано выше, инкубировали 45 мин при 37 °С, охлаждали в ледяной бане и добавляли 0,02—0,1 мл окрашенного ФИТЦ стафилококка (4×10^{10} клеток/мл) в 1 % растворе азиды натрия. Смесь инкубировали 1 ч, лейкоциты осаждали центрифугированием 10 мин при 1000 оборотов/мин) и помещали в ледяную баню. Через 1—2 ч надосадочную жидкость со свободными клетками стафилококка удаляли, лимфоциты суспендировали в ЧСА-3ФР и помещали в камеру Горяева для подсчета количества АСК (в люминесцентном микроскопе) и общего количества клеток. Обычно просматривали 60 000—120 000 клеток, обнаруживая при этом 20—50 АСК среди спленоцитов и 5—15 АСК среди клеток костного мозга или лимфоузлов.

Результаты исследований и их обсуждение

Поскольку неспецифическое связывание антигена фагоцитами или поврежденными лимфоцитами может привести к значительной ошибке при определении частоты АСК, прежде всего были проведены исследования эффективности идентификации фагоцитов и способности мертвых клеток адсорбировать исследуемый антиген. Обычно для идентификации фагоцитов при исследовании АСК лейкоциты инкубируют с частицами латекса, и клетки, захватившие эти частицы, относят к фагоцитам [9]. Иногда фагоциты в смешанной популяции лейкоцитов определяют по их способности поглощать клетки дрожжей [8]. В настоящей работе для этих целей мы использовали бактериальные клетки *E. coli* штамм R17, окрашенные карболовым фуксином, а затем танизированные. Следует особо подчеркнуть необходимость обработки окрашенных бактерий таниновой кислотой. Необработанные бактерии в жидкой среде быстро обесцвечиваются и становятся непригодными для работы. Кроме того, краситель выходит в среду и гасит люминесценцию окрашенного ФИТЦ антигена. Окрашенные танизированные бактерии хранятся при 4 °С в течение 1—1,5 года без видимых изменений, их легко обнаружить на адсорбированных (или фагоцитировавших) их лейкоцитах (рис. 1).

Клетки, адсорбировавшие и стафилококк и кишечную палочку, идентифицировали как фагоциты, способные неспецифически захватывать корпускулярные антигены. Лимфоидные клетки, адсорбировавшие только стафилококк, идентифицировали как АСК, несущие рецепторы к данному антигену (рис. 2).

Об эффективности применяемого метода идентификации фагоцитов и АСК свидетельствуют следующие данные. Суспензию спленоцитов инкубировали с карбонильным железом, как описано выше, а затем удаляли фагоциты при помощи сильного магнита. Установлено, что удаление способных к фагоцитозу клеток не приводит к уменьшению частоты АСК. Наоборот, процент АСК в результате удаления фагоцитов увеличивается (табл. 1). Следовательно, применяемый метод позволяет четко различать неспецифически захватывающие антиген фагоцитирующие клетки и АСК.

Таблица 1
Влияние удаления фагоцитирующих и мертвых клеток на частоту АСК в суспензии спленоцитов

Лимфоидная суспензия	Количество АСК	Общее количество клеток	% АСК
Контрольная суспензия спленоцитов	58	128 300	0,045
Спленоциты, очищенные от фагоцитов	55	86 200	0,064
Суспензия с 14 % мертвых клеток	59	117 500	0,050
Суспензия с 1 % мертвых клеток	49	96 000	0,051

Для исследования способности мертвых клеток неспецифически связывать корпускулярный антиген стафилококка, суспензию спленоцитов, содержащую высокий процент мертвых клеток (до 14 %) очищали в градиенте плотности фикал-верографин и сравнивали частоту АСК в исходной и очищенной суспензиях. Оказалось, что уменьшение количества мертвых клеток (до 1 %) не приводит к уменьшению частоты АСК в клеточной суспензии (табл. 1). Следовательно, мертвые клетки не адсорбируют неспецифически корпускулярный антиген стафилококка и не выявляются как АСК в настоящих

экспериментах. Таким образом, неспецифические АСК, не связанные с антигеном, не приводят к появлению корпускулярного антигена также на лимфоидных клетках ФИТЦ-специфических лейкоцитов, что может привести к существованию неспецифических АСК.



Рис. 1. Спленоциты.

Рис. 2. Лимфоидная суспензия.

Для проверки влияния суспензии спленоцитов на частоту АСК (для блокирования рецепторов альбумина) добавляли 6—300 мкг/мл С другой стороны, при добавлении кокком (концентрация 0,01 %) окрашенного) практически не выявлялось окрашенных стафилококков ФИТЦ неспецифически связывающих антигена стафилококка.

Влияние ЧСА-ФИТЦ на частоту АСК

Условия опыта	Частота АСК
Контроль	0,045
Добавление 100 мкг/мл ЧСА-ФИТЦ	0,064
Добавление 10-кратной концентрации неокрашенного стафилококка	0,050

Для максимального связывания во всех описанных случаях при 0 °С в присутствии большого количества антигена не наблюдалось целесообразным связывание лимфоцитов с антигеном.

экспериментах. Таким образом, применяемый метод позволяет обнаруживать только специфичные АСК, несущие рецепторы к корпускулярному антигену стафилококка.

Следует однако отметить, что окраска стафилококка изотиоционатом флуоресцеина приводит к появлению новых антигенных детерминант, в результате чего окрашенный корпускулярный антиген стафилококка должен приобрести способность адсорбироваться также на лимфоидных клетках с рецепторами к ФИТЦ. В этом случае, если процент ФИТЦ-специфичных лимфоцитов окажется значительным, окраска антигена ФИТЦ может привести к существенным ошибкам в определении количества стафилококкспецифичных АСК.



Рис. 1. Спленоциты, связавшие окрашенные бактерии *E. coli* в проходящем свете.
Ув. 1100.

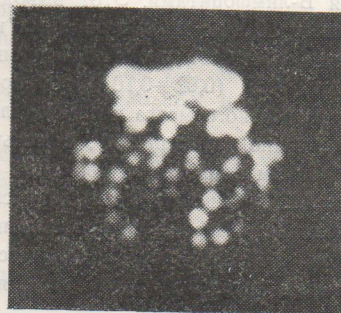


Рис. 2. Лимфоидная клетка, адсорбировавшая окрашенный ФИТЦ стафилококк при люминесцентном освещении сверху в темном поле.
Ув. 300.

Для проверки влияния окрашивания исследуемого антигена на образование АСК к суспензии спленоцитов перед инкубацией со стафилококком добавляли различные количества (для блокирования рецепторов к ФИТЦ) окрашенного ФИТЦ человеческого сывороточного альбумина (ЧСА-ФИТЦ) и определяли частоту АСК. Установлено, что присутствие 6—300 мкг/мл ЧСА-ФИТЦ не снижает частоты обнаруживаемых АСК (табл. 3). С другой стороны, предварительная инкубация лимфоцитов с неокрашенным стафилококком (концентрация неокрашенного стафилококка в 10 раз превышала концентрацию окрашенного) практически полностью подавляет способность лимфоидных клеток адсорбировать окрашенный ФИТЦ стафилококк (табл. 2). Следовательно, окрашивание стафилококка ФИТЦ не оказывает существенного влияния на связывание корпускулярного антигена стафилококка специфичными АСК.

Таблица 2
Влияние ЧСА-ФИТЦ и избытка неокрашенного стафилококка на связывание окрашенного ФИТЦ стафилококка лимфоцитами мышей

Условия обнаружения АСК	Количество АСК	Общее количество клеток	% АСК
Контроль	26	63 900	0,041
Добавление 100 мкг/мл ЧСА-ФИТЦ	45	111 620	0,040
Добавление 10-кратной концентрации неокрашенного стафилококка	1	81 600	0,001

Для максимального подавления неспецифического связывания антигена фагоцитами во всех описанных выше опытах лимфоидные клетки инкубировали с антигеном при 0 °С в присутствии азиды натрия. В связи с тем, что низкая температура и метаболические яды могут препятствовать связыванию антигена Т-клетками [7], представлялось целесообразным сравнить частоту АСК, обнаруживаемых в результате инкубации лимфоцитов с антигеном при 0 и 37 °С, в присутствии и отсутствии азиды натрия. Ока-

залось, что отсутствие азид натрия и повышение температуры инкубации до 37 °C не увеличивает частоты обнаруживаемых АСК. Эти данные свидетельствуют о том, что либо Т-лимфоциты одинаково хорошо связывают корпускулярный антиген стафилококка в обоих случаях, либо они не связывают исследуемый антиген вообще (по крайней мере при описанных условиях).

Поскольку в результате обработки лимфоцитов антииммуноглобулиновой сывороткой лимфоциты, выделенные из селезенки и лимфатических узлов, полностью теряют способность связывать стафилококк (независимо от температуры и наличия азид натрия), был сделан вывод, что все обнаруживаемые в настоящей работе АСК являются В-лимфоцитами. Этот вывод подтверждает также тот факт, что среди просмотренных 80 100 тимоцитов нами не обнаружено ни одной АСК. Другие лимфоидные органы содержат различный процент стафилококк-специфичных АСК. Максимальная частота АСК (0,02—0,10 %) обнаруживается в селезенке. Среди лимфоцитов, выделенных из костного мозга и лимфоузлов, частота АСК была всегда ниже (0,005—0,020 %), что связано, по-видимому, с меньшим содержанием в этих органах зрелых В-клеток.

Таким образом, лимфоидные органы мышей линии СВА содержат различный процент АСК, специфичных к корпускулярному антигену стафилококка. Связывание стафилококка лимфоидными клетками не зависит от температуры и присутствия азид натрия, но полностью подавляется антииммуноглобулиновой сывороткой. Обнаруживаемые в настоящей работе АСК являются В-лимфоцитами.

Список литературы

1. Брондз Б. Д., Рохлин О. В. Молекулярные и клеточные основы иммунологического распознавания.— М.: Наука, 1978.— 335 с.
2. Ada G. L. Antigen binding cells in tolerance and immunity.— Transplant. Rev., 1970, 5, p. 105—129.
3. Forni L. Reagents for immunofluorescence and their use for studying lymphoid cell products.— In: Immunological Methods. New York: Akad. press, 1978, p. 151—168.
4. Ghetie V., Nilsson K., Sjoquist J. Identification of cell surface immunoglobulin marker by protein A containing fluorescent staphylococci.— Scand. J. Immunol., 1974, 3, p. 397—403.
5. Hammerling G. J., McDevitt H. O. Antigen binding T and B lymphocytes. 1. Differences in cellular specificity and influence of metabolic activity on interaction of antigen with T and B cells.— J. Immunol., 1974, 112, N 5, p. 1726—1733.
6. Hertel-Wulff B. An *in vitro* assay for the quantification of phagocytic cells of different anatomic origin.— Acta path. microbiol. scand., Sect. C, 1977, 85, p. 253—259.
7. Kennedy L. J., Dorf M. E., Unanue E. R., Benacerraf B. Binding of poly(Glu⁶⁰Ala³⁰Tyr¹⁰)ny thymic lymphocytes from genetic responder and non-responder mice: effect of antihistocompatibility serum.— J. Immunol., 1975, 114, p. 1670—1675.
8. Patterson-Delafield J., Lehrer R. I. A simple microscopic method for identifying and quantitating phagocytic cells *in vitro*.— J. Immunol. Meth., 1977, 18, p. 377—379.
9. Raff M. C., Feldman M., De Petris S. Monospecificity of bone marrow-derived lymphocytes.— J. Exp. Med., 1973, 137, N 4, p. 1024—1030.
10. Warner N. L. Membrane immunoglobulins and antigen receptors on B and T lymphocytes.— Adv. Immunol., 1974, 19, p. 67—216.

Кафедра микробиологии и иммунологии
Киевского университета

Поступила в редакцию
14.V 1980 г.

УДК 612.127—008.9—097.3—085.273.53

Р. И. Янций

ОБ УЧАСТИИ ГИСТАМИНА В РАЗВИТИИ АКТИВИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ НА МЫШЕЧНЫЕ ВОЛОКНА ПРЕДСЕРДИЙ МОРСКОЙ СВИНКИ

В исследованиях, проведенных в отделе иммунологии и цитотоксических сывороток, направленных на выяснение механизма действия антител (в частности, антикардиальных), было показано их влияние на электрическую и сократительную активность миокардиальных клеток и установлена фазность в развитии функциональных измене-

ний, зависящая от первоначально стимула. Сменялся потенциалности. Применение тальные данные при комплекса антиген система медленных частоты электрической активности и прироста

Однако остается с прямым действием вызываются гистаминового комплекса антителенных Na-Ca каналов исследования.

Мы изучали в активности предсердия из тучных клеток

Опыты проводились с использованием внутриклеточного действия (ПД) с одностороннего специфического гамма-глобулина титела после стандарта в разведении 1:8. Концентрация гамма-ка/мл. В контрольной крови неиммунной пороговой. Избирательные клетки осуществляли или длительной депрессии выхода гистамина — к фузионным растворам насыщения газовой

Прежде чем протрической и сократительной его эффективности в омывающем растворе при отсутствии представленных на респонсы ионов калия и соединительная деполяризация трические ответы (ПД) туда, исчезает плато. Ответы, которые ген — антитело выделенных кальциевых каналов действительно, при действии уже к 3—5 мин наблюдений. Сам же либ на электрическую и через гистамин. Изве става высвобождает ких секунд [5].