6. *Захарова О. И.* Система гипофиз — кора надпочечников матери и плода при беременности и родах // Акушерство и гинекология.— 1986.— № 1.— С. 6—10.
7. *Иванов И. И., Радзинский В. Е., Федорова М. В., и др.* Плацента и ее роль при беременности // М. : Медицина.— 1986.— № 2.— С. 78—79.
8. *Лакин Г. Ф.* Биометрия.— М. : Высш. шк.— 1968.— 287 с.
9. *Мануилова И. А., Баграмян Э. Р.* Эндокринология беременности. Обзор литературы // Вопр. охраны материнства и детства.— 1972.— № 11.— С. 38—42.
10. *Положенкова Л. А., Шехтман М. М.* Гормональные изменения во время беременности // Сов. медицина.— 1983.— № 11.— С. 43—48.
11. *Фанченко Н. Д., Баграмян Э. Р., Плешакова Т. В. и др.* Содержание белковых гормонов плаценты в крови при физиологической беременности // Акушерство и гинекология.— 1986.— № 6.— С. 72—75.
12. *Bach J. E., Dardenne M., Bach M. A.* Demonstration of a circulation timic hormone in mouse and man // Transplant. Proc.— 1973.— N 1.— P. 99—104.

Киев. науч.-исслед. ин-т онкологии
М-ва здравоохранения Украины

Материал поступил
в редакцию 10.04.92

УДК 612.017.3

І. А. Безвершенко, М. Г. Бойко, Л. Д. Калюжная

Визначення антигенних детермінант, притаманних Т-лімфоцитам, у сироватці крові хворих на атопічний дерматит

Исследовали еуглобулиновую фракцию сыворотки пациентов с атопическим дерматитом, используя моноклональные антитела OKT3, OKT8, OKT10 в системе, включающей вторичные антитела, меченные ^{125}I, против иммуноглобулинов мыши. Обнаружено, что Т-клеточные маркерные антигены CD3, CD8 и CD38, слущившиеся с поверхности Т-клеток, могут быть определены в эуглобулиновой фракции сывороточных белков. Пациенты с атопическим дерматитом, успешно леченые иммуномодулятором вилозеном, были отобраны, и исследована их сыворотка, полученная до и после лечения. Лечение обусловливало увеличение количества детерминант CD3 и CD8 и уменьшение количества антигенных детерминант, определяемых с помощью моноклональных антител OKT10 (CD38). Предполагается, что увеличение количества детерминант CD3 и CD8 обусловлено стимуляцией пролиферации и супрессорной функции Т-лимфоцитов вилозеном. Поскольку маркер CD38 представлен на поверхности незрелых и активированных Т-клеток, которые не встречаются в циркулирующей крови, предполагается, что снижение экспрессии маркера CD38 в эуглобулиновой фракции сывороточных белков отражает их слущивание с поверхности Т-клеток тимуса и периферических лимфоидных органов.

Вступ

Популяції Т-лімфоцитів, які виконують рецепторні або ефекторні функції, мають характерну сукупність рецепторів і маркерних антигенів [4, 7, 8]. Формування цієї сукупності, яка характеризує фенотип клітини, відбувається під час антигеннезалежного диференціювання і пов'язане з надбанням одних і втратою інших антигенів та рецепторів. Поверхневі структури Т-лімфоцитів можуть відокремлюватися від поверхні клітин і виявлятися у сироватці. Деякі функції Т-лімфоцитів здійснюються відокремлюваними від них рецепторними структурами. Наприклад, рецептор для Fc-фрагменту IgE уповільнює продукцію В-клітинами антитіл цього класу in vitro [9]. Цілком природньо припустити, що у

© І. А. БЕЗВЕРШЕНКО, М. Г. БОЙКО, Л. Д. КАЛЮЖНАЯ, 1993

складі відокремлюваних від Т-клітин рецепторних структур можуть бути антигени, притаманні тим чи іншим популяціям Т-лімфоцитів. Зокрема, вважають, що антигени Т-лімфоцитів, які реагують з моноклональними антитілами ОКТ3, ОКТ4, ОКТ8, та їх сполучення, є ознакою окремих популяцій клітин цього класу. Згідно з номенклатурою Всесвітньої Організації охорони здоров'я, хелпери/індюсери (що їх визначають за допомогою антитіл ОКТ4) мають маркер CD4; цитотоксичні клітини/супресорні клітини (що їх визначають за допомогою ОКТ8) мають маркер CD8 [7, 8].

У пацієнтів з різною патологією за допомогою моноклональних антитіл досліджують переважно клітини периферійної крові, які складають лише невелику частину лімфоцитів організму і беруть участь у імунологічних та імунопатологічних процесах. Оскільки рецепторні структури можуть відокремлюватися не лише від клітин периферійної крові, але і від клітин тимусу, лімфатичних вузлів і селезінки, визначення маркерних антигенів Т-лімфоцитів у сироватці може дати додаткову інформацію про резерв клітин, чутливих до лімфоцитотропних агентів, наприклад, стероїдів, або гормонів тимусу. Під таким кутом зору найбільш цікавим є визначення таких маркерних антигенів, які не трапляються на лімфоцитах периферійної крові. Ймовірно, таким антигеном є антиген, який визначається антитілами ОКТ10 (CD38) і трапляється лише на поверхні активованих мітогенами Т-лімфоцитів, переважна більшість яких є у тимусі молодих ссавців [7, 8].

В цій статті викладено результати нашої роботи по визначенню маркерних антигенів у сироватці хворих на атопічний дерматит перед і після лікування вілозеном — лімфоцитотропним чинником, який стимулює проліферацію тимоцитів і активність Т-супресорів [3, 6]. У цю групу хворих увійшли лише ті пацієнти, які мали яскравий терапевтичний ефект від лікування вілозеном. Ми виходили з припущення, що маркерні антигени, які визначаються моноклональними антитілами ОКТ3, ОКТ4 і ОКТ10 можуть входити до складу комплексів з іншими маркерами клітинної поверхні, наприклад, 5′-нуклеотидазою, яку було знайдено у еуглобуліновій фракції сироваткових білків [1]. Тому досліджували саме цю фракцію.

Методика

Визначали антигенні детермінанти CD8, CD3, CD38 у еуглобуліновій фракції сироваткових білків за допомогою таких антитіл: ОКТ3, ОКТ8, ОКТ10. Сироватку одержували від хворих до і після лікування вілозеном, заморожували і зберігали за умов —20 °С. Сироватку всіх хворих досліджували одночасно, визначали її об'єм, а результат дослідження перераховували на 1,0 мл. Діалізували сироватку проти великого об'єму дистильованої води за умов +4 °С. Еуглобуліни відокремлювали центрифугуванням і промивали охолодженою дистильованою водою. Після центрифугування (10 хв., 2000 об/хв) осад еуглобулінів розчиняли в 1 мл фосфатного буфера (0,14 моль/л; pH 7,2). З кожної проби відмірювали 0,1 мл розчину еуглобулінів і додавали 0,02 мл стандартного розчину моноклональних антитіл ОКТ3, ОКТ8, ОКТ10 фірми ORTHO (США). Раніше було з'ясовано, що 0,02 мл антитіл становить надмірок моноклональних антитіл стосовно до 10 % (0,05 мл) еуглобулінів сироватки. За контроль правили проби без моноклональних антитіл, замість них у пробу додавали 0,02 мл розчину NaCl (0,14 моль/л), виготовленого на фосфатному буфері (0,01 моль/л; pH 7,2). Далі проби (дослідні і контрольні) переносили у посуд з подрібненими крижаними уламками на 30 хв, перемішували, після чого інкубували у холодильнику за умов 4 °С до ранку, потім до проб додавали по 5 мл холодної дистильованої води (pH 7,2), осад, який випадав, розчиняли в мінімальному об'ємі NaCl (0,14 моль/л) и додавали 0,05 мл розчину мічених ^{125}I антитіл проти IgG миші фірми Amersham (Англія). Стандартний розчин розводили таким чином, щоб внесена в

кожну пробу активність ^{125}I складала 10^3 Бк (великий надмірок по відношенню до моноклональних антитіл, які фіксуються на еуглобулінах). Далі проби витримували в холодильнику за умов +4 °С на протязі 1 год і осаджували еуглобулінову фракцію холодною дистильованою водою (pH 7,2). Разом з еуглобуліновою фракцією випадав комплекс, який складався з еуглобулінів, моноклональних антитіл і вторинних ^{125}I-антитіл. Надосадову рідину відкидали. Осад відмивали охолодженою дистильованою водою від мічених антитіл, що не зв'язалися, знову розчиняли в 1 мл NaCl (0,14 моль/л). Радіоактивність в пробах визначали на лічильнику Гаммакорд (Швеція) на протязі 1 хв.

Мононуклеарні клітини видаляли з гепаринізованої крові за стандартною методикою: кров розводили фосфатним буфером (pH 7,2) у співвідношенні 1 : 3 і фракціонували центрифугуванням до 300 g в градієнті щільності: «фікол — гіпак» за умов комнатної температури. Мононуклеарні лімфоцити, які складають інтерфазне кільце тричі відмивали у фосфатному буфері і ресуспендували в ньому за умов концентрації 10^7 кл/мл. Розносили по 100 мкл клітинної суспензії у пробірки (крім контрольних, куди додавали 10 мкл фосфатного буфера), в які додавали по 10 мкл моноклональних антитіл ОКТ3, ОКТ4, ОКТ8. Вміст пробірок перемішували, обережно струшували і інкубували в крижаній воді 15—30 хв, струшуючи 2—3 рази. В кожну пробірку додавали по 20 мл фосфатного буфера (0,1 моль/л; pH 7,2), центрифугували за умов 300 g, 10 хв і 2—8 °С, відмивали таким чином від антитіл, що не зв'язалися. Надосадову рідину відсмоктували пастерівською піпеткою, лишаючи близько 100 мкл разом з осадом у кожній пробірці, і струшували, щоб одержати рівномірну суспензію. Наносили 10—20 мкл на скло, накривали покривним склом, герметизували лаком, зберігали перед дослідженням за умов 2—8 °С. Оцінку зв'язування провадили за допомогою флюоресцентного мікроскопа Dialux (ФРН). Відсоткове співвідношення субкласів Т-клітин визначали на базі підрахування 200—300 клітин у препараті.

Визначення IgE-антитіл у сироватці виконували за допомогою стандартного радіоімуносорбентного теста (фірма Pharmacia Diagnostic, Швеція), який грунтується на специфічному витіснюванні антитіл проти важких ланцюгів IgE, мічених ^{125}I, IgE-глобулінами, які містяться у досліджуваній сироватці, з паперового сорбенту, на якому ковалентно фіксовані IgE-імуноглобуліни людини. Мірою вмісту IgE-антитіл у досліджуваній сироватці є зменшення числа імпульсів радіоактивної мітки анти-IgE, адсорбованої на імуносорбенті у присутності досліджуваної сироватки. Для дослідження використовували стандартні набори Phadodas IgE Prist (фірма Pharmacia Diagnostic, Швеція), кількість IgE-антитіл визначали у міжнародних одиницях на мілілітр сироватки, або у кілоодиницях на літр (МО/мл або кМО/л).

Результати та їх обговорення

У хворих на атопічний дерматит концентрація IgE-антитіл в сироватці коливалася у межах 7,7—3526 кМО/л. В середньому вона складала 488,4 кМО/л±53,63 кМО/л. В контрольній групі (практично здорові донори) вона складала лише 17,3 кМО/л±5,6 кМО/л. Збільшення концентрації IgE-антитіл у 1,5—3 рази порівняно з її значенням у людей контрольної групи спостерігалося лише у 30 хворих з 109 досліджуваних, у решти хворих вона була підвищена більше, як у 5 разів, а у 40 з них вона мала значення в 20 разів вище ніж у здорових осіб і лише у 6 перевищувала норму у 100—200 разів. Спостерігалася залежність глибини враження від клінічної форми і вмісту IgE-антитіл у сироватці. Так концентрація IgE-антитіл у хворих з тяжкими загостреннями і ліхеноїдною формою була вдвічі більша, ніж у хворих з еритемно-сквамозною формою. При поширеному дифузному процесі концентрація IgE-антитіл була у 4 рази вищою, ніж у хворих з обмеженими клінічними проявами нейродерміту.

Зміни популяційного складу Т-лімфоцитів периферійної крові були менш виразними. У хворих на атопічний дерматит було знайдено 46,7 %±0,72 % клітин, які реагують з антитілами ОКТ3 ($CD3^+$-клітини), 30,5 %±1,98 % мали на поверхні детермінанти, які визначаються антитілами ОКТ4 ($CD4^+$-клітини), і 27,5 %±0,5 % мали детермінанти, які визначаються за допомогою антитіл ОКТ8 ($CD8^+$-клітини). Дослідження абсолютної кількості показує, що у хворих на атопічний дерматит помітно зменшена кількість $CD3^+$-клітин, яка склала 851,75 кл/мкл±86,7 кл/мкл (у контрольній групі 1572,5 кл/мкл± ±111,5 кл/мкл; $P<0,01$). Так само знайдено зменшену кількість клітин $CD4^+$ (хелперних) — 529,1 кл/мкл±55,45 кл/мкл у групі хворих (у контрольній групі — 980,2 кл/мкл±75,2 кл/мкл; $P<0,05$). Кількість клітин, супресорів цитотоксичного фенотипу — $CD8^+$, була зменшена в 1,4 рази, але різниця була статистично неістотна. Не виявлено залежності популяційного складу лімфоцитів від клінічної форми і глибини враження хворих.

В результаті лікування хворих імуномодулятором (вілозеном), який стимулює проліферативну активність Т-лімфоцитів та їх супресорну функцію, спостерігалися істотні зміни згаданих вище показників. Зокрема, під впливом лікування вилозеном помітно зменшувалася концентрація IgE-антитіл (схему лікування опубліковано раніше [5]). В середньому концентрація IgE-антитіл зменшувалася до 297,48 кМО/л±59,02 кМО/л, зменшування складає 39,1 % і є статично істотним. Слід зазначити, що зменшення концентрації спостерігалося переважно у хворих з важкими враженнями у стадії загострення, які мали високу початкову концентрацію IgE-антитіл. Саме у таких пацієнтів після лікування спостерігалось значне поліпшення клінічної картини. Під впливом лікування вілозеном спостерігалось деяке збільшення кількості клітин $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, яке втім не було статистично істотним.

В таблиці зведено дані визначення антигенних детермінант CD3, CD8 і антигенних детермінант, які зв'язують антитіла ОКТ10, в сиро-

Кількість антигенних детермінант (число імпульсів радиоактивного випромінювання мічених ^{125}I вторинних антитіл * в 1 мл сироватки крові, підраховане за хвилину), які зв'язують відповідні моноклональні антитіла в еуглобуліновій фракції сироватки крові хворих на атопічний дерматит

Порядковий номер досліду	Антигенна детермінанта					
	у нелікованих вілозеном хворих			у лікованих вілозеном хворих		
	CD3	CD8	CD38	CD3	CD8	CD38
1-й	2331	...	...	1613	...	...
2-й	81	...	1225	328	...	279
3-й	712	...	...	344	...	...
4-й	632	...	...	1686	...	...
5-й	187	...	...	536	...	...
6-й	86	...	...	185	...	...
7-й	372	...	...	1058	...	...
8-й	1066	...	275	1356	...	22
9-й	...	...	4467	...	...	211
10-й	...	...	243	...	...	49
11-й	...	...	109	...	...	32
12-й	...	...	2466	...	...	526
13-й	...	...	1320	...	...	237
14-й	...	...	1051	...	...	170
15-й	73	115	...	123	135	...
16-й	129	54	...	83	104	...
17-й	265	217	...	304	300	...

* Радіоактивність вторинних антитіл, які приєдналися до фіксованих на еуглобулінах моноклональних антитілах ОКТ3, ОКТ8, ОКТ10, подана після віднятя радіоактивності контролю (проб без моноклональних антитіл).

ватці хворих на атопічний нейродерміт перед і після лікування вілозеном. Досліджували сироватку лише у тих хворих, у яких спостерігався чіткий клініничний ефект. З таблиці видно, що у більшості хворих (у 8 з 11 — після лікування кількість антигенних детермінант CD3 у еуглобуліновій фракції сироватки збільшується, але загалом різниця статистично не істотна. Кількість антигенних детермінант CD8 досліджена лише у трьох хворих. В усіх випадках спостерігалось збільшення кількості антигенних детермінант CD8 після лікування. В усіх досліджуваних випадках спостерігалося зменшення вмісту антигенних детермінант, які зв'язують антитіла ОКТ10 у еуглобуліновій фракції білків сироватки. Попри значні розбіжності між окремими варіантами, різниця між вмістом детермінант, які зв'язують ОКТ10-антитіла в еуглобуліновій фракції сироватки перед і після лікування, статистично істотна ($P<0,05$). Згідно з даними номенклатурної комісії Всесвітньої Організації охорони здоров'я, антигени CD38, які зв'язують антитіла ОКТ10, трапляються на поверхні незрілих і активованих Т-клітин (переважно тимоцитів), природних кілерів і плазматичних клітин [8]. Серед клітин периферійної крові трапляється дуже невелика кількість природних кілерів (принаймні набагато менш ніж Т-лімфоцитів), практично не трапляються плазматичні клітини, незрілі і активовані Т-клімфоцити. Переважна більшість клітин, які мають на поверхні антиген CD38, утворюють клітинний склад тимусу, селезінки, лімфатичних вузлів. На цій підставі можна твердити, що антигенні детермінанти, знайдені у складі еуглобулінової фракції сироватки хворих на атопічний нейродерміт походять з клітин тимусу, лімфоїдних вузлів або селезінки. На користь такого твердження говорить знайдення у складі еуглобулінової фракції сироватки 5-нуклеотидази, яка переважно походить з поверхневих структур [1]. Визначення у складі еуглобулінової фракції антигенних детермінант CD3, можливо, віддзеркалюють злущування структур з поверхні клітин або руйнування Т-лімфоцитів. Так само, збільшення у складі еуглобулінової фракції антигенів CD8 під впливом лікування може віддзеркалювати збільшення Т-супресорів і прискорення злущування з поверхні Т-супресорів структур, які регулюють продукцію антитіл, в тому числі класу IgE [9]. Оскільки збільшення кількості Т-супресорів не було статистично істотним, можна припустити прискорення злущування супресорних структур або збільшення лише окремих субпопуляцій Т-супресорів. Хоч кількість Т-лімфоцитів периферійної крові, які несуть на поверхні антигени CD3, збільшувалась статистично істотно, збільшення антигенних детермінант CD3 еуглобулінової фракції траплялось не у всіх досліджуваних випадках, а лише у більшості (у 8 з 11). Це відповідає відомостям про механізм дії вілозену, у складі якого є мітоген, який стимулює проліферацію Т-клітин. З іншого боку, істотне зменшення концентрації IgE-антитіл під впливом лікування змушує думати про стимуляцію супресорної функції відповідних Т-лімфоцитів і про те, що збільшення антигенних детермінант CD8 у складі еуглобулінової фракції сироватки точніше віддзеркалює стан Т-супресорів у хворих. Найбільш сталим і найбільш цікавим є зменшення вмісту антигенних детермінант CD38 в результаті лікування вілозеном. Виходячи з властивостей препарату, можна припустити, що зменшення CD38 детермінант зумовлене прискоренням диференціювання незрілих Т-клітин у тимусі або в інших лімфоїдних органах. У складі вілозену міститься олігопептидний чинник, який прискорює диференціювання Т-лімфоцитів [2]. Встановлено, що цей чинник сприяє відокремленню певних структур з поверхні тимоцитів, зокрема, під його впливом від поверхні тимоцитів відокремлюються рецептори для аутологічних еритроцитів. Ці рецептори, ймовірно, об'єднані в одному блоці з одним з рецепторів до Fc-фрагмента IgG [7]. Можливо, що під впливом цього чинника зростає злущування структур, які містять детермінанти CD3, які зв'язують антитіла ОКТ3, і відбувається зменшення кількості клітин тимусу незрілого фенотипу, які мають на поверхні детермінанти, які зв'язують антитіла ОКТ10, що веде відповідно до

зменшення злущування цих детермінант з поверхні тимоцитів і зменшення їх у еуглобуліновій фракції сироваткових білків.

Викладене дає можливість зробити такі висновки. У еуглобуліновій фракції сироваткових білків хворих на атопічний дерматит містяться антигенні детермінанти, які зв'язують антитіла ОКТ3, ОКТ8, ОКТ10. Кількість детермінант, які визначаються антитілами ОКТ3 і ОКТ8 у еуглобуліновій фракції сироваткових білків збільшується в результаті лікування імуномодулятором (вілозеном), кількість детермінант, які визначаються антитілами ОКТ10, за тих же умов зменшується.

I. A. Bezvershenko, M. G. Boyko, L. D. Kalyuzhnaya

THE DETERMINATION OF T-LYMPHOCYTE INTRINSIC MARKER ANTIGENS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

The euglobulin fraction of serum of the patients with atopic dermatitis was studied using monoclonal antibodies OKT3, OKT8 and OKT10 in assay system including secondary ^{125}J labeled anti-mouse IgG antibodies. It was shown that CD3, CD8 and CD38 T-cell marker antigens shedded from the T-cell surface could be found in euglobulin fraction of serum patients. The patients with atopic dermatitis successfully treated with immunomodulator vilosen were selected and their serums obtained before and after treatment were investigated. The treatment resulted in the increase of CD8, CD3 determinats and a decrease of antigens determined by OKT10 antibodies (CD38). It is supposed that an increase of CD3 and CD8 determinants is caused by stimulation of T-lymphocyte prolifiration and suppressor cell function by vilosen. Since CD38 marker is predominantly on the surface of immature and activated T-cells, which do not occur in circulating blood, it can be supposed that decrease of CD38 in the euglobulin fraction of serum reflects a shedding of these determinants from T-cells of thymus and peripheral lymphoid organs.

Research Institute of Endocrinology and Metabolism
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Безвершенко И. А., Сидоренко Д. С., Тарасова А. А.* Распределение 5′-нуклеотидазы в сыворотке при гиперкортицизме // Республикан. межвед. сб. «Эндокринология».— 1987.— Вып. 17.— С. 90—93.
2. *Безвершенко И. А., Синельникова А. Л., Быкова Л. М., Бойко М. Г.* Отделение рецепторов тимоцитов мыши к аутологичным эритроцитам под влиянием олигопептидного фактора тимуса // Иммунология.— 1988.— **6**.— С. 26—28.
3. *Безвершенко И. А., Гойдаш М. М., Премыслов В. Х.* Катаболизм адениловой кислоты в тимоцитах регенерирующей вилочковой железы мыши // Укр. биохим. журн.— 1989.— **1**.— С. 52—57.
4. *Брондз Б. Д.* Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании // М. : Наука, 1987.— С. 471.
5. *Калюжная Л. Д., Стычинская Л. П., Бойко М. Г. и др.* Опыт лечения вилозеном атопического дерматита у детей // Врачеб. дело.— 1989.— **1**.— С. 90—92.
6. *Bezvershenko I. A., Gulling E. V., Dugovskaya L. A.* The suppression of IgE-antibody production by non-polypeptide thymic factor // Immunology.— 1979.— **36**, N 2.— P. 229—234.
7. *Blann A. D.* T-lymphocyte surface : structure and function // Med. Lab. Sci.— 1987.— **44**.— P. 220—236.
8. *Bray R. A., Landay A. L.* Identification and functional characterization of mononuclear cells by flow cytometry // Arch. Pathol. and lab. Med.— 1989.— **113**, N 6.— P. 579—590.
9. *Ishizaka K.* Twenty years with IgE : from the identification IgE to regulatory factor for the IgE responses // J. Immunol. — 1985.— **135**, N 1.— P. 1—10.

Укр. наук.-дослід. ін-т ендокринології
та обміну речовин М-ва охорони здоров'я
України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 05.06.92