

3. Струкова С. М., Умарова Б. А., Куреева Е. Г. и др. Сравнение каталитических свойств α - и β/γ форм тромбина // Биохимия.— 1978.— № 4.— С. 708—717.
4. Умарова Б. А., Хлгатын С. В., Струкова С. М. Стимуляция α -тромбином секреции гепарина перитонеальными тучными клетками крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1991.— № 2.— С. 131—133.
5. Шапиро Ф. Б., Умарова Б. А., Дугина Т. Н. и др. Влияние экзогенного гепарина на секреторный статус тучных клеток при иммобилизационном стрессе // Физиол. журн.— 1991.— № 5.— С. 11—16.
6. Bienenstock J., Blennerhessett M., Kakuta Y. Evidence for central and peripheral nervous system interaction with mast cells // Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease/Eds. Galli S., Austen K.— New York: Raven press, 1989.— P. 275—282.
7. Botana L. Adrenergic agonists do not compete with the antagonist (—) 3-[¹²⁵I] iodo-cyanopindolol for binding to rat pleural or peritoneal mast cell adrenergic receptor // Gen. Pharmacol.— 1987.— N 3.— P. 263—267.
8. Orr E. Nervous-system-associated mast cell: gatekeepers of neural and immune interaction // Drug. develop. res.— 1988.— 15.— P. 195—205.

Москов. ун-т им. М. В. Ломоносова
Российской Федерации

Материал поступил
в редакцию 11.12.92

УДК 618.19—008.8

І. І. Слуквін, В. В. Пилипенко, А. А. Фільченков, В. П. Чернишов

Вплив жіночого молозива та його фракцій на функціональну активність В-лімфоцитів

В зависимости от дозы женское молозиво стимулировало пролиферативный ответ мышинных спленоцитов, активированных субоптимальными дозами (в частности 50 мг/мл) липосахариды (ЛПС), введенного в культуральную среду. Помимо стимулирования пролиферации спленоцитов женское молозиво повышало общее содержание иммуноглобулинов в клеточном супернатанте. Стимулирующее влияние женского молозива на синтез иммуноглобулинов спленocyтaми также имело дозозависимый характер и проявлялось, уже начиная с 0,5 %-ной его концентрации в культуральной среде.

В отличие от женского молозива коровье молозиво оказывало супрессивное влияние и на пролиферативный ответ, и на синтез иммуноглобулинов мышинными спленocyтaми. При этом казеин коровьего молозива не подавлял в значительной мере синтез антител. Супрессирующее влияние на синтез иммуноглобулинов проявлялось при внесении в культуральную среду глобулиновой фракции коровьего молозива. Установлено, что усиление общего синтеза иммуноглобулинов спленocyтaми мыши под влиянием женского молозива обусловлено увеличением числа IgG2a-синтезирующих клеток. Получена фракция женского молозива, с которой связан иммуностимулирующий эффект. Молекулярная масса этой фракции составила 70 000—75 000 Д.

Вступ

Відомо, що жіноче молозиво і молоко вміщують ряд факторів, які забезпечують пасивну імунізацію новонародженого [2, 3, 10]. Однак останнім часом з'явилися відомості про те, що материнське молоко активно впливає на розвиток імунної системи дитини. Так, вільний секреторний компонент, лактоферрин, секреторний IgA описані як супресорні фактори жіночого молозива [5, 8, 14]. В той же час, клінічні дані дозволяють припустити наявність у материнському молозиві компонентів, стимулюючих синтез імуноглобулінів.

© І. І. СЛУКВІН, В. В. ПИЛИПЕНКО, А. А. ФІЛЬЧЕНКОВ, В. П. ЧЕРНИШОВ, 1993

Мета нашої роботи — дослідження впливу жіночого молозива та його фракцій на функціональну активність В-лімфоцитів мишачих спленоцитів, винайдення фракції (якщо така є), якій властивий імуно-стимулюючий ефект.

Методика

В експерименті використовували пул секрету молочної залози п'яти здорових породіль (на 2—3-ю добу після пологів). Молозиво попередньо обезжирювали центрифугуванням при 20 000 g протягом 30 хв. Для осаджування казеїну додавали 1 н розчин HCl (pH 4,6). Компоненти сироватки жіночого молозива фракціонували за допомогою гел'єфільтрації під високим тиском на хроматографічній системі HPLC 2150 (фірма «LKB», Швеція) з колонкою Protein Pak 300 SW (фірма «Waters», США), відкаліброваною маркерними білками. За буфер правили розчин NaH_2PO_4 (0,2 моль/л; pH 7,4). Визначення сполук, які містилися у фракціях сироватки молозива, здійснювали на УФ-моніторі при довжині хвилі 280 нм. Аналіз білкових компонентів фракцій провадили із використанням диск-електрофорезу в градієнтному (7—25 %) поліакриламідному гелі. Коров'яче молозиво брали через 24—48 год після отелення, обезжирювали та осаджували казеїн і глобуліни. В роботі як тест-систему використовували спленоцити мишей лінії СВА, активовані субоптимальною дозою (50 нг/мл) ліпополісахариду (ЛПС), виділеного з *E. coli* (0,55:B5; фірма «Fifco», США). Клітини ($5 \cdot 10^5$ /мл) культивували у поживному середовищі RPMI 1 640, яке вміщувало 5 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС), 2 ммоль/л L-глутаміну, 10^{-5} моль/л 2-меркаптоетанолу та 10 мкг/мл гентаміцину, протягом 72 год у вологій атмосфері повітря з 5 % CO_2 при 37 °С. Проліферативну активність спленоцитів мишей оцінювали за включенням ^3H -тимідину (ВО «Ізотоп») протягом останніх 4 год культивування. Радіоактивність зразків підраховували на β -сцинтиляційному лічильнику Mark III. Антитіла в супернатанті визначали імуноферментним методом з використанням антитіл (вітчизняного виробництва) проти імуноглобулінів миші. Оптичну густину вимірювали на фотометрі Multiskan-plus (фірма «Labsystems», Фінляндія). Кількість IgA-, IgM-, IgG1-, IgG2a- та IgG2b-утворюючих клітин визначали у суспензії спленоцитів на 4-у добу культивування методом імуноферментної плями [1], при цьому використовували афіноочищені кролячі антитіла до різних ізотипів імуноглобулінів миші (фірма «Calbiochem», США), індекси активації (ІА) для проліферативної відповіді та синтезу імуноглобулінів (ІС) визначали за числом імпульсів за хвилину та за відношенням числа клітин у досліді до такого у контролі.

Результати

Жіноче молозиво підвищувало проліферативну активність мишачих спленоцитів, стимульованих ЛПС у субоптимальних дозах. Спостерігалася також активація жіночим молозивом спонтанної проліферації спленоцитів, однак вона була менш виражена (мал. 1). Крім стимулюючої дії на проліферацію клітин жіноче молозиво чинило підвищуючий вплив на загальний вміст імуноглобулінів у клітинному супернатанті, який теж мав дозозалежний характер та виявлявся вже при 0,5 %-вій концентрації молозива у культуральному середовищі.

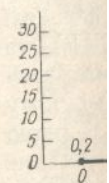
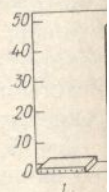
На відміну від жіночого молозива коров'яче молозиво здійснювало суперсильний ефект на проліферативну відповідь і на синтез імуноглобулінів мишачими спленоцитами, індукованими ЛПС у субоптимальних дозах. При цьому казеїн коров'ячого молозива не пригнічував значною мірою синтез антитіл. Супресуючий вплив на синтез імуноглобулінів виявлявся при внесенні у культуральне середовище глобулінової фракції коров'ячого молозива, отриманої в результаті висолювання сульфатом амонію при 50 %-вому насиченні. За допомогою методу іму-

нофермент
імуноглоб
обумовлен

З мет
моральний
лозива, ві
ючі власт

Мал. 1. Дос
лозива на і
зою ліпопол
танну (2) і
ноцитів миш
дослідів). З
центрація м
індекс акти
хв⁻¹.

вадили ге
римано д
зувалася



Мал. 2. В
миші, інду
трьох досл
2 % склад
5 — IgA; з
імуноглобу
за віссю а

Мал. 3. В
цитів миш
тів трьох
зліва — ек
тивної від

супернат
тіл, як
жині хв

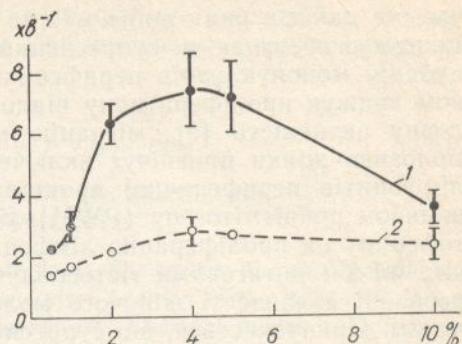
Для
рофорез
рію. Мо
тивості,

Обговор

У нашій
стимулю

ноферментної плями нами виявлено, що зростання загального синтезу імуноглобулінів у спленocyтах миші під впливом жіночого молозива обумовлено збільшенням числа IgG2a-синтезуючих клітин (мал. 2).

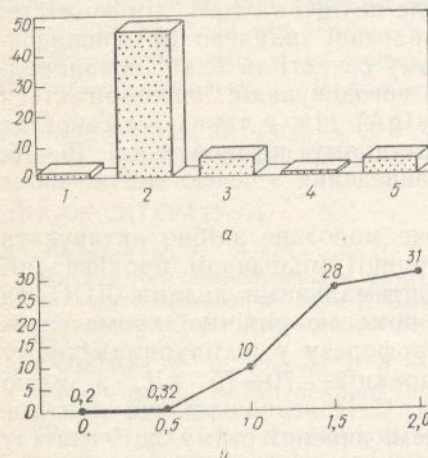
З метою охарактеризувати гуморальний компонент жіночого молозива, відповідальний за стимулюючі властивості останнього, ми про-



Мал. 1. Дозозалежний вплив жіночого молозива на індуковану субоптимальною дозою ліпополісахариду (50 нг/мл, 1) та спонтанну (2) проліферативну активність спленocyтiв миші (середнє із результатів трьох дослідів). За віссю абсцис — відносна концентрація молозива, %; за віссю ординат — індекс активації проліферативної відповіді, $\times 10^{-1}$.

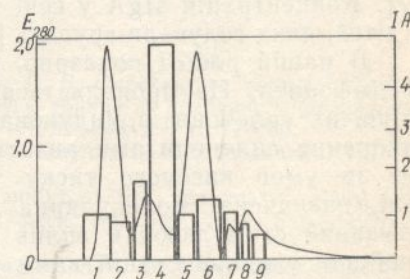
вадили гель-фільтрацію під високим тиском, в результаті чого було отримано дев'ять фракцій. Стимулюючим впливом при цьому характеризувалася четверта фракція при оптимальній концентрації білкових компонентів у культуральному середовищі 45 мкг/мл (мал. 3).

Ця ж фракція при концентрації її білкових компонентів у



Мал. 2. Вплив жіночого молозива на синтез ізотипів імуноглобулінів спленocyтами миші, індукованими субоптимальною дозою ліпополісахариду (середнє з результатів трьох дослідів): а — імуноглобулінсекретуючі клітини у поживному середовищі, де 2% складає сироватка жіночого молозива (1 — IgG1, 2 — IgG2a, 3 — IgG2b, 4 — IgM, 5 — IgA; за віссю ординат — індекс активації синтезу імуноглобулінів, I); б — число імуноглобулінсинтезуючих клітин із розрахунку на 10^4 спленocyтiв (за віссю ординат), за віссю абсцис — відносна концентрація молозива, %.

Мал. 3. Вплив фракцій (1—9) жіночого молозива на проліферативну відповідь спленocyтiв миші, індукованих субоптимальною дозою ліпополісахариду (середнє із результатів трьох дослідів). За віссю абсцис — порядковий номер фракції; за віссю ординат: зліва — екстинкція (E) при довжині хвилі 280 нм, справа — індекс активації проліферативної відповіді.



супернатанті 30 мкг/мл вірогідно збільшувала ($P < 0,05$) синтез анти-тіл, якщо подивитися на значення екстинкції супернатантів при довжині хвилі 492 нм у досліді ($2,3 \pm 0,2$) та контролі ($1,3 \pm 0,1$).

Для аналізу компонентів фракцій нами був проведений диск-електрофорез у поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату натрію. Молекулярна маса фракції, яка виявляла імуностимулюючі властивості, складала 70—75 кД.

Обговорення

У нашій роботі показано, що жіноче молозиво вміщує фактор, який стимулює впливає на В-лімфоцити. Цей вплив виявляється посилен-

ням проліферативної відповіді та синтезу імуноглобулінів мишачими спленоцитами, індукованими субоптимальними дозами ЛПС. Як показано, зростання вмісту імуноглобулінів під впливом жіночого молозива пов'язано зі збільшенням числа IgG2a-синтезуючих клітин. У той же час, за даними ряду робіт можна зробити висновок про те, що жіноче молозиво виступає як супресивний агент стимуляції лімфоцитів. Преінкубація мононуклеарів периферичної крові людини з жіночим молозивом знижує проліферативну відповідь на ФГА [3, 11], натуральну кілерну активність [9], міграцію моноцитів [10]. У розведенні 1:100 молозиво жінки пригнічує включення ^3H -тимідину і диференціювання лімфоцитів периферичної крові в імуноглобулінвміщуючі клітини під впливом поквітмітогену (PWM) [5]. Показано супресивний ефект лактоферину на проліферацію лімфоцитів периферичної крові, стимульованих ФГА і антигенами гістосполучення [14]. Біологічне значення супресивної активності жіночого молозива зостається до кінця не визначеним. Припускається, що супресивні фактори, присутні в материнському молозиві, захищають імунну систему новонародженої дитини від надмірної стимуляції антигенами навколишнього середовища. Мабуть, така протективна дія реалізується переважно Т-системою лімфоцитів. Однак показано, що жіноче молозиво вміщує гуморальні фактори, які селективно активують продукцію IgA. Так, супернатант клітин жіночого молозива значно збільшує синтез IgA, але не IgG та IgM, лімфоцитами периферичної крові [11]. У жіночому молозиві знайдено IgA-специфічний хелперний фактор [16]. У назальному секреті та слині новонароджених, які знаходяться на природному вигодовуванні, спостерігається більш високий вміст секреторного IgA (sIgA) ніж у таких же секретах новонароджених, які знаходяться на штучному вигодовуванні [6, 15, 17]. Концентрація sIgA у сечі та його виведення з сечею значно вище у дітей, яких годували груддю [13].

В нашій роботі показано, що жіноче молозиво здібно активувати В-лімфоцити. Це проявляється у стимуляції молозивом проліферації мишачих спленоцитів, індукованих субоптимальними дозами ЛПС, та утворення спленоцитами антитіл. За допомогою рідинної хроматографії за умов високого тиску та електрофорезу у поліакриламідному гелі визначена молекулярна маса фракції—70—75 кД, з якою зв'язаний стимулюючий вплив молозива. Слід зазначити, що ми не знайшли у використаній нами тест-системі значної стимуляції синтезу IgA під впливом жіночого молозива. Цей факт може пояснюватися відсутністю IgA-специфічних хелперних факторів у молозиві чи неможливістю їх детермінації у вказаних експериментальних умовах (спленоцити миші не мають попередників продуцентів IgA). Звертає на себе увагу значне підвищення продукції IgG2a лімфоцитами в присутності жіночого молозива. У зв'язку з цим найбільш можливо припустити, що жіноче молозиво вміщує фактори, які залучаються у диференціальний контроль секреції імуноглобулінів різних ізотипів. Незважаючи на те, що інтерлейкіни 1—6 характеризуються здібністю підтримувати збільшення числа В-лімфоцитів, преактивованих ЛПС, жоден із інтерлейкінів не здатний індукувати синтез ізотипу IgG2a [17]. У той же час показано, що γ -інтерферон *in vitro* стимулює секрецію IgG2a та пригнічує продукцію IgG1 та IgE ЛПС-преактивованими В-лімфоцитами [7]. Таким чином, можна припустити, що стимулюючі властивості жіночого молозива на В-лімфоцити пов'язані з γ -інтерфероном чи іншими факторами, які можуть підвищувати його продукцію.

У неонатальний період імунологічна реактивність новонародженої дитини дещо знижена, ще не розвинутий імунітет слизових оболонок [3]. У зв'язку з цим виправдано припущення про те, що материнське молоко може відігравати важливу роль у розвитку імунних реакцій новонародженої дитини. Фактори, що існують в жіночому молоці, можуть залучатися в імунну відповідь новонародженого і здійснювати стимулюючу дію на його незрілі В-клітини. Мабуть, в цілому захисна дія жіночого молока, яку воно здійснює відносно до новонародженої

дитини, опосередковується комплексом різних специфічних та неспецифічних захисних факторів, стимулюючим впливом на В-лімфоцити, а також імуносупресивною активністю, яка виявляється у деяких імунологічних реакціях. Оптимальне співвідношення різних захисних та імунорегуляторних факторів жіночого молока формує еволюційно вивірену імунологічну домінанту, під дахом якої проходить розвиток імунної системи за неонатальний період.

I. I. Slukvin, V. V. Pilipenko, A. A. Filchenkov, V. P. Chernyshov

INFLUENCE OF THE HUMAN COLOSTRUM AND ITS FRACTIONS ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE B-LYMPHOCYTES

The human colostrum stimulated by suboptimal doses (50 ng/ml) of lipopolysaccharide (LPS) has induced proliferation of mouse splenocytes. Addition of the human colostrum has elicited a rise in splenocyte culture supernatants. Effect of human colostrum on Ig synthesis was dose-dependent and was expressed at 0.5 % concentrations in the medium. In contrast to the human colostrum, the bovine colostrum exerted a suppressive effect on proliferation of mouse splenocytes and Ig synthesis induced by suboptimal doses of LPS. Bovine casein did not significantly affect the Ig synthesis by mouse splenocytes. Suppression of the Ig synthesis was associated with bovine colostrum globulins. Using the ELISPOT method we have found that a rise in the Ig level in the culture after treatment with the human colostrum was due to an increase of the number of IgG2a-secreting cells. B-cell promoting fraction was found after HPLC gel-filtration. The molecular weight of this fraction was 70-75 kD.

Ukrainian Institute of Pediatrics,
Obstetrics and Gynecology, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Логунова Н. Н., Агаджанян М. Г., Сидорова Е. В. Определение клеток, секретирующих иммуноглобулины и антитела к вирусу гриппа и поливинилпирролидону, иммуноферментным методом // Иммунология.— 1989.— № 2.— С. 77—80.
2. Шварцман Я. С., Хазенсон Л. Б. Местный иммунитет.— Л.: Медицина, 1978.— 220 с.
3. Chernyshov V. P., Slukvin I. I. Mucosal immunity of the mammary gland and immunology of mother/newborn interrelation // Arch. Immunol. Ther. Exp.— 1990.— 38.— P. 145—164.
4. Clemente J., Clerici N., Espinosa M. A., Leyva-Cobian F. Defective chemotactic response of human alveolar and colostrum macrophages // Immunol. Lett.— 1986.— 12.— P. 271—276.
5. Crago S. S., Kulhavy R., Prince S. J., Mestecky J. Inhibition of the pokeweed mitogen-induced response of normal peripheral blood lymphocytes by humoral components of colostrum // Clin. and exp. Immunol.— 1981.— 45.— P. 386—392.
6. Gross S., Buckley R. IgA in saliva of breast fed and bottle fed infants // Lancet.— 1980.— ii.— P. 543.
7. Jurado A., Carballido J., Griffe H. et al. The immunomodulatory effects of interferon-gamma on mature B-lymphocyte responses // Experientia.— 1989.— 45.— P. 521—562.
8. Komiyama K., Crago S. S., Iton K. et al. Inhibition of natural killer activity by IgA // Cell. Immunology.— 1986.— 101.— P. 143—155.
9. Moro I., Abo T., Crago S. S. et al. Natural killer cells in human colostrum // Ibid.— 1985.— 93.— P. 467—474.
10. Ogra P. L., Fishaut M., Theodore C. Immunology of breast milk: maternal neonatal interactions // Human Milk, Its Biological and Social Value. Selected Papers from International Symposium on Breast Feeding, Tel-Aviv, February 24—28, 1980.— Tel-Aviv, 1980.— P. 115—121.
11. Ogra S. S., Ogra P. L. Immunologic aspects of human colostrum and milk. II. Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different time after onset lactation // J. Pediatr.— 1978b.— 92.— P. 550—555.
12. Pittard W. B., Bil K. Immunoregulation by breast milk cells // Cellular Immunology.— 1979.— 42.— P. 437—441.
13. Prentice A. Breast feeding increases concentration of IgA in infants' urine // Arch. Dis. Child.— 1987.— 62.— P. 792—795.
14. Ritchie E. R., Hilliard J. K., Gilmore R., Gillespie D. J. Human milk-derived lactoferrin inhibits mitogen and alloantigen induced human lymphocyte proliferation // J. Reprod. Immunol.— 1987.— 12.— P. 137—148.
15. Roberts S., Freed D. Neonatal IgA secretion enhanced by breast feeding // Lancet.— 1977.— ii.— P. 1131.