

Неспецифічний імуносупресорний фактор селезінки, що індукується у мишей імунізацією бактеріями

*Изучали влияние экстрактов селезенки мышей, иммунизированных бактериальной вакциной (*S. sonnei*), на иммунный ответ у мышей. Экстракты получали в виде супернатантов гомогенизированной в изотоническом растворе ткани селезенки. Установлено, что экстракты подавляют гуморальный иммунный ответ на эритроциты барана и кролика, а также гиперчувствительность замедленного типа к спленоцитам морской свинки. Они не влияют на продукцию антител к липополисахариду кишечных палочек. Иммуносупрессивная активность экстрактов утрачивается после их обработки сорбентом из антител к иммуноглобулинам мыши и сохраняется при обработке сорбентом из антител к θ -антигену. Сделано заключение о наличии в экстрактах селезенки иммунизированных мышей антигеннеспецифического фактора, который ингибирует Т-клеточное звено иммунной системы и имеет иммуноглобулиновую природу.*

Вступ

Відомо, що імунізація мишей еритроцитами барана (ЕБ) супроводжується появою в їх селезінці специфічного супресорного фактору, який може бути виявлений в екстракті тканин цього органу [6]. Цей фактор відносять до медіаторів специфічних Т-або В-супресорів, які обмежують гуморальну імунну відповідь. Результати досліджень, проведених нами раніше, засвідчують, що поряд з появою антигенспецифічного супресорного фактору імунізація мишей ЕБ призводить до формування неспецифічного супресорного фактору [2]. Залишається неясною можливість продукції подібних факторів при імунізації тварин іншими, наприклад, бактерійними, антигенами.

В цій роботі показано, що при імунізації мишей живими бактерійними вакцинами в їх селезінці виявляються імуносупресорні фактори імуноглобулінової природи та антигеннеспецифічної дії.

Методика

Дослідження провадили на мишах СС₅₇W масою 17—19 г. Як антиген — індуктор супресорного фактору селезінки — застосовували вакцини з живих клітин *Shigella sonnei*, штами № 877 А та № 877 В [1]. Для одержання супресорного фактору тварин імунізували внутрішньоочеревинно вакцинами (50 млн мікробних клітин на мишу). Селезінку видаляли в різні строки після імунізації (через 1, 7 або 14 діб), зважували, від селезінки кожної тварини відсікали частку, яка складала близько 1 % маси органу. Пул цих шматочків гомогенізували, одержували ядерні клітини і підраховували їх число на весь пул. Основний залишок селезінки усіх мишей заморожували і гомогенізували розтиранням у ступці, процедуру повторювали п'ять разів. Гомогенат суспендували в ізотонічному розчині NaCl й центрифугували при 10 000 г протягом 30 хв. Одержаний екстракт (супернатант) селезінки розводили, виходячи з результатів підрахування клітин пулу, так, щоб 1 мл його відповідав $2 \cdot 10^5$ спленоцитів. Екстракт селезінки неімунізованих мишей (контрольний) одержували за тією ж методикою.

Вивчали імуносупресивну активність нативних екстрактів селезінки, а також виснажених імуносорбентами. Для виготовлення імуносорбен-

тів використовували кролячу антисироватку до імуноглобулінів миші, вироблену в Інституті епідеміології та мікробіології ім. Гамалей (Москва), а також антисироватку до θ (Thy-1)-антигену, яку одержували від кролів після імунізації їх суспензією сірої речовини головного мозку щура. Сироватку обробляли еритроцитами і клітинами кісткового мозку мишей, далі контролювали її цитотоксичну активність при наявності комплементу щодо клітин тимусу і кісткового мозку мишей [2].

Імуносорбенти готували обробкою антисироваток глютаровим альдегідом. Виснаження екстрактів селезінки імуносорбентами здійснювали у пробірках при співвідношенні екстракту і сорбенту, як 1:3. Процедуру провадили протягом 15 хв трикратно, кожного разу з новою порцією сорбенту. Речовини, що приєдналися до сорбенту, елюювали гліциновим буферним розчином [5]. Елюат також досліджували на імуносупресивну активність. В роботі використовували моделі клітинної і гуморальної (первинної та вторинної) імунної відповіді. Для відтворення первинної гуморальної відповіді мишей імунізували тимусзалежними антигенами — еритроцитами кроля (ЕК) або ЕБ ($5 \cdot 10^8$ клітин), а також тимуснезалежним антигеном — ліпополісахаридом *E. coli* O-124 (ЛПС, 1 мкг). Антигени вводили внутрішньоочеревинно, в цей же день так само вводили 0,5 мл екстракту селезінки. Кров у тварин одержували через 7 діб. Вміст антитіл у сироватці крові визначали за допомогою реакції гемаглютинації та пасивної гемаглютинації [2]. Вторинну гуморальну імунну відповідь викликали аналогічною імунізацією тварин, яких попередньо за 3—4 тижні до дослідження імунізували ЕБ, ЕК ($5 \cdot 10^7$ клітин) або детоксикованим ЛПС (10 мкг). Така імунізація не супроводжується утворенням антитіл, однак вона індукуює формування імунологічної пам'яті. Наявність її контролювали [1]. Як модель клітинної імунної відповіді застосовували гіперчутливість уповільненого типу (ГУТ), яку викликали у мишей підшкірним введенням інактивованих спленоцитів морської свинки (СМС, $5 \cdot 10^7$ клітин). Вирішальне введення СМС в тій же дозі провадили через 6—7 діб в ліву задню ланку. Інтенсивність реакції оцінювали за масою лівого підколінного лімфовузла, яку визначали у відсотках від маси правого інтактного лімфовузла [2, 4].

У кожній експериментальній групі було 10—12 мишей. Результати дослідів обробляли статистичними методами. Титри антитіл виражали як $\log_2 [T/10]$, де T — обернена величина титру антитіл. Обчислювали середні геометричні значення титрів антитіл, середні арифметичні значення маси лімфовузлів (вираженість ГУТ) і стандартні помилки. Відмінність між середніми встановлювали з урахуванням критерію t Стюдента.

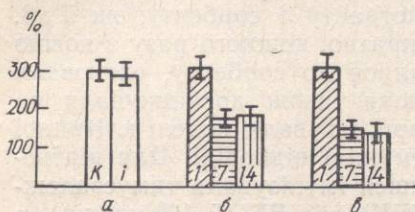
Результати та їх обговорення

У початкових дослідях провадили порівнювання імуносупресивної активності відносно до ГУТ екстрактів селезінки, що були одержані після імунізації мишей вакциною штаму 877 А через 1 добу, 7 та 14 діб (екстракти А1, А7 та А14), а також одержані в ці ж строки із селезінки мишей, імунізованих вакциною із штаму 877 В (екстракти В1, В7 та В14). Результати досліджень показали, що введення тваринам екстрактів А1 й В1 не впливає на ГУТ. У мишей, яким вводили екстракти А7, А14 та В7, В14, ГУТ була нижче, ніж у тварин контрольних груп, яким вводили екстракт неімунізованих мишей або ізотонічний розчин (малюнок). Одержані результати можуть свідчити про те, що об'єкт неспецифічної супресії є Т-клітинна ланка імунної системи. Крім того, ці досліді дозволили в подальших експериментах обмежуватися використанням тільки тих екстрактів селезінки, що були одержані після 14 діб імунізації — екстракти А14, В14.

Результати досліджень, в яких використовували моделі гуморальної імунної відповіді, свідчать, що введення мишам екстрактів А14 та В14 істотно пригнічує продукцію антитіл до ЕБ й ЕК при первинній і

вторинній імунній відповіді (табл. 1). Поряд з цим виявлено, що екстракти не впливають на формування антитіл до ЛПС ні при первинній, ні при вторинній імунній відповіді. Таким чином, супресорний фактор, який міститься в екстрактах селезінки імунізованих бактеріями мишей, спроможний неспецифічно пригнічувати функцію Т-клітинної ланки імунної системи. Вплив фактора на В-клітинну ланку не виявлений: імунна відповідь на тимуснезалежний антиген зберігається.

У подальшому було знайдено, що виснаження екстрактів А 14 та В14 імуносорбентом із анти- θ -сироватки не призводить до зниження їх



Вплив різних екстрактів селезінки мишей на імуносупресивну активність (відносно до гіперчутливості уповільненого типу — ГУТ — до спленоцитів морської свинки): а — вихідне значення ГУТ (к — контроль) та значення ГУТ на фоні введення екстрактів селезінки інтактних мишей (і); б і в — значення ГУТ при введенні екстрактів селезінки мишей, імунізованих штамми 877 А та 877 В відповідно (1, 7, 14 —

добі одержання селезінки та екстрактів після вакцинації мишей). Вертикальні від-
різки — довірчі інтервали середніх значень показників при $P < 0,05$. За віссю орди-
нат — вираженість ГУТ — відносна маса підколінних лімфовузлів, %.

імуносупресивної активності (табл. 2). При обробці екстрактів імуносорбентом із анти-Ig-сироватки одержані інші результати. Обидва екстракти втрачували імуносупресивну активність, але елюати з сорбентів виявляли таку. Результати цих дослідів показують на схожість виявленого імуносупресорного фактора з імуноглобулінами миші.

Порівнюючи результати цієї роботи з даними інших авторів [6], треба відмітити, що введення тваринам антигенів різної природи може

Таблиця 1. Гуморальна імунна відповідь на різні антигени під впливом екстрактів селезінки мишей, імунізованих вакциною з живих клітин *S. sonnei* штамів № 887 А та № 877 В (14 діб після імунізації), $\log_2 [T/10]$

Варіант досліджу	Первинна відповідь	Вторинна відповідь
Еритроцити барана		
Екстракт селезінки не вводили	6,6±0,22	10,3±0,25
Введення екстракту селезінки		
і	6,3±0,21	10,2±0,31
А14	4,6±0,33*	6,9±0,30*
В14	4,1±0,37*	6,4±0,20*
Еритроцити кроля		
Екстракт селезінки не вводили	3,3±0,24	8,1±0,29
Введення екстракту селезінки		
і	3,2±0,25	7,9±0,28
А14	1,3±0,28*	4,7±0,16*
В14	1,5±0,30*	4,5±0,22*
Ліпополісахарид <i>E. coli</i> 0-124		
Екстракт селезінки не вводили	3,6±0,29	6,3±0,30
Введення екстракту селезінки		
і	3,5±0,27	5,9±0,25
А14	3,7±0,23	6,5±0,34
В14	3,9±0,25	6,4±0,21

Примітка. Тут і в табл. 2 зірочкою позначена достовірна ($P < 0,05$) відміна показників від таких контрольних груп тварин, яким екстракти не вводили або вводили екстракт селезінки інтактних мишей (і).

викликати формування в їх селезінці двох імуносупресорних факторів — специфічного та неспецифічного. Можна вважати, що екстракти, які одержані з цілої селезінки мишей в нашій роботі, містять обидва фактори. Очевидно, дія специфічного фактора не виявлялася через дію неспецифічного. Екстракти селезінки, одержані раніше іншими авторами з клітин селезінки, були антигенспецифічними. У цьому випадку неспецифічний фактор мабуть втрачувався при одержанні клітин селезінки.

Таблиця 2. Імуносупресивна активність (відносно до гіперчутливості уповільненого типу — ГУТ¹ до спленоцитів морської свинки) оброблених сорбентами екстрактів селезінки мишей та елюатів із сорбентів ($M \pm m$)

Об'єкт дослідження	Неімунізовані миші	Миші, імунізовані вакциною з живих клітин <i>S. sonnei</i> (14 діб після імунізації)	
		штам № 877 А	штам № 877 В
Екстракт:			
нативний	306±21	158±26*	181±13*
виснажений сорбентом анти-Θ	—	156±22*	153±14*
нативний виснажений сорбентом анти-Ig	376±18	195±15*	185±17*
Елюат:			
сорбенту анти-Θ	—	383±28	378±31
сорбенту анти-Ig	—	300±25	289±26
		172±14*	185±21*

¹ ГУТ — відносна маса лівого підколінного лімфовузла (%) порівняно з інтактним (правим) лімфовузлом.

Таким чином, в результаті досліджень встановлено, що при імунізації мишей бактерійними вакцинами в їх селезінці з'являється антигеннеспецифічний імуносупресорний фактор, який має серологічну схожість з імуноглобулінами.

V. A. Borisov, E. V. Borisova

NONSPECIFIC IMMUNOSUPPRESSIVE SPLEEN FACTOR, INDUCED IN MICE BY THE BACTERIAL IMMUNIZATION

Frozen spleen of mice immunized with vaccine from *S. sonnei* has been homogenized in the isotonic saline solution and centrifuged. That supernatant has been shown to inhibit antibody immune response to thymus-dependent antigens (sheep and rabbit erythrocytes) and hypersensitivity of the delayed type to splenocytes of guinea pig. The supernatant did not inhibit the antibody formation to thymus-independent antigen (bacterial lipopolysaccharide). Immunosuppressive activity of the supernatant disappeared after treatment with antiimmunoglobulin (but not anti-O-antigen) immunosorbent. The spleen of immunized mice is concluded to contain a factor which inhibits T-cell link of the immune system and is of the immunoglobulin nature.

T. G. Shevchenko University, Ministry of Public Education of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Борисов В. А. Особенности формирования антител к гетерологичным антигенам при экспериментальной шигеллезной инфекции у морских свинок и мышей // Микробиол. журн. — 1989. — 51, № 3. — С. 52—56.
2. Борисов В. А. Влияние антигениндуцированного супрессорного фактора селезенки на иммунный ответ к различным антигенам // Там же. — 1990. — 36, № 4. — С. 47—51.
3. Венчиков А. Н., Венчиков В. А. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. — М.: Медицина, 1964. — 152 с.