

А 437

АКТУАЛЬНЫЕ

ВОПРОСЫ

КЛЕТОЧНОЙ

ИММУНОЛОГИИ

И

ИММУНОПЕДАГИКИ

Медицина и физкультура

612-017
А 437

**АКТУАЛЬНЫЕ
ВОПРОСЫ
КЛЕТОЧНОЙ
ИММУНОЛОГИИ
И
ИММУНОГЕНЕТИКИ**

Сборник статей советско-болгарских
исследований, посвященный

ПАМЯТИ СОВЕТСКОГО ИММУНОЛОГА
Г. П. ТРИБУЛЕВА

„МЕДИЦИНА И ФИЗКУЛЬТУРА“
СОФИЯ • 1973

ОТВЕТСТВЕННЫЕ РЕДАКТОРЫ:

Академик АМН СССР, профессор Н. Н. ЖУКОВ-ВЕРЕЖНИКОВ
Член-корр. Болг. АН, профессор Р. П. ПОПИВАНОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Профессор, доктор мед. наук И. Н. МАЙСКИЙ (Москва)
Профессор Б. А. БОТЕВ (София)
Ст. науч. сотр., канд. мед. наук И. И. ПОДОПЛЕЛОВ (Москва)
Профессор, доктор биол. наук В. Х. ВЫЛЧАНОВ (София)

Секретари: И. А. ГЛИНСКИЙ и М. Ф. НИКОНОВА (СССР)

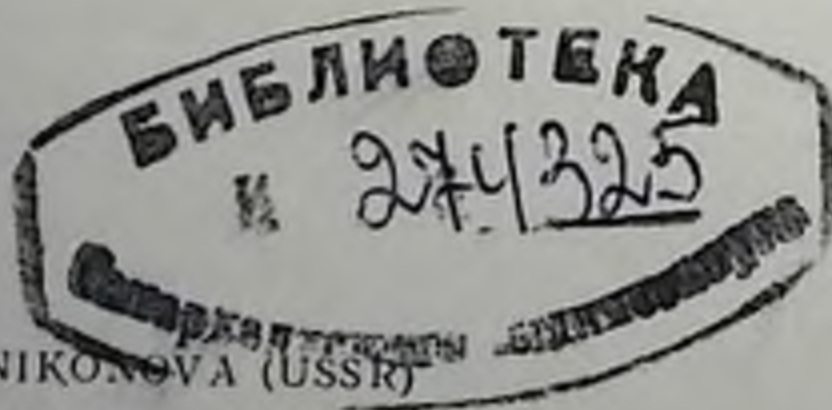
EDITORS-IN-CHIEF:

Professor N. N. ZHOUKOV-VEREZHNIKOV, memb. USSR Acad. Med. Sci.
Professor R. P. POPIVANOV, corresp. memb. Bulg. Acad. Sci.

EDITORIAL BOARD:

Professor Dr. I. N. MAYSKY (Moscow)
Professor B. A. BOTEV (Sofia)
Assoc. Prof. I. I. PODOPLELOV (Moscow)
Professor Dr. V. H. VULCHANOV (Sofia)

Secretaries: I. A. GLINSKY and M. F. NIKONOVA (USSR)



ПРЕДИСЛОВИЕ

Сборник статей «Актуальные вопросы клеточной иммунологии и иммуногенетики», посвященный памяти видного советского иммунобиолога Григория Поликарповича Трибулева (1906—1968), является одним из проявлений плодотворного сотрудничества советских и болгарских ученых в области экспериментальной иммунобиологии. Этот сборник издается по инициативе руководства Научно-исследовательской лаборатории экспериментальной иммунобиологии АМН СССР в г. Москве и руководства Кафедры общей биологии Медицинской академии в г. Софии (НРБ).

Активное сотрудничество этих двух научно-исследовательских учреждений начато в 1963 г. Оно осуществляется посредством периодического обмена специалистами для совместной экспериментальной работы в Москве и Софии. Этим были созданы условия для углубленных цитоиммунологических и иммуногенетических исследований в области антигенной структуры человеческих сперматозондов и семенной плазмы, взаимоотношений между антигенами сперматозондов и антигенами длительно культивируемых соматических клеток человека; энзимохимических изменений в процессе сперматогенеза и при развитии асперматогенного орхита; иммунологических реакций на индуцируемые и перевиваемые опухоли.

Результаты совместных исследований позволили сформулировать выводы, имеющие как теоретическое, так и клинично-прикладное значение. Эти результаты были встречены с большим интересом при обсуждении их на национальных, всесоюзных и международных конференциях, они получили также широкое отражение в иностранной научной литературе. Здесь особенно нужно подчеркнуть, что в установлении, укреплении и в идейном углублении этого сотрудничества сыграло большую роль руководящее участие покойного Г. П. Трибулева: его талант экспериментатора и эрудиция биолога стимулировали работу коллектива.

Отбирая материал для сборника, редакционная коллегия руководствовалась следующими критериями: 1) в сборник включены труды по дальнейшей разработке идей Г. П. Трибулева; 2) включены труды в области клеточной иммунологии и иммуногенетики, выполненные сотрудниками, учениками и последователями Г. П. Трибулева, а также сотрудниками упомянутого выше советско-болгарского коллектива.

Из 45 статей сборника 29 написаны советскими авторами, 11 — болгарскими и 5 являются совместно написанными статьями. Кроме НИИ экспериментальной иммунобиологии АМН СССР в г. Москве и Кафедры общей биологии МА в г. Софии, в сборнике участвуют сотрудники следующих научных учреждений: Лаборатории иммунологии Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР; Всесоюзного НИИ акушерства и гинекологии; Центрального НИИ судебной психиатрии им. В. П. Сербского; НИИ судебной медицины Минздрава СССР; Института биологии и патологии размножения Академии сельскохозяйственных наук в Софии; Лаборатории клеточной иммунологии Зоологического института БАН в Софии; Лаборатории иммунологии Московского ОТКЗ НИИ скорой помощи; Института ревматизма в г. Москве и кафедры Ереванского мед. института; Кафедры физики 2-го МОЛМИ в г. Москве; Кафедры акушерства и гинекологии, вирусологии и анатомии Медицинской академии в Софии; Кафедры гистологии и эмбриологии медицинского факультета в Пловдиве (НРБ) и другие научно-исследовательские учреждения и клиники, о которых сообщено в списке авторов в конце книги.

Введением в сборник служит краткий очерк о жизни и деятельности Г. П. Трибулева. К очерку приложен список его научных публикаций. Статьи, помещенные в сборнике, сгруппированы тематически в следующих 6 разделах:

1) Исследования Г. П. Трибулева в области разработки и применения новых идей и методов иммунологии;

2) Изучение антигенного состава соматических и половых клеток и тканей и проблемы иммуногенетики;

3) Иммунобиологические исследования межклеточных взаимодействий и биологической роли адсорбции белков;

4) Изучение противоопухолевого и трансплантационного иммунитета;

5) Иммунобиологические и иммуногенетические исследования на моделях различных уровней биологической организации;

6) Экспериментальные и клинические исследования по проблеме иммунологии размножения.

К каждой статье дано краткое резюме на английском языке. Отдельно дан список авторов статей (в алфавитном порядке), указаны их научные звания и степени, а также их служебные адреса.

Эта книга, как мы надеемся, будет представлять интерес не только для специалистов-экспериментаторов (иммунологов, биологов, микробиологов, генетиков, патологов, гематологов, физиологов, биохимиков и др.), но и для широкого круга клиницистов и врачей, а также для всех, кто интересуется теоретическими и медико-прикладными проблемами иммунобиологии.

Москва—София, 1973 г.

Редакционная коллегия

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	5
Григорий Поликарпович Трибулев — выдающийся советский иммунолог — Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, И. И. Подоплелов, Н. И. Шарый	15
Список научных трудов Г. П. Трибулева	19

I РАЗДЕЛ

ИССЛЕДОВАНИЯ Г. П. ТРИБУЛЕВА В ОБЛАСТИ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ ИДЕЙ И МЕТОДОВ ИММУНОЛОГИИ

1. П. Н. Косьяков — Антигенная дифференцировка клеток, тканей и органов человека в норме и патологии и труды Г. П. Трибулева	29
2. М. И. Потапов — Научное наследие Г. П. Трибулева и развитие судебно-медицинской серологии	33
3. А. К. Туманов — Идеи Г. П. Трибулева и развитие их в судебно-медицинской экспертизе вещественных доказательств	36

II РАЗДЕЛ

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОГО СОСТАВА СОМАТИЧЕСКИХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК И ПРОБЛЕМЫ ИММУНОГЕНЕТИКИ

4. Г. П. Трибулев, И. И. Подоплелов, Н. И. Ша-	
--	--

CONTENTS

Forward	5
Grigory Polikarpovich Tribulev — eminentsoviet immunologist — by N. N. Zhoukov-Verezhnikov, I. N. May-sky, I. I. Podoplelov and N. I. Sharey	15
List of the scientific papers of G. P. Tribulev	19

PART I

G. P. TRIBULEV'S RESEARCH IN THE FIELD OF DEVELOPMENT AND APPLICATION OF NEW IDEAS AND METHODS OF IMMUNOLOGY

1. P. N. Kosjakov — Antigenic Differentiation of Human Cells, Tissues and Organs under Normal and Pathologic Conditions as Elucidated in the Works of G. P. Tribulev	29
2. M. I. Potapov — The Scientific Heritage of G. P. Tribulev and the Development of Forensic-Medical Serology	33
3. A. K. Toumanov — G. P. Tribulev's Concepts and their Development and Application in the Assessment of Material Evidences in Forensic Medicine	36

PART II

STUDIES ON THE ANTIGENIC COMPOSITION OF SOMATIC AND GERM CELLS AND THE PROBLEMS OF IMMUNOGENETICS

4. G. P. Tribulev, I. I. Podoplelov, N. I. Sha-	
---	--

рый, Г. В. Крюкова, В. Т. Тимофеев, Ю. Т. Александян, Ю. В. Зыков, Ю. Н. Сухов — Анализ антигенного состава клеток человека, культивируемых вне организма	41
5. И. И. Подоплелов, Н. И. Шарый, В. М. Ковалева, В. И. Поздняков, Г. В. Крюкова — Иммунобиологический анализ клонов, полученных из линий клеток человека	47
6. Р. П. Попиванов, В. Х. Вылчанов — О возможности функционирования гаплоидного генома в сперматозоидах человека (иммунологический анализ)	51
7. Н. И. Кузнецова — Исследование ингибирующей активности слюны человека к фитогемагглютиниру из семян гороха (<i>Pisum sativum</i>)	63
8. Р. П. Попиванов, И. И. Подоплелов, Л. С. Наков — М и N антигены в сперматозоидах человека	69
9. И. И. Подоплелов, А. С. Самойленко — Исследование гетерогенных антигенов, сходных у патогенных штаммов кишечной палочки с изоантигенами человека системы АВО	73
10. И. Д. Буланов, Л. С. Наков, С. М. Живков, Т. И. Еврев, Ц. Н. Сырнева — Разделение групповых антигенов семенной плазмы по методу гель-фильтрации	76
11. Н. М. Мазина — О гетерогенных антигенах тканей сердца, общих с гемолитическим стрептококком	82
12. Н. Н. Жуков-Вережников, Г. М. Бочко, Н. И. Рыбаков — Изучение вакцинных штаммов микроорганизмов в связи с проблемой гетерогенных антигенов	87
13. С. М. Живков, Р. П. Попиванов, Т. И. Еврев, И. Д. Буланов, Л. Н. Русев — Групповые антигены в культивированных <i>in vitro</i> клетках Сертоли	90

rey, G. V. Kryukova, V. T. Timofeyev, U. T. Alexandyan, U. V. Zhoukov, U. N. Soukhov — Analysis of the Antigenic Composition of Human Cells, Cultivated Outside the Organism	41
5. I. I. Podoplelov, N. I. Sharuy, V. M. Kovaleva, V. I. Pozdnyakov, G. V. Kryukova — Immunobiological Analysis of Clones, Derived from Human Cell Lines	47
6. R. P. Popivanov, V. H. Vulchanov — On the Immunological Evidences Suggesting Possible Functioning of the Haploid Genome in Human Spermatozoa	51
7. N. I. Kouznetzova — Studies on the Inhibitory Effect of Human Saliva on Phytohemagglutinin, Derived from Pea's Seeds (<i>Pisum Sativum</i>)	63
8. R. P. Popivanov, I. I. Podoplelov, L. S. Nakov, — M and N Antigens in Human Spermatozooids	69
9. I. I. Podoplelov, A. S. Samoilenko — Studies on the Heterogenic Antigens in Pathogenic Strains of Intestinal Bacteria, Similar to the Abo Human Isoantigens	73
10. I. D. Boulanov, L. S. Nakov, S. M. Zhivkov, T. I. Evrev, N. N. Sargneva — Separation of Seminal Plasma Group Antigens by Gel-Filtration	76
11. N. M. Mazina — On the Heterogenous Heart-Tissue Antigens Shared with Hemolytic Streptococci	82
12. N. N. Zhoukov - Verezhnikov, G. M. Botchkov, N. I. Ribakov — Studies on Some Vaccinal Strains of Microorganisms with Regard to the Problem of Heterogenic Antigens	87
13. S. M. Zhivkov, R. P. Popivanov, T. I. Evrev, I. D. Boulanov, L. N. Roussev — Group Antigens <i>in vitro</i> cultivated in Sertoli Cells	90

14. Ц. Н. Сырнева — Исследование количества секретированных слюной АВН-антигенов (Исследования, произведенные на близнецах) 93

III РАЗДЕЛ

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕЖДУ-КЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И РОЛИ АДСОРБЦИИ БЕЛКОВ

15. Р. Попиванов, Б. Ботев, В. Вилчанов, Л. Шиндаров, Л. Наков, К. Киров, Л. Мархолов, Т. Еврев, С. Живков, И. Буланов, Л. Антонов, Л. Василева, Д. Пенев, Г. П. Трибулев, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, В. Г. Крюков, Ю. Н. Сухов, Г. В. Крюкова, И. П. Косова — Иммунобиологическое изучение характера взаимодействия человеческих сперматозоидов и соматических клеток в культуре Hela и Tg₃₃ 101

16. А. К. Сааков, Г. П. Трибулев, М. Н. Петряшина — Очищение антигенов методом «блокады» для повышения специфичности получаемых противотканевых сывороток 110

17. И. А. Глинский, В. Г. Крюков, И. И. Подоплелов, Ю. Н. Сухов, И. П. Косова, М. М. Капичников — Феномен фагоцитоза лимфоцитов клетками-«мишенями» в культуре 114

18. И. И. Подоплелов, Н. И. Кочергина, И. П. Косова — Изучение феномена аллогенного торможения и сингенного предпочтения на модели однослойных культур клеток человека и животных . . . 123

19. Л. Наков, С. Живков, Т. Еврев, К. Киров, Р. Попиванов, М. М.

14. Ts. Sarneva — Quantitative Inheritance of the ABH-Antigens, Secreted with Saliva (Studies on Twins) 93

PART III

IMMUNOBIOLOGICAL STUDIES ON THE INTERCELLULAR RELATIONSHIP AND THE ROLE OF PROTEIN ADSORPTION

15. R. Popivanov, B. Botev, V. H. Vulchanov, A. Shindarov, L. Nakov, K. Kirlov, L. Markholev, T. Evrev, S. Zhivkov, I. Boulanov, L. Antonov, L. Vassileva, G. P. Tribulev, I. I. Podoplelov, I. A. Glinsky, V. G. Kryukov, U. N. Soukhov, G. V. Kryukova, I. P. Kossova — Immunologic Studies on the Character of the Interaction Between Human Spermatozoa and Hela and Tg₃₃ Somatic Cells in Cultures . . . 101

16. A. K. Saakov, G. P. Tribulev, M. N. Petryashina — Purification of the Antigens by the «Blockade» Method in order to Increase the Specificity of Anti-tissue Sera 110

17. I. A. Glinsky, V. G. Kryukov, I. I. Podoplelov, U. N. Sukhov, I. P. Kossova, M. M. Kapitchnikov — The Phenomenon of Lymphocyte Phagocytosis by «Target» Cells in Cultures 114

18. I. I. Podoplelov, N. I. Kotchergina, I. P. Kossova — A Study of the Phenomenon of Allogenic Inhibition and Syngenic Preference on Models of Monolayer Cultures of Human and Animal Cells . . . 123

19. L. Nakov, S. Zhivkov, S. Evrev, K. Kirlov, R. Popivanov, M. M.

- Капичников, И. И.
 Подоплелов, Н. Н.
 Настоящая, И. А.
 Глинский, В. Г. Крюков, Ю. Н. Сухов —
 Изучение иммунобиологических
 свойств H-Y антигена у мышей
in vivo и *in vitro* 128
20. М. М. Капичников, Б.
 П. Шадрин, И. И. По-
 доплелов, Н. Н. Да-
 хина, Ю. Н. Сухов,
 И. А. Глинский, Г. В.
 Булава, И. П. Косо-
 ва — Изучение взаимодей-
 ствия между клетками-«мишеня-
 ми» и лимфоцитами, специфиче-
 ски сенсibilизированными
 к антигенам H-2^k локуса и
 мечеными ³H тимидином 134
21. В. Г. Крюков, И. А.
 Глинский, И. И. По-
 доплелов, Ю. Н. Су-
 хов, И. П. Косова — Ис-
 следование взаимодействия им-
 мунных лимфоцитов и клеток-
 «мишеней» в культуре с исполь-
 зованием цейтраферной микро-
 съемки 138

IV РАЗДЕЛ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУ-
 ХОЛЕВОГО И ТРАНСПЛАН-
 ТАЦИОННОГО ИММУНИТЕТА

22. И. Н. Майский, Г. П.
 Айрапетьян, Т. А. По-
 кровская — Влияние раз-
 личных доз гидрокортизона на
 метастазирование опухоли
 Броуна—Пирса 149
23. Т. А. Покровская, Л.
 Мархолов, Б. Ботев,
 С. Живков, З. Дудун-
 ков, Х. Шивачев, Б.
 Василев, И. Руме-
 нов — О наличии антител к
 клеткам HeLa в сыворотке
 больных раковой болезнью. . . 153
24. И. Георгиев, Н. Н.
 Дахина, М. М. Ка-
 пичников — Сравнитель-
 ное изучение роли гумораль-
 ных и клеточных факторов в
 трансплантационном иммуни-
 тете методом диффузионных ка-
 мер *in vivo* 160

- Капичников, И. И.
 Подоплелов, Н. Н. Na-
 stoyashchaya, I. A.
 Glinsky, V. G. Kryo-
 kov — An *in vivo* and *in vitro*
 Study of the Immunobiological
 Properties of Mouse H-Y Antigen 128
20. M. M. Kapitchnikov,
 B. P. Shadrin, I. I.
 Podoplelov, N. N. Da-
 khina, U. N. Sukhov,
 I. A. Glinsky, T. A.
 Bulava, I. P. Kosso-
 va — A Study of the Interrela-
 tionship between Target-Cells
 and Lymphocytes Specifically
 Sensitized to H-2^k Locus Anti-
 gens and Labeled with H³-Thy-
 midin 134
21. V. G. Krukov, I. A.
 Glinsky, I. I. Podop-
 plelov, U. N. Sukhov,
 I. P. Kossova — Studies
 on the Interrelationship between
 Immune Lymphocytes and Tar-
 get-Cells in Cultures by Means
 of Time-Laps Microcinematog-
 raphy 138

PART IV

STUDIES ON THE ANTI-
 TUMOUR AND TRANSPLANT-
 ATION IMMUNITY

22. I. N. Maisky, G. P. Ay-
 rapetyan, T. A. Pok-
 rovskaya — The Influ-
 ence of Hydrocortisone Dosa-
 ge on the Metastasizing of the
 Brown—Pearge Tumour 149
23. T. A. Pокrovskaya,
 I. Markholev, B. Bot-
 ev, S. Zhivkov, Z.
 Doudounkov, H. Shi-
 vachev, V. Vassilev,
 I. Roumenov. On the
 Presence of Anti HeLa Antibodies
 in the Serum of Cancer Patients 153
24. I. Georgijev, N. N. Da-
 khina, M. M. Kapit-
 chnikov — Comparative
 Studies on the Role of Humo-
 ral and Cellular Factors in Trans-
 plantation Immunity, Using the
 Diffusion Chamber Method *in*
vitro 160

25. I. N. Maisky, G. V. Souvорова, L. G. Andreeva, S. S. Feigelman — Влияние инокуляции облученных опухолевых клеток на иммунобиологическую реактивность организма . . . 165
25. И. Н. Майский, Г. В. Суворова, Л. Г. Андреева, С. С. Фейгельман — Влияние инокуляции облученных опухолевых клеток на иммунобиологическую реактивность организма . . . 165
26. С. С. Фейгельман, И. Н. Майский, И. М. Гончаренко, Г. В. Суворова — Влияние изменения протеолитической активности кожи на интенсивность реакции трансплантационного иммунитета . . . 170
26. С. С. Фейгельман, И. Н. Майский, И. М. Гончаренко, Г. В. Суворова — Влияние изменения протеолитической активности кожи на интенсивность реакции трансплантационного иммунитета . . . 170
27. М. С. Ломакин, И. Н. Майский, Е. В. Сокорова, С. Н. Губенко — Изучение клеточных реакций на первичные опухоли и их метастазы . . . 176
27. М. С. Ломакин, И. Н. Майский, Е. В. Сокорова, С. Н. Губенко — Изучение клеточных реакций на первичные опухоли и их метастазы . . . 176
28. Г. П. Айрапетьян, Р. Б. Гудкова, И. Н. Майский — О межклеточном взаимодействии первичных опухолей, индуцированных ДМБА, с аутологичными лимфоцитами . . . 182
28. Г. П. Айрапетьян, Р. Б. Гудкова, И. Н. Майский — О межклеточном взаимодействии первичных опухолей, индуцированных ДМБА, с аутологичными лимфоцитами . . . 182
29. И. Н. Майский, Г. В. Суворова — Изменение антигенных свойств клеток, индуцированных опухолей под влиянием воздействия лучей рентгена . . . 187
29. И. Н. Майский, Г. В. Суворова — Изменение антигенных свойств клеток, индуцированных опухолей под влиянием воздействия лучей рентгена . . . 187
30. В. С. Коростелева, П. Н. Косяков — Иммунологическая специфичность раковых тканей человека . . . 191
30. В. С. Коростелева, П. Н. Косяков — Иммунологическая специфичность раковых тканей человека . . . 191
31. Л. Мархолов, Б. Ботев, С. Живков, Б. Василев — Выявление специфических аутоантител у больных злокачественными опухолями гениталий. . . 196
31. Л. Мархолов, Б. Ботев, С. Живков, Б. Василев — Выявление специфических аутоантител у больных злокачественными опухолями гениталий. . . 196
- М. Ю. Климова, З. А. Монсеев, П. А. Кондреева, S. S. Feigelman — Influence of the Inoculations of Irradiated Tumour Cells on the Immunologic Reactivity of the Organism . . . 165
26. S. S. Feigelman, I. N. Maisky, I. M. Goncharenko, G. V. Souvорова — Influence of the Skin Proteolytic Activity Changes on the Intensity of the Transplantation Immunity Reaction . . . 170
27. M. S. Lomakin, I. N. Maisky, E. V. Sokorova, S. N. Goubenko — A Study of the Cell Response to Primary Tumours and their Metastases . . . 176
28. G. P. Ayrapetyan, R. B. Goudkova, I. N. Maisky — On the Interaction between the Cells of Primary Induced DMBA Tumours and Autologous Lymphocytes. . . .
29. I. N. Maisky, G. V. Souvорова — Changes of the Antigenic Behavior of Induced Tumour Cells after X-Ray Irradiation . . . 182
30. V. S. Korosteleva, P. N. Kossjakov — Immunologic Specificity of Human Cancer Tissues
31. L. Markholev, B. Botev, S. Zhivkov, B. Vasilev — Tumour Specific Autoantibodies in Female Patients with Cancer of the Genitals . . .

V РАЗДЕЛ

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

PART V

IMMUNOBIOLOGICAL AND NOGENETICAL INVESTIGATIONS ON DIFFERENT LEVELS OF BIOLOGICAL ORGANIZATION

32. Н. И. Рыбаков, М. Н. Волков, З. П. Козловская, Е. Д. Анискин, А. Н. Кулагин,
32. N. I. Ribakov, M. N. Volkov, Z. P. Kozlovskaya, E. D. Aniskin, A. N. Koulagin, M. U.

- Климов, Е. А. Моусе-
уев, Р. А. Констан-
стантинов, Г. М. Боч-
ко, О. Б. Чимиров —
Подходы к изучению регуляции
антителогенеза в модельных
системах 203
33. А. А. Перелазный, М.
А. Губерниев, К. Г.
Чамова — Иммунологиче-
ская специфичность ДНК лей-
козной ткани коров. 208
34. В. Х. Вылчанов, И. Р.
Кехайов — Исследование
антигенной общности между
яичком и околоушной железой
человека 213
35. Л. Ф. Лазаренко, В. К.
Козлов, Н. Г. Жуков —
К вопросу об аутосенсibiliза-
ции при тяжелых ожогах глаз 222
36. В. А. Дроженников,
М. А. Губерниев, А. А.
Перелазный — К вопро-
су об ингибировании активности
ДНКаз специфическими ан-
тителами 224
37. В. Ю. Климов, М. А.
Губерниев, Г. П. Три-
булев — Изучение иммуно-
генной активности и иммуно-
логической специфичности тка-
невых ДНК в гомологичных и
гетерологичных отношениях . 228
38. Л. С. Након — Роль се-
лезенки в гуморальной иммун-
ной реакции гипериммунизиро-
ванных морских свинок и крыс 235
39. Л. Новоселска — Ад-
сорбция групповых А и В ан-
тигенов лиофилизатом личинок
трихинеллы 241

VI РАЗДЕЛ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И
КЛИНИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА
ВОПРОСОВ ИММУНОЛОГИИ
РЕПРОДУКЦИИ

40. К. Братанов, В. Ди-
ков — О некоторых пробле-
мах иммунологии процесса раз-
множения 247
41. Л. С. Волкова, М. И.
Куксова, А. В. Анд-
реева, В. В. Маль-
цева, Н. С. Гвазова,

- Н. К. Головкина —
Экспериментальная разработка
типов, Г. М. Botchkо,
О. В. Tchimirov — Ap-
proaches to the Study of the Re-
gulation of Antibody Genesis in
Model Systems 203
33. А. А. Perelazni, M. A.
Guberniyev, K. G.
Tchamova — Immunologic
Specificity of DNA, Isolated
from Cow's Leukemic Tissues 208
34. V. H. Vulchanov, I. R.
Kehayov — Studies on the
Antigenic Relations between
Testis and Gl. Parotis in Man 213
35. L. F. Lazarenko, V. K.
Kozlov, N. G. Zhu-
kov — Autosensitization in
Severe Eye Burns 222
36. V. A. Drozhenikov,
M. A. Guberniyev, A.
A. Perelazny — Inhibiti-
on of Desoxyribonuclease Acti-
vity by Specific Antibodies 224
37. V. U. Klimov, M. A.
Guberniev, G. P. Tri-
bulev — A Study of the Immu-
nogenic Activity and the Immu-
nologic Specificity of Tissue
DNA in Homologous and Hetero-
logous Relationship 228
38. L. Nakov — Participation of
the Spleen in the Humoral Im-
mune Response of Hyperimmu-
ne Guinea Pigs and Rats . . 235
39. L. Novoselska — Ad-
sorption of A and B Blood Group
Antigens by Lyophilized Larvae
of Trichinella Spiralis 241

PART VI

EXPERIMENTAL AND CLINI-
CAL STUDIES ON THE PRO-
BLEMS OF IMMUNOLOGY OF
REPRODUCTION

40. K. Bratanov, V. Di-
kov — On Some Aspects of the
Immunology of Reproduction 247
41. L. S. Volkova, M. I.
Kouksova, A. V. An-
drejeva, V. V. Mal-
tseva, I. S. Gvasava,
M. K. Golovkina — Ex-
perimental Studies on Some Pro-

- некоторых вопросов иммунологии репродукции 255
42. Л. С. Персианинов, Л. С. Волкова, В. М. Сидельникова, Д. В. Умбрумянц, И. П. Иванов, А. И. Любимова, О. В. Надеина — Клиническая разработка вопросов диагностики, прогноза, профилактики и лечения иммуноконфликтной беременности 259
43. Р. П. Попиванов, Т. И. Еврев, С. М. Живков, И. Д. Буланов — Спермоантитела с антиэнзимным действием 263
44. В. Илиева, Р. Витанова, И. Пенев, А. Катсулов — Пренатальное определение Rh₀(D) фенотипа плода при помощи клеток амниотической жидкости 266

- blems of the Reproduction Immunology.
42. L. S. Persianinov, L. S. Volkova, V. M. Sidelnikova, D. V. Umbroumyantz, I. P. Ivanov, A. I. Lyubimova, C. V. Nadeina — A Clinical Investigation into the Problems of Diagnosis, Prognosis, Prophylaxis and Treatment of Immunocolliding Pregnancy
43. R. P. Popivanov, T. I. Evrev, S. M. Zhivkov, I. D. Boulanov — Sperm Antibodies with Antienzyme Activity
44. V. Ilieva, R. Vitanova, P. Penev, A. Katsulov — Prenatal determination of the Rh₀(D) phenotype of the Foetus by amniotic fluid cells



ГРИГОРИЙ ПОЛИКАРПОВИЧ ТРИБУЛЕВ
(20. I. 1906 — 4. IX. 1968)

Портрет работы *В. Г. Крюкова*

ГРИГОРИЙ ПОЛИКАРПОВИЧ ТРИБУЛЕВ — ВЫДАЮЩИЙСЯ СОВЕТСКИЙ ИММУНОЛОГ

4 сентября 1968 года скончался видный советский ученый Г. П. Трибулев. Имя Г. П. Трибулева тесно связано с историей развития общей и частной иммунологии в Советском Союзе, а также с организацией и развитием совместных советско-болгарских научных исследований по иммунологии размножения. Наряду с этим он является одним из пионеров иммуногенетических исследований клеток человека в СССР.

Г. П. Трибулев родился 20 января 1906 года в семье бедного крестьянина. Начальное образование получил в приходской школе. После установления советской власти в Белоруссии принимал активное участие в работе первых комсомольских ячеек, избирался секретарем райкома и членом окружкома Комсомола. Член КПСС с 1927 года. С 1928 г. по 1939 г. — студент, аспирант и ассистент 2-го Московского медицинского института. На кафедре микробиологии этого института в лаборатории профессора И. Л. Кричевского он и начал научную деятельность.

Около 20 лет — с 1939 г. по 1958 г. — Г. П. Трибулев служил в рядах Советской Армии, занимая должности начальника лаборатории, начальника гарнизонного военного госпиталя в Гродно, начальника первого полевого инфекционного госпиталя на Западном фронте и начальника группы отдела Здравоохранения Советской администрации в Берлине. В первые дни Великой Отечественной войны ему удалось полностью сохранить и вывести из окружения весь персонал военно-полевого госпиталя и пройти с ним — сначала до Подмосковья, а затем с наступающими советскими войсками до Берлина. В 1945 году, работая в отделе Здравоохранения Советской администрации в Берлине, Г. П. Трибулев принимал активное участие в организации органов здравоохранения ГДР. Немало времени и энергии во время войны было посвящено им организации и профилактике особо опасных инфекций, обеспечению эпидемиологической безопасности Советской Армии.

В 1950 году полковник медицинской службы Г. П. Трибулев, после успешной защиты диссертации, был утвержден доцентом и назначен заместителем начальника кафедры военной эпидемиологии Центрального института усовершенствования врачей в Москве.

С 1959 года он работал в Институте экспериментальной биологии АМН СССР — сначала в должности старшего научного сотрудника лаборатории биологической несовместимости тканей, а с 1961 года — заместителем директора института по научной работе.

За период своей научно-исследовательской деятельности, на протяжении 32-х лет, Г. П. Трибулевым было выполнено около 90 научных работ по вопросам анализа изоантигенов и изоантител, по иммунохимии антигенов, серодиагностике особо опасных инфекций, иммуногенетике, иммунологии размножения и т. д. Начальный период его научной деятельности был посвящен глубокому изучению групповой и типовой антигенной дифференцировки тканей и клеток человека. В этой области науки он известен как автор наиболее значительных работ по этой проблеме. Особенно ценны его методические работы. Еще в 30-е годы совместно с П. Н. Косяковым он разработал метод определения тканевых изоантигенов человека, который широко вошел в практику всех иммунологических лабораторий мира. Ряд его оригинальных методик нашли применение в судебной медицине. В эти же годы Г. П. Трибулев начал изучение биологической и химической природы тканевых изоантигенов типа М и N. Свою научную деятельность он не прекращал и в суровые годы Великой Отечественной войны. В эти трудные годы вышел ряд его научных публикаций, обобщающий опыт работы инфекционного госпиталя в полевых условиях.

Во всей его научно-организационной деятельности наблюдалось стремление сочетать теоретические работы с интересами практики.

Талант и широта научных интересов Г. П. Трибулева наиболее ярко проявились в период его работы в Институте экспериментальной биологии АМН СССР, где он проводил большую научно-организационную работу. В стенах этого института им была организована группа исследователей, занимающихся новыми актуальными проблемами иммуногенетики и генетики соматических клеток, культивируемых вне организма. Вместе с тем он принимал активное участие в разработке общебиологического направления современной иммунологии.

В это время Г. П. Трибулевым с сотрудниками были разработаны методы «иммунологического очищения» клеток в культуре от белкового компонента питательных сред «блокады неспецифических антигенов». С помощью названных методов и комплекса других — иммунологических, морфологических и цитологических методик — ему с группой ученых удалось осуществить глубокие научные исследования в области изучения иммунобиологии антигенов клеток человека и животных, выращиваемых вне организма. В результате тонких, кропотливых исследований Григорием Поликарповичем было не только выявлено наличие клеточных изоантигенов АВ0 в глубинных слоях культивируемых клеток, но и показано их расположение в субклеточных фракциях — митохондриях и микросомах. Изоантигены АВ0, как известно, могут служить в качестве важнейших генетических маркеров при изучении одной из самых перспективных проблем — генетического обмена у соматических клеток человека.

В исследованиях по космической биологии ему с группой авторов удалось выявить динамику антигенной и биологической изменчивости в популяции линий клеток человека, многократно побывавших в условиях полетов на космических кораблях. В этот же период (1962—1964 г.г.) Г. П. Трибулев принимал активное участие в написании фундаментальных статей в коллективном философском труде по диалектике живой природы и в многотомном руководстве по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней.

В течение последних пяти лет жизни Г. П. Трибулевым и сотрудниками совместно с коллективом болгарских ученых, возглавляемых членом-корреспондентом БАН Р. П. Попивановым, были начаты экспериментальные исследования по изучению иммунологии половых и соматических клеток, а также их взаимодействия в однослойных культурах. Эти исследования позволили четко выявить в мужских половых клетках наличие антигенов системы АВ0, резус-антигенов, клеточные, органические и видоспецифические антигены; выяснить общность и различие антигенных свойств половых и соматических клеток; показать возможность проникновения сперматозоидов как в цитоплазму, так и в ядра соматических клеток. Именно этим проникновением половых клеток теперь можно объяснить «индукцию» и сохранение в пассажах приобретенных А- и В- антигенов в культурах соматических клеток, контактировавших с этими половыми клетками. Эти оригинальные работы, доложенные в 1967 году на I Международном симпозиуме по иммунологии оплодотворения в Варне, вызвали большой интерес и послужили началом новому направлению иммунологических исследований. Результаты этих работ по-новому освещают сущность некоторых сторон иммуногенетики и иммунопатологии таких сложных процессов, как оплодотворение и клеточная гибридизация. Нельзя не упомянуть, что интерес Григория Поликарповича к этой проблеме четко сформировался уже в 30-е годы, когда он детально изучал типовые антигены в эмбрионах человека.

Талантливый и глубоко эрудированный ученый, Г. П. Трибулев был также блестящим лектором и педагогом. Имея большой авторитет ученого и организатора, Григорий Поликарпович вел интенсивную научно-пропагандистскую и консультативную работу. К нему шли за советами и практической помощью не только начинающие научные работники и практические врачи, но и солидные ученые, и он щедро делился с ними своими мыслями, идеями и опытом. Много сил и времени отдал он подготовке и воспитанию своих многочисленных учеников, которые работают сейчас во многих лабораториях Советского Союза. Под его руководством и при его консультациях выполнен целый ряд кандидатских и докторских диссертаций.

Плодотворную научную и административную работу Г. П. Трибулев постоянно сочетал с большой общественной деятельностью: избирался секретарем партийной организации, был членом ревизионной комиссии и членом медицинского совета райкома, возглавлял работу философского семинара, где проявил глубокие философские знания и марксистско-ленинскую убежденность.

Огромная научная и организаторская деятельность Г. П. Трибулева была высоко оценена Советским Правительством и научной общественностью. Высокие правительственные награды — два Ордена Красной Звезды, Орден Отечественной войны, пять медалей и целый ряд благодарностей Министра Здравоохранения СССР — служат ярким доказательством этого признания.

Н. Н. Жуков-Вережников
И. Н. Майский
И. И. Подоплелов
Н. И. Шарый

GRIGORI POLIKARPOVITCH TRIBULEV — AN OUTSTANDING SOVIET IMMUNOLOGIST

N. N. Zhoukov-Verezhnikov, I. N. Maysky, I. I. Podoplelov, N. I. Sharey

Research Laboratory of Experimental Immunobiology
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

This paper is a brief review on the life and the scientific achievements of the outstanding soviet immunologist G. P. Tribulev (1906—1969); it emphasizes the importance of his contributions to the development of modern immunobiology.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ Г. П. ТРИБУЛЕВА

LIST OF THE SCIENTIFIC PAPERS OF G. P. TRIBULEV

1936

1. Типоспецифические М и N факторы в органах (П. Н. Косяков и —*). В кн.: «Программа и тезисы работ 2-ой Моск. конф. молодых научных работников медицины». М., 1936. «НКЗ СССР», 56—58.

1937

2. Группоспецифическая дифференцировка органов человека. Сообщ. XIII. Типоспецифические М и N факторы в органах (П. Н. Косяков и —). — ЖМЭИ XVIII, 1937, 2, 270—294.

1938

3. Влияние температуры и высушивания на М и N факторы крови человека (П. Н. Косяков и —). — ЖМЭИ, XXI, 1938, 4, (10), 118—130.
4. Устранение неспецифических явлений при изучении групповой дифференцировки органов методом абсорбции изоантител (— и П. Н. Косяков). — ЖМЭИ, XXI, 1938, 6 (12), 105—114.

1939

5. О проекте программы по микробиологии (—, К. И. Матвеев и П. Н. Косяков). — Медич. работник, № 13 (110), 2 февраля 1939.
6. М и N антигены человека в процессе эмбриогенеза (П. Н. Косяков и —). — ЖМЭИ, 1939, 9—10, 128—132.
7. М и N антигены человека в процессе эмбриогенеза (П. Н. Косяков и —). Бюлл. вопр. суд. мед. и погр. областей, 1939, № 2—3, 39—40.
8. Group-specific differentiation of specific M and N factors in the organs (P. N. Kosjakov and —). — J. Immunol., 37, 1939, 3, 283—295.
9. The effect of temperature and drying upon the M- and N-factors of the human blood (P. N. Kosjakov and —). — J. Immunol., 37, 1939, 3, 297—304.

1940

10. К вопросу о химической природе А, В, М и N антигенов человека (П. Н. Косяков и —). — Бюлл. вопр. суд. мед. и погр. областей, 1940, № 1, 24—26.

1941

11. Влияние блокады ретикуло-эндотелиальной системы на образование антител при возвратном тифе у мышей. — ЖМЭИ, 1941, 3, 70—73.
12. Zur Frage der chemischen Natur der A, B, M und N Antigene des Menschen (P. N. Kosjakov und —). — Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 98, 1940, 4, 261—272.

* В коллективных трудах соответствующее место имени Г. П. Трибулева обозначено — (большим тире).

1942

13. Опыт работы инфекционного госпиталя в полевых условиях. — Военно-санитарное дело, 1942, 7, 42—47.

1944

14. Типоспецифические M и N антигены в органах человека. — ЖМЭИ, 1944, 12, 49—52.

1945

15. Серобактериологическая диагностика брюшного тифа. — Воен. медицина на 3-м Белор. фр., 1945, № 13.
16. О диагностической ценности посевов крови на среду Клодницкого при брюшном тифе (— и М. Т. Балашова). — Воен. медицина на 3-м Белор. фр., 1945, № 13.

1948

17. Всегда ли реакция Вейль-Феликса бывает положительной при сыпном тифе. — ЖМЭИ, 1948, 8, 54—57.

1949

18. Последовательное обнаружение групповых А и В и типовых M и N антигенов методом абсорбции антител в одних и тех же объектах исследования. — ЖМЭИ, 1949, 6, 42—46.
19. Одномоментное обнаружение А, В, M и N антигенов методом абсорбции антител в одних и тех же объектах исследования. — ЖМЭИ, 1949, 6, 46—49. То же — Тр. Гос. НИ ин-та суд. медицины. М., «Медгиз», 1949, 146—151.
20. Применение трупной крови для получения типоспецифических сывороток анти M анти N. — Бюлл. эксп. биол. и мед., 1949, 11, 377—379.
21. Типоспецифические M и N антигены человека (канд. диссертация — рукопись). Москва, 1949, 140 стр.
22. Типоспецифические M- и N-антигены человека. Автореф. канд. дисс., Москва, 1949, 14 стр.

1950

23. И. И. Мечников и его борьба с вейсманизмом. — Военно-медиц. журн., 1950, 10, 50—53.

1951

24. И. М. Сеченов и И. П. Павлов об И. И. Мечникове. — Военно-медиц. журн., 1951, 9, 88—90.
25. О роли И. И. Мечникова в борьбе с метафизической патологией. — ЖМЭИ, 1951, № 2, 84—85.

1952

26. И. П. Павлов о микробиологии. — Военно-медиц. журн., 1952, 4, 88—90.
27. Иммунитет (А. Я. Алымов и —). — Большая советская энциклопедия, 1952, 17, 562—564.

1953

28. Инфекция (А. Я. Алымов и —). — Большая советская энциклопедия, 1953, 18, 325—327.
29. Агглютинация. Аллергические диагностические пробы. Бактериофаг. Иммунитет. Инфекция. Мечников И. И., Микроорганизмы. Миксты инфекционные. Преципитация. Серологические исследования. — В кн.: «Энцикл. мед. справоч. для воен. фельдшеров». Москва, 1953, стр. — 19, 19—20, 76, 446—448, 460—461, 741—742, 744—747, 749, 1137, 1276—1277.

1961

30. Современная иммунология и проблема биологической несовместимости (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский и —). — 2 Всесоюзн. конф. по пробл. тканевой несовместимости, консервации и трансплантации тканей, Одесса, 1961. В кн.: «Проблемы гомопластики и аллопластики», Киев, изд. «Здоровья», 1967, 5—9.
31. Итоги глубоких исследований (С. Мучник, П. Чепов, —, В. Войно-Яснецкий). — Мед. работник, 15 сентября 1961.
32. О биологической проблематике научных исследований (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, и —). — Мед. работник, № 47, от 13 июня 1961.
33. Экспериментально-биологические основы изучения трансплантационного иммунитета (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский и —). — В кн.: «2-я Всесоюзн. конф. хирургов, травматологов и анестезиологов», Баку, 20—25 декабря 1961. Тез. докл., 5—7.

1962

34. Значение микробиологических объектов для изучения патологических изменений генетического кодирования (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, А. П. Пехов, —, Н. И. Рыбаков и К. Д. Рыбакова). — Вестник АМН СССР, 17, 1962, 12, 49—59.
35. Микробиологические и цитологические исследования в изучении космического пространства (Н. Н. Жуков-Вережников, В. И. Яздовский, И. Н. Майский, —, А. П. Пехов, П. П. Саксонов, Н. И. Рыбаков, Н. П. Клемпарская, М. А. Губерниев, В. В. Антипов, А. А. Гюрджян, Н. С. Артемьева, В. Г. Высоцкий, Н. Н. Добров, В. А. Козлов. — В кн.: «Научная сессия, посвященная 5-ой годовщине запуска 1-го искусственного спутника Земли». Тезисы доклада. Москва, 1962, 21—24.
36. Новые концепции иммуногенеза (Докл. на XVI сессии АМН СССР). — Мед. работник, № 11, от 6 февраля 1962.
37. Группы крови человека. — В кн.: «Проблемы биол. и соврем. медицина», Москва, «Знание», 1962, 23—28.
38. Групповая дифференцировка тканей гипофиза человека. (М. М. Капичников, Н. А. Скуратова и —). — Бюлл. эксп. биол. и мед., 1962, 9, 104—106.
39. Экспериментальная биология и новые концепции иммуногенеза (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский и —). — Вестн. АМН СССР, 17, 1962, 4, 65—70.
40. Проблемы космической микробиологии и цитологии (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, В. И. Яздовский, А. П. Пехов, Н. И. Рыбаков, Н. Н. Клемпарская, А. А. Гюрджян, —, Н. Н. Нефедова, М. М. Капичников, И. И. Подоплелов, В. В. Антипов, И. С. Новикова, В. Я. Копьев. — В кн.: «Проблемы космической биологии», Москва, Изд. АН СССР, 1962, I, 118—137.

1963

41. Проблемы биологической несовместимости тканей и теория генетической информации (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский и —). — В кн.: «III Всесоюзн. конф. по пересадке тканей и органов». Материалы докладов, Ереван, 1963, 556—558.
42. Биологический аспект теории относительности (Н. Н. Жуков-Вережников, В. Я. Копьев, И. Н. Майский, А. П. Пехов, — и В. И. Яздовский). — Авиация и космонавтика, 1963, № 2, 33—35.
43. Оценка биологической эффективности факторов космического полета с помощью лизогенных бактерий *E. coli* K-12 (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, В. И. Яздовский, А. П. Пехов, Н. И. Рыбаков, —, П. П. Саксонов, Н. Н. Добров, В. В. Антипов, В. А. Козлов, В. Г. Высоцкий, Б. А. Мищенко, К. Д. Рыбакова, Г. П. Парфенов, В. В. Пантюхова, Е. В. Юдин, Е. Д. Анискин. В кн.: «Авиационная и космическая медицина». (Матер. конф.), 1963, 183—189.

44. На новые рубежи (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, В. С. Гостев, — и Н. С. Артемьева). — Медицинская газета, № 11 от 5 февраля 1963.
45. Мутантные и лизогенные бактерии как элементарные модели для воспроизведения наследственной патологии (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, —, А. П. Пехов и Н. И. Рыбаков). В сб.: «Генетика микроорганизмов» (Тр. симпоз. по пробл. наследственности и изменчивости микроорганизмов). Москва, «Медгиз», 1963, 92—98.
46. Особенности развития организма человека и теоретические основы медицины (Н. Н. Жуков-Вережников, П. П. Бондаренко, И. Н. Майский, — и Г. И. Царегородцев). В кн.: «Очерки диалектики живой природы». Москва, «Соцэкгиз», 1963, 369—438.
47. Завоевание космоса и биология. Философские проблемы космической биологии (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, — и Г. И. Царегородцев). В кн.: «Очерки диалектики живой природы». Москва, «Соцэкгиз», 1963, 498—511.
48. Современная генетика и проблемы космической биологии (Н. Н. Жуков-Вережников, М. Н. Волков, В. И. Яздовский, И. Н. Майский, П. П. Саксонов, П. А. Константинов, А. П. Пехов, —, Н. И. Рыбаков, В. Я. Копьев, И. И. Подоплелов, Н. Н. Добров, В. А. Козлов, В. Г. Высоцкий, Н. С. Артемьева, В. В. Антипов, Б. А. Мищенко, Е. Д. Анискин, Е. В. Юдин, К. Д. Рыбакова, Р. И. Шупик). В сб.: «Авиационная и космическая медицина» (Матер. конф.), Москва, 1963, 189—194.
49. Экспериментально-биологические основы изучения трансплантационного иммунитета (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский и —). — В кн.: «Тр. 2-ой Всесоюзн. конф. хирургов, травматологов и анестезиологов», Москва, «Медгиз», 1963.

1964

50. Определение иммунологии: виды и формы иммунитета, иммунологические специальности (Н. Н. Жуков-Вережников и —). — В кн.: «Многотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней». Москва, Медгиз, 1964, III, 15—35.
51. Большие проблемы медицинской генетики (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, М. А. Губерниев и —). — Медич. газета, № 92 от 17 ноября 1964.
52. Изучение антигенных свойств клеток штамма HeLa с помощью реакции агглютинации (— и И. И. Подоплелов). — Бюлл. exper. биол. и мед., 1964, 6, 76—78.
53. Итоги микробиологических и цитологических исследований на космических кораблях типа «Восток» (Н. Н. Жуков-Вережников, М. Н. Волков, И. Н. Майский, —, Н. И. Рыбаков, П. П. Саксонов, В. В. Антипов, В. А. Козлов и И. И. Подоплелов). — В кн.: «XV Междунар. конгресс по астронавтике», Варшава, 1964, т. 4, 265—271.
54. Микробиологические и цитологические исследования в освоении космического пространства (Н. Н. Жуков-Вережников, В. И. Яздовский, И. Н. Майский, —, А. П. Пехов, П. П. Саксонов, Н. И. Рыбаков, В. В. Антипов, Н. С. Артемьева, В. В. Козлов, Б. А. Мищенко, Е. В. Юдин, К. Д. Рыбакова, Е. Д. Анискин). В кн.: «Проблемы космической биологии», Москва, «Наука», 1964, т. III, 184—192.
55. Метод иммунологического очищения клеток культур от сывороточного компонента питательной среды (— и И. И. Подоплелов). — Бюлл. exper. биол. и мед., LVII, 1964, II, 125.
56. Антигенная структура клеток человека и актуальные проблемы иммуногенетики (— и И. И. Подоплелов). В кн.: «Матер. докл. конф. по эксп. мед. генетике», Москва, 1964, 38—40.
57. Теория генетической информации и проблемы моделирования наследственных аномалий (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский и —). — В кн.: «Матер. докл. конф. по эксп. мед. генетике». Москва, 1964, 21—23.
58. Изменчивость антигенов клеток человека, длительно выращиваемых вне ор-

- ганизма (И. И. Подоплелов, —, Н. И. Шарый и В. М. Ковеза). В кн.: «Матер. докл. конф. по эксп. мед. генетике». Москва, 1964, 49—51.
59. Study of the antigenic structure of human cells in cultures of strains «immunologically purified» of the serum component of the medium (—, I. I. Podoplelov, V. T. Kakrakov and N. I. Shary). — *Folia biol. (Praha)*, 1964, 10, 465—471.

1965

60. Изучение фагопродукции *E. coli* K-12 (λ), индуцированной в условиях полетов космических кораблей «Восток-3» и «Восток-4» (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, А. П. Пехов, Н. И. Рыбаков, —, П. П. Саксонов, Б. А. Мищенко, В. В. Антипов, В. А. Козлов, К. Д. Рыбакова, В. Г. Высоцкий, Н. Н. Добров, В. В. Пантюхова и Е. Д. Анискин). В сб.: «Космические исследования», Москва, 1965, т. III, в. 3, 488—491.
61. Изучение антигенов злокачественных клеток человека, длительно культивируемых вне организма (—, И. И. Подоплелов и В. Т. Тимофеев). В кн.: «Конф. по иммунобиологии злокачеств. новообразований». Матер. докл. Москва, Ин-т эксп. биол. АМН СССР, 1965, 37—40.
62. Получение специфических противораковых сывороток методом блокирования побочных антигенов (— и А. К. Сааков). — В кн.: «Конф. по иммунобиологии злокачеств. новообразований». Матер. докл. Москва, Ин-т эксп. биологии АМН СССР, 1965, 84—85.
63. Върху наличието на антигенна общност между клетките (HeLa и сперматозондите на човека (—, И. И. Подоплелов, Р. П. Попиванов и В. Х. Вълчанов). — *Експериментална медицина и морфология (София)*, 1965, IV, 3, 157—166.
64. Система генетической информации в сопоставлении с искусственными информационными системами и некоторые проблемы бионики (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, —, В. Я. Копьев, М. А. Губерниев, А. П. Пехов, Н. С. Артемьева, Н. И. Рыбаков, И. И. Подоплелов, В. А. Козлов, Е. Д. Анискин и К. Д. Рыбакова). В кн.: «Бионика», Москва, Наука, 1965, 440—445.
65. Первичная генетическая информация и проблема бионики (Н. Н. Жуков-Вережников, М. Н. Волков, В. Я. Копьев, И. Н. Майский, М. А. Губерниев, А. П. Пехов, —, Н. И. Рыбаков, Т. А. Залетаева, И. И. Подоплелов, В. А. Козлов, Н. С. Артемьева, Е. Д. Анискин, К. Д. Рыбакова и В. И. Горшков). — *Вопросы философии*, 1965, 7, 56—63.
66. Study on antigenic relations between HeLa-cells and human spermatozoa (—, I. I. Podoplelov, R. P. Popivanov and V. H. Vulchanov). — *Compt. rend. Acad. Bulg. Sci.*, 18, 1965, 887—889.

1966

67. Некоторые особенности роста и развития длительно выращиваемых вне организма клеток крысиной карциномы штамма РА (—, И. И. Подоплелов, Ю. Т. Алексанян, И. А. Глинский и В. Т. Тимофеев). В кн.: «Материалы конференции молодых ученых», Москва, ИЭБ АМН СССР, 1966, 130—133.
68. Некоторые итоги и перспективы изучения биологического действия космической радиации и динамических факторов полета с помощью микробиологических и цитологических моделей (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, —, Н. И. Рыбаков, И. И. Подоплелов, Н. Н. Добров, В. В. Антипов, В. А. Козлов, П. П. Саксонов, Г. П. Парфенов и Н. И. Шарый). В кн.: «Проблемы космической медицины». Матер. конф., Москва, 1966, 172—173.
69. Studium der Antigene der dauernd *in vitro* kultivierten menschlichen Zellen. (— и I. I. Podoplelov). — «Probleme der Zell- und Gewebezuchtung.» Dresden und Leipzig, 1966, 9, 79—84.
70. Изучение некоторых вопросов иммунологии гомотрансплантации на модели клеток крысиной карциномы до и после длительного культивирования их *in vitro*. (—, И. И. Подоплелов, Ю. Т. Алексанян, И. А. Глинский,

- В. Т. Тимофеев). В сб.: «Трансплантация органов и тканей». Матер. IV Всесоюзн. конф., Москва, Изд. «Медицина», 1966, 371—372.
71. Перспективы преодоления биологической несовместимости гомотрансплантатов в аспекте теории генетической информации. (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, М. А. Губерниев, — и И. И. Подоплелов). В сб.: «Трансплантация органов и тканей». Матер. IV Всесоюзн. конф., Москва, Медицина, 1966, 407—410.
72. Гетеротрансплантация рака желудка человека на крысах с изучением антигенных свойств тканей трансплантатов (И. И. Подоплелов, —, И. С. Башкаев, А. Ф. Захаров, В. Т. Какпаков, В. Т. Тимофеев, Ю. Т. Алексанян). В сб.: «Трансплантация органов и тканей». Материалы IV Всесоюзной конференции. Москва, «Медицина», 1966, 349—350.
73. Биологические исследования на космических кораблях «Восход» и «Восход-2» (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, Н. Л. Делоне, Н. И. Рыбаков, В. А. Козлов, Б. И. Давыдов, В. В. Антипов, П. П. Саксонов, К. Д. Рыбакова и —). — Космические исследования, IV, 1966, 4, 634, 640.

1967

74. Изучение некоторых биологических и антигенных свойств длительно выращиваемых вне организма клеток крысиной карциномы (Ю. Т. Алексанян, В. Т. Тимофеев, И. А. Глинский, Д. Ш. Манучарян, — и И. И. Подоплелов). — Тез. матер. конф. молодых ученых ИЭБ АМН СССР, Москва, 1967, 3—6.
75. Антигены системы АВ0 в эмбриональных тканях и однослойных культурах клеток человека (В. Т. Тимофеев, Ю. Т. Алексанян, — и И. И. Подоплелов). — Тез. матер. конф. молодых ученых ИЭБ АМН СССР. Москва, 1967, 127—130.
76. Антигены системы АВ0 в первичных культурах и перевиваемых линиях клеток человека (В. Т. Тимофеев, —, И. И. Подоплелов, Ю. Т. Алексанян). — Бюлл. эксп. биол. и мед., 1967, 7, 80—82.
77. Изучение видоспецифических антигенов клеток человека, длительно культивируемых вне организма (Н. И. Шарый, В. Т. Тимофеев, Ю. Т. Алексанян, Ю. В. Зыков, —, И. И. Подоплелов, А. Н. Кулагин). В кн.: «Тез. матер. конф. молодых ученых ИЭБ АМН СССР». Москва, 1967, 139—141.
78. Рецензия на книгу П. Н. Косякова «Иммунология изоантигенов и изоантител». Москва—Ленинград, Изд. «Медицина», 1965 (—, И. И. Подоплелов и И. А. Глинский). — ЖМЭИ, 1967, 6, 142—143.
79. Сравнительное изучение антигенов перевиваемой крысиной карциномы и полученной из нее линии длительно культивируемых клеток РПК (Ю. Т. Алексанян, И. И. Подоплелов, — и В. Т. Тимофеев). — Бюлл. эксп. биол. и мед., 1967, 6, 91—93.

1968

80. Изучение видоспецифических антигенов клеток крысиной карциномы в однослойных культурах (Ю. Т. Алексанян, —, И. И. Подоплелов и В. Т. Тимофеев). — Биол. журн. Армении, АН Армянск. ССР, 1968, 21, I, 68—71.
81. Перевиваемая линия клеток, полученная из крысиной карциномы (—, И. И. Подоплелов, Ю. Т. Алексанян, И. А. Глинский и В. Т. Тимофеев). — Бюлл. эксп. биол. и мед., 1968, I, 90—94.
82. Сравнительное изучение антигенного состава сперматозондов, эритроцитов и длительно культивируемых клеток человека (Р. П. Попиванов, В. Х. Вылчанов, —, И. И. Подоплелов, Ю. Т. Алексанян и В. Т. Тимофеев). В кн.: «Матер. 2-й научн. конф. ИЭБ АН Армянск. ССР», Ереван, 1968, 36—38.
83. К анализу биологических и антигенных особенностей клеток опухолевого происхождения в однослойных культурах (—, И. И. Подоплелов, Ю. Т. Алексанян, И. А. Глинский, В. Т. Тимофеев и Н. И. Шарый). В кн.: «Культура тканей в онкологии». Москва, «Медгиз», 1968, 305—311.
84. О влиянии ультразвука на культуры клеток человека (Н. И. Шарый, В. М.

Ковалева, — и И. И. Подоплелов). В кн.: «Культура тканей в онкологии». Москва, 1968, 243—245.

85. О некоторых результатах изучения биологической изменчивости культур клеток человека, многократно экспонированных на космических кораблях (Н. Н. Жуков-Вережников, И. Н. Майский, —, И. П. Подоплелов, В. В. Антипов, А. Н. Кулагин, Н. И. Шарый, В. А. Козлов и И. А. Глинский). В кн.: «Тр. конф. Ин-та медико-биол. проблем МЗ СССР». М., 1968, 102—104.
86. О появлении антигенов А и В в культурах клеток линии HeLa и Tg₃₃ после взаимодействия с живыми сперматозоидами человека (Р. П. Попиванов, С. М. Живков, Л. С. Наков, —, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский и В. Г. Крюков). — Докл. АН СССР, 1968, 181, 4, 987—988.
87. Рецензия на книгу В. И. Гаврилова «Перевиваемые клетки в вирусологии». М., «Медицина», 1964, (—, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, и В. Г. Крюков). — Вопросы вирусологии, 1968, 4, 513—515.

1969

88. Обнаружение аутоантигена в ткани семенника и в клетках однослойных культур семенника морских свинок (И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, —, В. Г. Крюков, Р. Попиванов, С. Живков, Л. Наков и Т. Еврев). В кн.: 3-я Всесоюзн. конф. по иммунопатологии, Ленинград, 1969, 44—45.
89. Общность и различие антигенных свойств сперматозоидов и длительно культивируемых соматических клеток человека (—, И. И. Подоплелов, Р. П. Попиванов, Л. С. Наков, С. М. Живков и В. Х. Вылчанов). В кн.: «Иммунология сперматозоидов и оплодотворения». София, БАН, 1969, 35—39.
90. О появлении антигенов А и В в культурах клеток линии HeLa и Tg₃₃ после взаимодействия с живыми сперматозоидами человека (—, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, В. Г. Крюков, Р. П. Попиванов, С. М. Живков и Л. С. Наков). В кн.: «Иммунология сперматозоидов и оплодотворения». София, БАН, 1969, 95—99.
91. Об аутоантигенах тестис и культур тестис морских свинок (Л. С. Наков, С. М. Живков, Р. П. Попиванов, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, — и В. Г. Крюков). В кн.: «Иммунология сперматозоидов и оплодотворения». София, БАН, 1969, 213—219.

1970

92. Анализ антигенной специфичности сперматозоидов и соматических клеток в аспекте иммунологии бесплодия (И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, —, В. Г. Крюков, И. П. Косова, Р. Попиванов, С. Живков, Л. Наков и Т. Еврев). В кн.: «Проблемы иммунологии и эндокринологии в акушерстве и гинекологии» (Матер. конф.). Каунас, МВССО Лит. ССР, 1970, 50—51.
93. Повышение специфичности антилимфоцитарных сывороток (АЛС) методом «блокады» антигенов (А. К. Сааков и —). В кн.: «Трансплантация органов и тканей», Материалы 5-ой Всесоюзной научной конференции по пересадке органов и тканей. Горький, 1970, 40—41.

1971

94. Обнаружение аутоантигена в ткани семенника и в клетках однослойных культур семенника морских свинок (И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, —, В. Г. Крюков, Р. Попиванов, С. Живков, Л. Наков и Т. Еврев). — Вестн. АМН СССР, 26, 1971, 1, 82—86.
95. Изучение антигенного состава сперматозоидов, эритроцитов, длительно культивируемых клеток человека, а также нормальных и опухолевых тканей крыс (Р. П. Попиванов, В. Х. Вылчанов, —, И. И. Подоплелов и Ю. Т. Алексанян). — Тр. Ереван. медич. ин-та, Ереван, 1971, 15, кн. 1, 55—62.

96. Опыт получения «иммунологически очищенной» сыворотки против перевиваемых клеток амниона человека (—, И. И. Подоплелов, Ю. Т. Алексанян, В. Т. Тимофеев). — Тр. Ереван. Мед. ин-та, Ереван, 1971, 15, кн. I, 63—67.

1973

97. Очищение антигенов методом «блокады» для повышения специфичности получаемых противотканевых сывороток (А. К. Сааков, — и М. Н. Петряшина). В сб.: Актуальные вопросы клеточной иммунологии и иммуногенетики. София, «Мед. и физкульт.», 1973, 110—113.
98. Иммунобиологическое изучение характера взаимодействия человеческих сперматозоидов и соматических клеток в культуре *in vitro*. (Р. Попиванов, Б. Ботев, В. Вылчанов, Л. Шиндаров, Л. Наков, К. Киров, Л. Мархолов, Т. Еврев, С. Живков, И. Буланов, Л. Антонов, Л. Васильева, Д. Пенев, —, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, В. Г. Крюков, Ю. Н. Сухов, Г. В. Крюкова и И. Н. Косова). В сб.: «Актуальные вопросы клеточной иммунологии и иммуногенетики». София, «Мед. и физк.», 1973, 101—109.
99. Анализ антигенного состава клеток человека, культивируемых вне организма (—, И. И. Подоплелов, Н. И. Шарый, Г. В. Крюкова, В. Т. Тимофеев, Ю. Т. Алексанян, Ю. В. Зыков и Ю. Н. Сухов). В сб.: «Актуальные вопросы клеточной иммунологии и иммуногенетики». София, «Мед. и физк.» 1973, 41—46.
100. Изучение иммуногенной активности и иммунобиологической специфичности тканевых ДНК в гомологичных и гетерологичных отношениях (В. Ю. Климов, М. А. Губерниев и —). — В сб.: «Актуальные вопросы клеточной иммунологии и иммуногенетики», София, «Мед. и физк.», 1973. 228—234.

Составлен: *И. А. Глинским и В. Г. Крюковым*
Compiled by *I. A. Glinsky and V. G. Kryukov*

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ

ИССЛЕДОВАНИЯ Г. П. ТРИБУЛЕВА В ОБЛАСТИ
РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ ИДЕЙ
И МЕТОДОВ ИММУНОЛОГИИ

АНТИГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ И ТРУДЫ Г. П. ТРИБУЛЕВА

Член-корр. АМН СССР П. Н. КОСЯКОВ

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва, СССР

Со времени классических исследований Landsteiner (1900—1901) в форменных элементах крови были открыты многие десятки антигенов, характеризующих специфическую дифференцировку организма человека. Результаты этих исследований нашли применение в практике переливания крови, при отборе совместимых доноров и реципиентов в восстановительной хирургии, акушерстве и гинекологии, судебной медицине и антропологии.

Значительные результаты были достигнуты и в изучении антигенной дифференцировки сывороточных белков, где также были найдены десятки генетически обусловленных антигенных признаков.

Однако изучение антигенной дифференцировки фиксированных клеток тканей и органов человека остается еще областью сравнительно мало исследованной. Это объясняется, прежде всего, сложностью антигенного состава тканей и органов человека, значительной трудностью их иммунологического анализа. Необходимость же изучения этой проблемы едва ли нуждается в обосновании. Антигенный состав крови далеко не исчерпывает антигенной специфики тканей и органов. Помимо антигенов общих для форменных элементов крови и тканей органов, последним присуща и своя генетически детерминированная биохимическая антигенная структура.

Специфика антигенов — это специфика ферментов, принимающих участие в их биосинтезе. Поэтому при подборе пар — донора и реципиента — не безразличным, по-видимому, будет анализ антигенных свойств органов и тканей. В настоящее время, как известно, типирование сводится только к подбору совместимых лимфоидных клеток и исключению несовместимости по антигенам системы АВ0, что едва ли может полностью характеризовать совместимость тканей и органов донора и реципиента, о чем свидетельствует имеющаяся уже практика. Нужно, по-видимому, думать не только об исключении возможности изоагрессивного взаимодействия клеток донора и реципиента, но и об

условиях наибольшего благопритствования функционированию трансплантата в условиях внутренней среды реципиента.

Известный советский исследователь И. Л. Кричевский был первым, кому удалось в 1927 г. показать, что фиксированные клетки тканей и органов человека содержат такие же антигены системы АВ0, какие находятся и в эритроцитах того же человека. Эти исследования были подтверждены во многих странах мира и в настоящее время сомнений не вызывают. Однако попытки найти в тканях органов человека антигены других систем, долгое время были безуспешны. Антигены М и N не были найдены в нормальных тканях почки, мышцы, слизистой оболочки матки.

Как показали наши совместные исследования с Г. П. Трибулевым (1937), отрицательные результаты, полученные в этом направлении многими авторами, явились следствием методических трудностей, а именно: резко выраженной неспецифической адсорбции тканями органов стандартных сывороток анти-М и анти-N. Разработав метод блокады неспецифических рецепторов клетки, нам удалось получить возможность дать определенный положительный ответ на вопрос о наличии в тканях органов человека антигенов М и N. Нами впервые было установлено (1936, 1937), что клетки органов человека содержат такие же антигены М и N, какие находятся и в эритроцитах того же индивида. Количественное содержание антигенов М и N в различных органах и тканях человека оказалось неодинаковым. В большем количестве они находятся в эритроцитах, несколько меньшем в клетках печени и почки и совсем малом в тканях мозга.

В 1944 г. появилось сообщение Г. П. Трибулева об обнаружении антигенов М и N в тканях селезенки и мышцы сердца, а в 1962 году эти антигены были найдены им и в тканях гипофиза человека. Установленные первоначально нами, совместно с Г. П. Трибулевым, факты были подтверждены затем и в других лабораториях. Так, Воогтап а. Dodd (1943) получили аналогичные результаты (авторы исследовали легкое, почку, селезенку, надпочечники, поджелудочную железу, слюнные железы, мышцу сердца и мозг). Эти авторы установили, что в фиксированных клетках органов человека содержатся те же самые антигены М и N, какие имеются и в эритроцитах соответственных лиц. В дальнейшем антигены М и N были найдены нами и в клетках раковых опухолей человека. Наличие в раковых клетках тех же самых специфических антигенов А, В, М, N и MN, какие присущи и клеткам нормальных тканей человека, свидетельствует о большом антигенном сходстве раковых и нормальных клеток. Отсюда можно сделать вывод, что клетки тканей организма приобретают новые для них биологические особенности, характерные для злокачественных опухолей, не утрачивая в то же время тех специфических групповых антигенных веществ — А, В, М, N, MN, какие присущи и нормальным клеткам человека, от которого опухоль происходит.

Г. П. Трибулев (1938) разработал метод блокады неспецифических рецепторов клетки для изучения антигенной дифференцировки органов животных. Этими исследованиями было показано, что у кроликов

групповой антиген В(В₂) является видовым признаком и находится как в эритроцитах, так и во всех органах. Антигена А₁, сходного с антигеном А человека, эти животные не содержат. Таким образом эти исследования Г. П. Трибулева внесли ясность в вопрос о групповой дифференцировке органов и тканей у кроликов. Не утратили своего значения и исследования Г. П. Трибулева о формировании групповых антигенов М и N в процессе эмбриогенеза. Было установлено, что антигены М и N обнаруживаются в эритроцитах 7—8 недельного возраста внутриутробной жизни. Однако антигенная дифференцировка в эти сроки представляется еще незаконченной, что проявляется в пониженных агглютинабельных свойствах эритроцитов эмбрионов. Начиная с 3-го месяца, антигены М и N эритроцитов эмбрионов не отличаются от эритроцитов взрослых. Процесс формирования антигенов А и В, как показали исследования, начинается позднее образования антигенов М и N. В то время как у 7—8 недельных зародышей антигены М и N обнаруживаются, групповые антигены А и В еще отсутствуют и начинают появляться к концу 3-го месяца внутриутробной жизни.

Много внимания Г. П. Трибулев уделил изучению физико-химических свойств и природы антигенов М и N, что прежде всего диктовалось запросами судебной медицины. (В течение ряда лет Г. П. Трибулев работал в качестве научного сотрудника лаборатории по получению и стандартизации специфических сывороток в Центральном научно-исследовательском институте судебной медицины в Москве.) Проведенные исследования показали, что антигены М и N крови, устойчивые к высокой (100—120° С) и низкой (—10—22° С) температуре, способны противостоять последовательному воздействию на них замораживания и оттаивания, хорошо сохраняются в лизированной крови. Высушивание крови в пределах от 15 дней до 10 месяцев приводит к некоторому разрушению содержащихся в ней антигенов М и N. Эти факты имели значение для судебно-медицинской экспертизы.

Проведенное Г. П. Трибулевым сравнительное изучение свойств антигенов системы АВ0 и MN показало существенные различия между ними. В то время как антигены А и В представлялись устойчивыми к действию этилового алкоголя и ацетона, антигены М и N под действием этих агентов переходили в неактивное состояние. Общим для антигенов этих обеих систем свойством является их устойчивость к действию эфира и хлороформа и нерастворимость в них, а также в этиловом алкоголе и ацетоне. Эти свойства групповых антигенов систем АВ0 и MN позволили исключить липоидную природу этих антигенов и обратить внимание на полисахариды, как возможный носитель групповой специфичности. Однако химические доказательства роли углеводного компонента в структуре детерминант антигенов АВ и MN были представлены значительно позднее. Kabat и его сотрудники (1956), Morgan a. Watkins (1960) показали, что сахара входят в структуры детерминант антигенов А, В, H(0) и Le^a. Hohorst (1954) первый представил доказательства в пользу углеводной природы антигенов М и N.

Известны работы Г. П. Трибулева по изучению антигенных свойств перевиваемых опухолевых клеток человека, а также исследования

антигенной специфичности субклеточных структур. Г. П. Трибулев был блестящим методистом, большим мастером постановки опытов.

Помимо упомянутого выше метода блокады побочных рецепторов клетки, им разработан метод одномоментного обнаружения антигенов А, В, М и N в одних и тех же объектах (1949), что представляет несомненный интерес для судебных медиков, вынужденных иногда иметь дело с малым количеством испытуемого материала. Известен предложенный Г. П. Трибулевым метод иммунологического очищения клеток культуры тканей от сывороточного компонента питательной среды.

Многие из установленных Г. П. Трибулевым фактов не потеряли своего значения и в настоящее время они служат отправным пунктом для новых исследований антигенной структуры клеток, тканей и органов человека в норме и патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капичников И. М., Г. П. Трибулев и Н. И. Скуратова. — *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, 1962, № 9, 104.
2. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. — *ЖМЭИ*, 1937, 18, 270.
3. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. — *ЖМЭИ*, 1938, 21, 118.
4. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. — *ЖМЭИ*, 1939, № 9—10, 128.
5. Трибулев Г. П. — *ЖМЭИ*, 1944, № 11, 49.
6. Трибулев Г. П. — *ЖМЭИ*, 1949, № 6, 42.
7. Трибулев Г. П. — *ЖМЭИ*, 1949, № 6, 46.
8. Трибулев Г. П. — *Бюлл. экспер. биол. и мед.* 1949, № 11, 377.
9. Трибулев Г. П., П. Н. Косяков. — *ЖМЭИ*, 1938, 21, 105.
10. Трибулев Г. П., И. И. Подоплелов. — *Бюлл. экспер. биол. и мед.* 1964, № 6, 73.
11. Трибулев Г. П., И. И. Подоплелов. — *Бюлл. экспер. биол. и мед.* 1964, № 11, 125.
12. Трибулев Г. П., И. И. Подоплелов, Р. Попиванов и В. Х. Вълчанов. — *Экспер. мед. и морфол.* 1965, 4, 157.
13. Трибулев Г. П., И. И. Подоплелов. — Труды международного симпозиума по иммунологии сперматозоидов и оплодотворения. Варна, 1967.

ANTIGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN CELLS, TISSUES AND ORGANS UNDER NORMAL AND PATHOLOGIC CONDITIONS AS ELUCIDATED IN THE WORKS OF G. P. TRIBULEV

P. N. Kosjakov

Section of Immunology, D. I. Ivanovsky Institute of Virology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

This paper presents data indicating the theoretical and practical importance of G. P. Tribulev's research work on the immunology of human cells, tissues and organs under normal and pathological conditions. The role of these investigations and of Tribulev's methods of tissue-immunological analysis, in particular, has been followed up in the successive research of other authors in this field.

НАУЧНОЕ НАСЛЕДИЕ Г. П. ТРИБУЛЕВА И РАЗВИТИЕ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ СЕРОЛОГИИ

М. И. ПОТАПОВ

Научно-исследовательский институт судебной медицины Министерства здравоохранения СССР, Москва

Основываясь на положительных результатах своих предыдущих опытов, показавших возможность последовательного обнаружения в одних и тех же объектах исследования групповых антигенов А, В, М, N, в 1939 г. Г. П. Трибулев (1) разработал метод одновременного обнаружения этих антигенов. Этот метод состоял из 3 фаз. В первой фазе устранялось неспецифическое влияние объекта исследования на групповые сыворотки путем добавления к объекту кроличьих сывороток, преципитирующих белки крови барана и человека, и кроличьих сывороток анти-М и анти-N (порознь к одной из 2 частей объекта). После удаления гетерогенных сывороток, во второй фазе, к одной части объекта добавляется смесь сывороток анти-В и анти-N, к другой части объекта — смесь сывороток анти-А и анти-М с титром 1 : 8—1 : 10. В третьей фазе определялась степень специфического связывания антител объектом исследования путем параллельного титрования первой смеси сывороток эритроцитами группы ВМ и АN, а второй смеси сывороток — эритроцитами группы АN и ВМ. Г. П. Трибулев показал применимость метода для исследования жидкой, высушенной и вареной крови человека, отметив его судебно-медицинское значение.

Введение в практику предложенного метода представлялось перспективным (2), поскольку использование его позволило бы экономить объект судебно-медицинской экспертизы (пятна или корочки крови) и достигнуть значительного сокращения срока исследования. Однако на пути реализации метода Г. П. Трибулева существовало препятствие, которое необходимо было преодолеть: смешивание сывороток, активных к антигенам разных изосерологических систем, естественно, снижало их титр приблизительно в 2 раза, что приводило к нерациональной трате сывороток и не всегда позволяло использовать их в нужном титре.

Задача изготовления поливалентных сывороток была успешно решена сотрудником сывороточного отдела Научно-исследовательского института судебной медицины (Москва) М. Н. Резниковой (3, 4).

Эритроцитами групп АМ, АN, ВМ, ВN иммунизировали 100 кроликов. Для удаления побочных антител исходные иммунные сыворотки подвергали дробной абсорбции эритроцитами, имевшими противоположную групповую характеристику. Например, после иммунизации эритроцитами группы АМ сыворотку абсорбировали эритроцитами группы ВN. Если титр агглютинина анти-А намного превышал титр агглютинина анти-М (анти-N), последующую кратковременную абсорбцию осуществляли эритроцитами группы АN (АМ). Агглютинин анти-В в аналогичных случаях абсорбировали активированным углем. Поливалентные сыворотки удалось получить от 13 кроликов: 6 анти-ВМ, 3 анти-ВN, 2 анти-АМ, 2 анти-АN. Все сыворотки в течение 3 месяцев сохранили свои серологические свойства.

М. Н. Резникова, применяя изготовленные ею сыворотки, установила (3), что они позволяют одновременно определять групповую принадлежность высохшей крови в одних и тех же объектах исследования. Диагностические свойства сывороток были выражены в равной мере по отношению к пятнам крови, давностью от нескольких дней до 2 месяцев. Разные серии сывороток с одинаковой серологической активностью по отношению к жидкой крови обладали различным авидитетом по отношению к пятнам крови.

Таким образом, блестящая идея Г. П. Трибулева нашла свою успешную реализацию в судебно-медицинской серологии.

Естественно, поливалентные групповые сыворотки, как и все остальные сыворотки для судебно-медицинских целей, перед экспертным использованием необходимо проверять в отношении их авидитета к образцам пятен крови подозреваемых, потерпевших и обвиняемых (2).

М. А. Бронникова (2), рассмотрев вопрос экспертного применения по методу Г. П. Трибулева поливалентных групповых сывороток, изготовленных М. Н. Резниковой, усмотрела следующие возможные затруднения: 1. Обычно сыворотки анти-А и анти-В изготавливаются с оптимальным титром 1 : 32, а сыворотки анти-М и анти-N — с титром 1 : 8. При подозрении на присутствие в пятне крови слабо выраженных антигенов А и В соответствующие агглютинины в реакции абсорбции должны быть использованы в титре 1 : 16. Разведение поливалентных сывороток одновременно снизит титр и агглютининов анти-М и анти-N. 2. Обоснованно предполагать, что в какой-либо поливалентной сыворотке антитело анти-А или анти-В будет иметь высокую степень авидности к антигенам исследуемого образца крови, а антитело анти-М или анти-N, напротив, низкую степень авидности. В равной мере может встретиться противоположное сочетание авидных и неавидных антител. Однако эти затруднения, как правильно отметила М. А. Бронникова, «нельзя считать неустранимыми, причем преодоление их относится главным образом к изготовлению, а не к практическому применению сывороток».

Г. П. Трибулев внес весомый вклад в методический арсенал серологии и иммунологии, в частности, судебно-медицинской серологии.

Можно обоснованно полагать, что идея Г. П. Трибулева о возможности анализа антигенной дифференцировки объекта методом одновременного выявления нескольких антигенов далеко не исчерпана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трибулев Г. П. Одномоментное обнаружение А, В, М и N антигенов методом абсорбции антител в одних и тех же объектах исследования. В кн.: Труды НИИ судебной медицины, М., Медгиз, 1949, 146—151.
2. Бронникова М. А. Новые научные данные в области судебно-медицинского исследования вещественных доказательств. — *Суд. мед. эксперт.*, 1958, 1, № 1, 20—25.
3. Резникова М. Н. Методика изготовления поливалентных группотиповых сывороток и возможность применения их в судебно-медицинской практике. В кн.: Материалы III Всесоюзного совещания суд.-мед. экспертов. Рига, 1957, 106—107.
4. Резникова М. Н. — К методике изготовления группо-типовых сывороток. В кн.: Вопросы судебной медицины, М., Медгиз, 1959, стр. 172—177.

THE SCIENTIFIC HERITAGE OF G. P. TRIBULEV AND THE DEVELOPMENT OF FORENSIC-MEDICAL SEROLOGY

M. I. Potapov

Research Institute of Forensic Medicine, Moscow, USSR

SUMMARY

The method for the simultaneous detection of A, B, M, N group antigens developed in 1939 by G. P. Tribulev was successfully introduced in forensic-medical practice for the production special polyvalent sera.

ИДЕИ Г. П. ТРИБУЛЕВА И РАЗВИТИЕ ИХ В СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ

А. К. ТУМАНОВ

Научно-исследовательский институт судебной медицины МЗ СССР, Москва

Григорий Поликарпович Трибулев, являясь крупным иммунологом, многое сделал для развития судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. Многие его работы прямо или косвенно касались ряда разделов судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств.

В 1937 году совместно с П. Н. Косяковым Г. П. Трибулев разрабатывает методику, обеспечивающую возможность выявления факторов М и N в органах человека. Ими была предложена оригинальная методика, состоящая из трех фаз, которая обеспечивала возможность выявления в органах антигенов М и N. Оригинально поставленный опыт в отличие от предыдущих исследований, где неспецифические явления мешали выявлению этих антигенов, позволил авторам получить четкие результаты.

В результате проделанной работы авторы первые в мировой литературе доказали, что клетки органов человека обладают идентичной с эритроцитами биологической дифференцировкой в отношении М и N антигенов.

Они показывают также, что количественное содержание антигенов М и N в различных органах и тканях человека неодинаково. Большое количество антигенов находится в эритроцитах и несколько меньше — в клетках печени и почек, и мало их содержится в клетках мышечной ткани и мозга.

Следует отметить, что типовая дифференцировка органов и тканей была обнаружена при помощи разработанного Г. П. Трибулевым и П. Н. Косяковым метода элективной абсорбции. Данный метод позволяет наиболее полно исключить неспецифическое влияние побочных рецепторов клетки на обнаружение М и N антигенов.

Это достигается путем предварительного, до специфической фазы абсорбции, насыщения исследуемых органов человека гетерогенными видовыми и типовыми анти-М и анти-N антителами.

Авторы также отмечают, что разработанный ими метод, помимо теоретического значения как метод анализа рецепторов, имеет важное судебно-медицинское значение, так как он открывает возможность исследовать кровяные пятна и органы человека с целью установления их типовой принадлежности. И действительно, метод, разработанный Г. П. Трибулевым и П. Н. Косяковым, получил широкое применение в судебно-медицинской практике исследования вещественных доказательств в целях установления антигенов М и N в пятнах крови, а также в органах.

В 1939 году Г. П. Трибулев совместно с П. Н. Косяковым опубликовал работу «М и N антигены человека в процессе эмбриогенеза», где, применяя разработанный ранее ими метод выявления антигенов М и N в органах и тканях, установили, что групповая дифференцировка человека начинается у 7—8-недельного зародыша формированием М- и N- антигенов.

Полученные авторами данные имели важное практическое значение в судебной медицине в тех случаях, когда возникала необходимость установления типового дифференцирования зародышей человека в судебно-медицинских целях.

Г. П. Трибулев неоднократно обращался к теме исследования влияния различных внешних факторов на антигены человека. Установив относительную термостабильность антигенов крови, он предложил методику фиксации образцов крови в случаях необходимости их пересылки для судебно-медицинских целей. Это предложение сводилось к фиксации крови кипячением.

Проделанные им исследования показали, с одной стороны, что в прокипяченной крови удается устанавливать беспрепятственно групповые и типовые антигены, а, с другой стороны, кровь в таком состоянии может длительно сохраняться.

В ряде работ, написанных совместно с П. Н. Косяковым, Г. П. Трибулев занимался изучением химической природы антигенов А, В, М и N, где особенно большое внимание уделялось вопросу о растворимости указанных антигенов в различных жидкостях.

Г. П. Трибулевым был разработан метод последовательного обнаружения групповых и типовых антигенов в одних и тех же объектах исследования. По этому предложению в эритроцитах или тканях человека сначала устанавливалась их типовая дифференцировка, а после отмывания объектов физиологическим раствором в них же устанавливались антигены А и В. Это предложение имеет важное значение для судебно-медицинского исследования вещественных доказательств. Оно позволяет эксперту в небольших пятнах крови на вещественных доказательствах последовательно определять группу и тип крови.

Эта идея Г. П. Трибулева легла в основу разработки дальнейших возможностей последовательного определения антигенов различных систем в одной и той же порции исследуемого объекта.

В 1949 году Г. П. Трибулев предложил метод одномоментного обнаружения антигенов А, В, М и N в одних и тех же объектах исследования. Метод обеспечивает при применении соответствующих реаген-

тов установление одновременно в пятнах крови, а также органах человека их групповой и типовой дифференциации. При этом, метод позволяет произвести исследования в значительно более короткие сроки, а также с меньшей затратой труда, чем при методе разновременного исследования упомянутых антигенов. Метод одномоментного обнаружения антигенов А, В, М и N в одних и тех же объектах имеет не только большое теоретическое значение, но он получил и практическое применение в судебной медицине.

Все сказанное свидетельствует о том, что выдвинутые Г. П. Трибулевым идеи, а также разработанные им методы и принципы исследования антигенов как в органах, так и в пятнах крови имели весьма важное значение в развитии судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. Группоспецифическая дифференцировка органов человека. — *ЖМЭИ*, XVIII, 2, 1937, 270.
2. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. М и N антигены человека в процессе эмбриогенеза. — *Бюлл. вопр. суд. мед. погр. обл.* № 2—3, 1939, 39.
3. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. Влияние температуры и высушивания на М и N факторы крови человека. — *ЖМЭИ* XXI, 4(10), 1938, 117.
4. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. К вопросу о химической природе А, В, М и N антигенов человека. — *Бюлл. вопр. суд. мед. погр. обл.*, № 1, 1940, 24.
5. Трибулев Г. П. Одномоментное обнаружение А, В, М и N антигенов методом абсорбции антител в водных и тех же объектах исследования. — *Тр. Гос. научно-исследоват. ин-та судебной медицины*, 1949, 146.

G. P. TRIBULEV'S CONCEPTS AND THEIR DEVELOPMENT AND APPLICATION IN THE ASSESSMENT OF MATERIAL EVIDENCES IN FORENSIC MEDICINE

A. K. Toumanov

Research Institute of Forensic Medicine, Moscow, USSR

SUMMARY

Grigori Polikarpovitch Tribulev contributed greatly to the forensic-medical assessment of material evidences. His concepts, as well as his methods of investigation enriched considerably this branch of forensic medicine.

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОГО СОСТАВА
СОМАТИЧЕСКИХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК
И ПРОБЛЕМЫ ИММУНОГЕНЕТИКИ

АНАЛИЗ АНТИГЕННОГО СОСТАВА КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ВНЕ ОРГАНИЗМА

Г. П. ТРИБУЛЕВ, И. И. ПОДОПЛЕЛОВ, Н. И. ШАРЫЙ, Г. В. КРЮКОВА, В. Т. ТИМОФЕЕВ, Ю. Т. АЛЕКСАНИЯН, Ю. В. ЗЫКОВ, Ю. Н. СУХОВ

Группа иммуногенетики Научно-исследовательской Лаборатории экспериментальной иммунобиологии АМН СССР, Москва, СССР

Проблема изучения антигенной структуры клеток человека, выращиваемых в однослойных культурах, имеет не только теоретический интерес, но и важное практическое значение для онкологии, эмбриологии, иммуногенетики, трансплантации органов и тканей и других дисциплин.

Настоящая работа посвящена сравнительному изучению антигенного состава клеток перевиваемых и первичных культур человека, а также гомологичных тканей и сыворотки человека. Основное внимание при этом было уделено исследованию вопросов:

- 1) какие из антигенов исходных гомологичных тканей человека сохраняются в первичных и перевиваемых культурах клеток;
- 2) какие из исходных антигенов утрачиваются и
- 3) какие антигены в клетках культур появляются вновь.

В связи с тем, что пределы чувствительности каждого из методов ограничены, в наших экспериментах был использован комплекс иммунологических методик. Антисыворотки для проведения реакции связывания комплемента (РСК), клеточной агглютинации (РА) и гемагглютинации (РГА) получали на кроликах и лошади по методу «иммунологического очищения», который был разработан Г. П. Трибулевым и И. П. Подоплеловым в 1964 году (1). Клетки, используемые в качестве антигенного материала в реакции анафилаксии с десенсибилизацией (РАД), предварительно выращивали на среде с сывороткой морских свинок.

Результаты РСК с применением разнообразных абсорбированных и неабсорбированных антисывороток (таблица 1) показали, что линии клеток человека имели большое антигенное сходство. Выраженных антигенных различий между линиями клеток человека ракового (HeLa, CaVe) и нормального (Tg₃₃, 580, A-1) происхождения при этом не наблюдалось.

Результаты реакции связывания комплекента

Антисыворотки	Антигены										
	HeLa	Tg ₃₃	CaVe	580	630	A-1	ПКЭЧ	PMЧ	HMЧ	ТЭЧ	PPLO
Анти- HeLa	1/1280*	1/640	1/320	1/160	1/320	1/320	1/80	1/40	1/40	—	1/80
Анти- HeLa, абсорбированная Tg ₃₃	1/20	0	—	—	—	—	0	0	0	—	0
Анти- HeLa, абсорбированная PPLO	1/320	1/160	—	—	—	—	1/40	1/40	1/40	—	0
Анти- HeLa, абсорбированная HMЧ	1/160	1/160	—	—	—	—	0	0	0	—	0
Анти- PMЧ	1/40	—	1/40	—	—	—	1/40	1/640	1/80	1/160	—
Анти- PMЧ, абсорбированная HMЧ	0	—	0	—	—	—	0	1/80	0	0	—
Анти- CaVe	1/320	—	1/640	1/320	—	1/640	—	1/40	1/40	—	—
Анти- CaVe, абсорбированная 580	0	—	1/40	0	—	—	—	—	—	—	—

Обозначения:

ПКЭЧ — первичная культура клеток эмбриона человека

ТЭЧ — ткань эмбриона человека

PMЧ — рак матки человека

HMЧ — нормальная матка человека

PPLO — микоплазмы, выделенные из клеток HeLa

(0) — реакция отрицательная

(-) — реакцию не ставили

*) цифрами указаны максимальные средние титры реакций.

Однако антигенный состав длительно культивируемых клеток человека резко отличался от состава антигенов клеток первичных культур эмбриона человека (ПКЭЧ), тканей эмбриона человека (ТЭЧ), нормальных и раковых тканей матки человека (НМЧ, РМЧ), а также антигенов микоплазмы PPLO, полученных из культур клеток линии HeLa.

После абсорбции анти-HeLa сыворотки антигенами PPLO, как показано на той же таблице 1, она продолжала реагировать в достаточно высоком титре ($1/320$) с клетками HeLa и Tg₃₃, что свидетельствовало о наличии антигенного сходства между клеточными линиями человека, не связанного с заражением клеток HeLa микоплазмами. Соответственно, опыты абсорбции анти-HeLa сыворотки клетками Tg₃₃, а анти-CaVe сыворотки клетками 580, показали, что наряду с антигенной общностью каждая линия клеток обладала также собственной антигенной («линейной») специфичностью. При абсорбции анти-HeLa и анти-РМЧ сывороток гомологичной нормальной тканью (НМЧ) было выявлено существенное отличие антигенного состава клеточных линий от их гомологичных тканей, что говорило об утрате линиями клеток некоторых исходных антигенных свойств.

В РА и РГА анти-HeLa сыворотка реагировала с клетками культур и эритроцитами человека в следующих титрах: с HeLa — $1/1024$; CaVe — $1/512$; А-1 — $1/128$; 580 — $1/256$; L — $1/16$; с эритроцитами человека 0, А, В и АВ групп соответственно — $1/512$; $1/256$; $1/128$; $1/64$; с эритроцитами быка, барана и кролика — от $1/4$ до $1/16$. Нормальная сыворотка лошади, кролика и быка агглютинировала упомянутые клетки в титре не более $1/2$ — $1/4$.

Таким образом, данные РА и РГА подтверждают большое антигенное сходство линий клеток и эритроцитов человека, выявляя чёткое антигенное отличие линий клеток человека от линий мышечных клеток и эритроцитов различных видов животных.*

Наличие изоантигенов системы АВ0 в клетках первичных культур (ПКЭЧ) и длительно культивируемых линиях клеток (HeLa, CaVe, 580, А-1) изучали с помощью реакций: специфической абсорбции, смешанной агглютинации в различных модификациях (2, 6, 7) и последовательного истощения антител. С помощью специфической абсорбции антител неразрушенными клетками было установлено, что уже после 6—7 пассажа поверхностные изоантигены (А, В, 0) в первичных культурах клеток не выявлялись, а в линиях клеток этим же методом поверхностные изоантигены не обнаруживали совсем. После постановки подобных же опытов с предварительным разрушением клеток путем многократного замораживания и оттаивания групповые антигены удалось обнаружить как в первичных культурах клеток, так и в клеточных линиях. Так, антиген 0 был выявлен в клеточных линиях — HeLa и А-1, антиген В — в CaVe, 580 и крысиных фибробластах (линия РПК), А и В — в клетках линии Liver. Следует отметить, что таким же

* Опыты РА с антисыворотками против клеток линий А-1, 580, СК и CaVe дали аналогичные результаты.

Таблица 2

Результаты реакции анафилаксии с десенсибилизацией

Сенсибилизация антигенами	Десенсибилизация*		Разрешающая инъекция	
	антигены	реакция	антигены	реакция
1	2	3	4	5
HeLa	A-1	+++ (1) ++ (2) + (2)	HeLa	++ (2) + (3)
HeLa	580	+++ (1) ++ (3)	HeLa	+ (3) ± (1)
HeLa	CaVe	++ (2) + (3)	HeLa	+ (5)
A-1	HeLa	++ (3) + (1)	A-1	++ (1) + (3)
ПКЭЧ	A-1	+ (4) ++ (6)	ПКЭЧ	+++ (2) ++ (5) + (3)
CaVe (м. св.)	ПКЭЧ	++ (3) + (6)	CaVe	+++ (1) ++ (6) + (2)
СЧ	CaVe (м. св.)	++ (3) + (2)	СЧ	++++ (3) +++ (2)
НМЧ	СЧ	++++ (1) +++ (4)	HeLa	++ (1) + (4)
580** (м. св.)	ПКЭЧ	+++ (1) ++ (3) + (2)	580	++ (3) + (3)
580** (м. св.)	PMЧ	++ (4) + (2)	HeLa	++ (1) + (4) + (1)
HeLa (м. св.)	СЧ	++ (2) + (4)	PMЧ	++ (1) + (3) - (2)
PMЧ	HeLa (м. св.)	++ (1) + (3)	PMЧ	++ (1) + (2) - (2)
PMЧ	HeLa (м. св.)	++ (2) + (2)	НМЧ	++ (1) + (2)

Продолжение

1	2	3	4	5
CaVe	СЧ	++(3) +(1) -(4)	РЖЧ	+++ (1) ++ (3) + (4)
РЖЧ	CaVe	++(2) +(2) -(1)	РЖЧ	++ (3) + (2)

Обозначения: * Десенсибилизацию проводили с проверкой на полноту.

** Культура клеток, очищенная от PPLO.

+++ — реакция сильная

++ — реакция умеренная

+ — реакция слабая

(—) — реакция отрицательная

(I) — в скобках указано количество морских свинок

ПКЭЧ — первичная культура эмбриона человека

СЧ — сыворотка человека

НМЧ — нормальная матка человека

РМЧ — рак матки человека

РЖЧ — рак желудка человека

м. св. — культуры, выращенные на среде с сывороткой морских свинок.

способом вышеупомянутые антигены А, В и О удалось выявить и в субклеточных фракциях митохондрий и микросом. Аналогичные результаты были получены также в реакциях дробного истощения и смешанной агглютинации. С помощью реакции смешанной агглютинации дополнительно был выявлен типоспецифический антиген N в клетках линии HeLa.

Результаты, полученные с помощью анафилаксии с десенсибилизацией на морских свинках (табл. 2), свидетельствовали о выраженной антигенной общности между клеточными линиями человека (HeLa, A-1, 580, CaVe) при слабом антигенном различии между ними. Антигенная структура линий клеток человека (580, HeLa, A-1, CaVe), с одной стороны, и первичных культур эмбриональных клеток человека (ПКЭЧ), гомологичных тканей (НМЧ, РМЧ и РЖЧ) и сыворотки человека — с другой, наоборот, характеризовались слабым или умеренным сходством и сильными различиями. Эти результаты полностью подтвердили данные, полученные в предыдущих реакциях.

Сопоставление полученных результатов с данными литературы (3, 4, 5 и др.) позволяют нам отметить особенности изменчивости антигенов первичных и перевиваемых культур клеток. В первичных культурах клеток наблюдалось быстрое уменьшение и «утрата» некоторых поверхностных антигенов, включая изоантигены типа А, В, О, что сочеталось с падением пролиферативной активности клеток. В линиях клеток человека нормального и злокачественного происхождения стойко сохранялись видоспецифические (в основном нерастворимые и поверхностные) антигены, а также антигены системы АВО, но в от-

лично от первичных культур их количественное уменьшение на поверхности клеток не сопровождалось уменьшением пролиферативной активности или усилением дегенерации клеток. Кроме того, в длительно культивируемых клетках вне организма были выявлены новые специфические антигены, названные нами «биотрансаантигенами». Они оказались сходными у разных линий клеток человека, но отсутствовали в гомологичных тканях и сыворотке человека. Наличие этих антигенов не было обусловлено контаминацией микоплазмами PPL0 или какой-либо одной из линий клеток, о чем свидетельствовали специальные опыты. Эти данные и позволили нам связать наличие этих новых антигенов с процессом биологической трансформации клеток в культуре.

Таким образом, из вышеприведенных данных следует, что клеточные линии, наряду с большой антигенной общностью, имеют свою индивидуальную антигенную специфичность. Во всех клеточных линиях нормального и злокачественного происхождения не удалось выявить органоспецифических антигенов, а также некоторых тканевых антигенов, присущих гомологичным нормальным и раковым тканям человека. Однако, вопрос о том, какие тканевые антигены утрачены и имеются ли какие-либо опухолевые антигены в этих клеточных линиях, остается открытым и требует дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трибулев Г. П., И. И. Подоплелов. — *Бюлл. exper. биол. и мед.*, 1964, № 11, 125.
2. Coombs R. — *Cancer Res.*, 1961, 21, 9, 1198—1202.
3. Coombs R. et al. — *J. Immunol.*, 1965, 8, 2, 182—192.
4. Cherney J., Corriel L. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1964, 33, 2, 285—301.
5. Groos W. — *Z. Naturforsch.*, 1964, 196, 5, 422—429.
6. Höglman C. — *Vox. Sang.*, 1959, 4, 1, 12—20.
7. Milgrom F. et al. — *J. Immunol.*, 1964, 92, 1, 8—16.

ANALYSIS OF THE ANTIGENIC COMPOSITION OF HUMAN CELLS, CULTIVATED OUTSIDE THE ORGANISM

G. P. Tribulev, I. I. Podoplelov, N. I. Sharey, G. V. Kryukova, V. T. Timofeyev, U. T. Alexanyan, U. V. Zhoukov, U. N. Soukhov

Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The antigenic composition of human monolayer culture cells has been studied by various immunologic techniques (complement fixation test, agglutination test, absorption, anaphylaxy with desensitization). It was established, that the primary cell culture preserves its antigenic composition. A decreased expression of the surface ABO isoantigens has been observed only after the period of decline of the proliferative activity of the cell culture. The lines of normal (A-1, 580, Tg₃₃) and malignant (CaVe, HeLa) cells as a rule preserve their species-specific and group (ABO-system) antigens; however, the organ-specific and some of the tissue-specific antigens, inherent to human homologous tissues, could not be discovered in these cells.

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

И. И. ПОДОПЛЕЛОВ, Н. И. ШАРЫЙ, В. М. КОВАЛЕВА,
В. И. ПОЗДНЯКОВ, Г. В. КРЮКОВА

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, 2-й Московский медицинский институт
им. Н. И. Пирогова, Москва

В клетках человека, длительно культивируемых вне организма, наблюдается стойкое сохранение их основных признаков. Однако при воздействии некоторых факторов окружающей среды зачастую наблюдается также изменчивость признаков отдельных клеток, что приводит к гетерогенности клеточного состава не только в клеточных популяциях линий, но и в клонированных линиях. Эта гетерогенность может обнаруживаться путем разделения клеточных культур на клоны и последующего изучения их морфологии, скорости деления клеток, чувствительности к физическим и другим факторам и т. д.

Целью нашей работы являлось изучение иммунобиологических свойств клонов, полученных из клеточных линий человека (CaVe, фибробласты 630 и HeLa).

Для получения клонов использовали общеизвестные методы Пака и У Миня, модифицированные в нашей лаборатории.

При сравнительном анализе клеток исходной линии CaVe и ее клона CaVe К-17, полученного по методу У Миня, были выявлены некоторые различия между ними. В частности, характерным было то, что при выращивании исходной культуры на питательной среде с кроличьей сывороткой ее клетки образовывали своеобразную рыхлую сеть, а колонии клона, напротив, состояли из компактно расположенных эпителиоподобных клеток. Сравнение скорости размножения клеток показало снижение коэффициента пролиферации у клона CaVe К-17 по отношению к исходной линии CaVe. Заметные различия в морфологии и скорости размножения клеток были отмечены и при сравнительном изучении линии фибробластов 630 и ее клона 630 К-29.

Оба вышеупомянутых клона (CaVe К-17 и 630 К-29) в течение 6 месяцев их изучения стойко сохраняли свои особенности.

Из общего числа клонов, полученных из линии клеток HeLa, первоначально был использован клон HeLa К-5. Иммунобиологический анализ показал, что клон HeLa К-5, в отличие от полиморфной попу-

ляции исходной линии HeLa, состоял из однородных эпителиоподобных клеток, но не отличался по интенсивности размножения и антигенному составу (таблица 1). Через некоторый период времени в клеточном составе клона HeLa K-5 было отмечено появление морфологической неоднородности. В связи с этим было проведено субклонирование этого клона и получены субклоны HeLa K₅-1, HeLa K₅-3, HeLa K₅-8. Четкое отличие от исходного клона было выявлено у субклона HeLa K₅-1, имевшего отросчатого вида клетки и двухкратное снижение интенсивности размножения клеток. Однако антигенных отличий между ними не было отмечено. Напротив, в клетках субклона HeLa K₅-3, не имевшего заметных морфологических и биологических отличий от исходного клона, с помощью реакции анафилаксии с десенсибилизацией было показано выраженное антигенное отличие от родительского клона. Примечательно, что на 3—5 месяце пассирования клон HeLa K-5 и его субклоны по своим признакам стали вновь приближаться к исходной линии.

Наиболее стабильные клоны были получены при клональном анализе линии клеток HeLa после использования двойного клонирования по Паку и У Миню. В отличие от исходной линии HeLa, обладавшей выраженным клеточным полиморфизмом, полученные клоны обладали однородным клеточным составом с резко контрастными морфологическими признаками. Так, клон HeLa K-3 состоял из колоний, содержащих эпителиоподобные клетки; клон HeLa K-41 был представлен характерными узорчатыми колониями, состоявшими из фибробластоподобных клеток. При иммунологическом изучении в реакции анафилаксии с десенсибилизацией было выявлено заметное отличие антигенных свойств клона HeLa K-3 от исходной линии. Антигенные свойства клона HeLa K-41 и исходной линии HeLa оказались сходными. Изучение изоантигенов в клетках клона HeLa K-41 и исходной культуры показало наличие в обеих культурах антигена 0. Наряду с этим, клоны HeLa K-3 и HeLa K-41 четко отличались по своей чувствительности к ультразвуку. Клетки клона HeLa K-3 оказались более устойчивыми к этому фактору, чем клетки клона HeLa K-41 и исходной линии. Общими признаками обеих клонов было компактное расположение клеток в колониях и пониженная интенсивность размножения. Указанные свойства клонов HeLa K-3 и HeLa K-41 сохранялись на протяжении ряда лет.

Таким образом, клональный анализ различных линий клеток человека (CaVe, 630, HeLa) подтвердил наличие гетерогенности в клеточном составе длительно культивируемых клеток. При этом в линиях и клонах, наряду с морфологическими и биологическими различиями, были выявлены также антигенные отличия, что несомненно повышает достоверность этого факта. Большая часть клонов, как правило, характеризовалась пониженным коэффициентом пролиферации по сравнению с исходной культурой. Это видимо указывает на более слабые адаптивные возможности однородного клеточного состава клонов. Степень стойкости сохранения признаков получаемых клонов, по нашему мнению, может быть связана как с методом клонирования,

Таблица 1

Результаты опытов анафилаксии с десенсибилизацией

Сенсибилизирующие антигены	Десенсибилизация		Разрешающая инъекция	
	антигены	реакция	антигены	реакция
HeLa	HeLa K-5	+++ (2) ++ (1) + (1)	HeLa	— (4)
HeLa K-5	HeLa K ₅ -3	+++ (1) ++ (3) + (1)	HeLa K-5	+(4) ± (1)
HeLa K-5	HeLa K ₅ -8	+++ (2) ++ (3)	HeLa K-5	± (1) — (4)
HeLa	HeLa K-3	+++ (1) ++ (4) + (1)	HeLa	++ (4) + (1) — (1)
HeLa	HeLa K-41	+++ (3) ++ (6) + (2)	HeLa	± (1) + (10)
HeLa K-3	HeLa	+++ (2) ++ (7) + (2)	HeLa K-3	— (11)
HeLa K-3	HeLa K-41	+++ (1) ++ (3) + (1)	HeLa K-3	— (5)
HeLa K-41	HeLa	+++ (1) ++ (3) + (1)	HeLa K-41	— (5)
HeLa K-41	HeLa K-3	+++ (1) ++ (6) + (2)	HeLa K-41	++ (4) + (4)

Обозначения: (1) В скобках число животных или указание на „очищение“ (морская свинка).

(2) (+++) — сильная реакция, (++) — умеренная, (+) — слабая, (±) — нечеткая реакция, (—) — отсутствие реакции.

так и с возможностью существования клоновых отличий типа мутаций и длительных модификаций.

IMMUNOBIOLOGICAL ANALYSIS OF CLONES, DERIVED FROM HUMAN CELL LINES

*I. I. Podoplelov, N. I. Sharey, V. M. Kovaleva,
V. I. Pozdnyakov, G. V. Kryukova*

Research Laboratory of Immunobiology USSR Academy of Medical Sciences,
and 2nd Moskow Medical Institute, Moscow, USSR

SUMMARY

The authors studied the immunobiologic properties of clones, derived by the two-fold cloning method of Pack et Minot. The analysis of the clones of different human cell lines (CaVe, 630 and HeLa) revealed heterogeneity in the cells which have been cultivated for a prolonged period. In addition biological and morphological, as well as antigenic differences were detected in these cell lines and in their clones. A characteristic feature was, in particular, the diminished reproduction potential of a large part of the clones. In the author's opinion this indicates the lower adaptive possibilities of the homogenous cultures in comparison with the heterogenous ones.

О ВОЗМОЖНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГАПЛОИДНОГО ГЕНОМА В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА

(иммунологический анализ)

Р. П. ПОПИВАНОВ, В. Х. ВЫЛЧАНОВ

Кафедра общей биологии Медицинской Академии, София; Лаборатория клеточной иммунологии Института зоологии Болг. АН, София (Болгария)

Систематическое изучение наследования ряда нормальных и патологических признаков у человека показало, что законы Менделя о расщеплении наследственных факторов и об их независимом распределении всецело относятся и к человеческим популяциям. Это значит, что при гаметогенезе у человека образуются сперматозоиды (соотв. яйцеклетки) с различным генотипом. Известное представление о степени этих различий в генотипах можно получить, опираясь на факт, что все 23 хромосомные пары у человека могут дать 2^{23} хромосомные комбинации, т. е. что в зависимости от хромосомной формулы сперматозоиды (соотв. яйцеклетки) можно распределить в 8 388 608 генотипов.

Генотипические различия в половых клетках одного и того же индивида доказываются в настоящее время косвенным способом — путем прослеживания закономерностей наследования признаков. Однако, теоретически и практически важно найти методы и пути непосредственного, прямого определения генотипа половых клеток и изолирования жизнеспособных половых клеток определенного генотипа. Именно в таких исследованиях сперматозоиды (по сравнению с яйцеклетками) оказались гораздо более благоприятными тест-объектами в связи с возможностью их получения в большом количестве вне организма, ввиду длительной их жизнеспособности даже в условиях консервирования, а также ввиду других их особенностей.

Опыты по идентификации генотипа сперматозоидов человека (естественно, идентификации только в отношении определенных наследственных факторов) и, особенно, опыты по изолированию сперматозоидов определенного генотипа немыслимы без использования подходящих маркеров — таких наследуемых качественных свойств (признаков) сперматозоидов, которые являются характерными и наличие которых можно относительно легко доказать с необходимой достоверностью. Учитывая, что таким требованиям отвечают некоторые нахо-

дящиеся в сперматозоидах групповые и типовые антигены, детерминированные аллельными генами в гемизиготном состоянии, в 1959 г. мы обратили основное внимание на изучение именно этих антигенов. Часть наших дальнейших исследований в области иммуногенетики сперматозоидов человека (которые в этой статье не рассматриваются) была проведена в тесном сотрудничестве с Институтом экспериментальной биологии, ныне Научно-исследовательской лабораторией экспериментальной иммунологии АМН СССР в Москве. Мы считаем своим приятным долгом отметить, что эти исследования были стимулированы высококомпетентным руководством и личным участием в них выдающегося советского иммунобиолога Григория Поликарповича Трибулева, светлой памяти которого посвящаются эти строки.

Иммунологическая идентификация и сепарация различных популяций сперматозоидов в эякулятах людей, гетерозиготных в отношении групповых антигенов

Наличие групповых антигенов А и В в сперматозоидах человека впервые обнаружили Landsteiner и Levine (1926), применяя тест торможения гемагглютинации, а затем Краинская-Игнатова (1939), Кучеренко (1934), Малигина (1949), Попиванов и сотр. (1960, 1964), Edwards и сотр. (1964), Трибулев и сотр. (1965), Boettcher (1965), Krieg (1967), Morgenstern (1968) и др. многократно подтверждали данный факт, используя эту или другие методики.

Что касается антигенов А и В в сперматозоидах людей с группой крови АВ, то изосерологические данные, согласующиеся с законом Менделя о расщеплении наследственных признаков, позволяют считать, что эти два антигена распределяются в отдельных сперматозоидах, а не присутствуют одновременно в одном и том же сперматозоиде. Как известно, если один из родителей имеет группу крови АВ, а другой — 0 группу, то их дети могут принадлежать только к группе А или к группе В, но никогда — к группе АВ или группе 0; с другой стороны, родитель с группой АВ не может иметь ребенка с группой крови 0 и, наоборот, родитель с группой 0 не может иметь ребенка с группой АВ.

Gullbring (1957), применяя смешанный клеточный антиглобулиновый тест Coombs и сотр. (1956) с человеческой анти-А и анти-В сывороткой, впервые установил, что эякулят лиц с группой АВ (с неспецифицированным секреторным состоянием) содержит сперматозоиды, несущие антиген А, и сперматозоиды с антигеном В. Автор получил положительную реакцию агглютинации между А-эритроцитами и половиной сперматозоидов в эякуляте человека с группой крови АВ. Эти сперматозоиды были предварительно инкубированы в смеси анти-А и анти-В сывороток с последующим многократным промыванием. Остальная половина сперматозоидов дала сильно положительную реакцию с В-эритроцитами и отрицательную с А-эритроцитами.

В наших исследованиях (Попиванов, Вылчанов, 1962, а, б), в ходе которых была осуществлена не только идентификация двух популяций сперматозоидов в эякуляте лиц с группой крови АВ (с неспеци-

финцированным секреторным состоянием), но и с е п а р а ц и я, разделение этих двух популяций, мы приступили к опытам не только из чисто теоретического интереса определения возможного функционирования генов в гаплоидном хромосомном наборе сперматозоидов, детерминирующих синтез групповых антигенов системы АВ0(H), но и в связи с большим практическим значением возможности сепарации сперматозоидов с определенным генотипом в эякуляте людей, гетерозиготных в отношении собственных антигенов групп крови. Например, если из спермы мужчины с группой АВ или Rh(+)
Rh(-) (в случае 0/A или Rh несовместимости с его женой) можно изолировать жизнеспособные В или Rh(-) сперматозоиды, то возможно избежать иммунологических конфликтов при антигенной несовместимости плода и матери путем осеменения ее сепарированными В или Rh(-) сперматозоидами несовместимого с ней по группе крови супруга.

Мы применяли прямую реакцию спермоагглютинации, преимущество которой состоит в том, что она дает возможность избежать наличия дополнительного компонента системы, т. е. эритроцитов. Так как нормальные анти-А и анти-В сыворотки не агглютинируют сперматозоиды человека, мы использовали гетероиммунную анти-А сперматозоидную сыворотку, полученную при иммунизации кроликов сперматозоидами донора группы крови А. Для получения моноспецифических антител анти-А свежую сыворотку кролика, иммунизированного сперматозоидами группы А, подвергали последовательной абсорбции сперматозоидами доноров групп В и 0.

В условиях описанной нами методики добавление моноспецифической анти-А сперматозоидной сыворотки к взвеси 4-кратно промытых АВ сперматозоидов (в пробирке) вызывает разделение АВ сперматозоидов на два слоя. Микроскопическое исследование проб из этих двух слоев показало, что верхний слой состоит из свободно плавающих сперматозоидов и незначительного числа мелких агглютинатов сперматозоидов, а нижний слой — из крупных агглютинатов и небольшого числа плавающих сперматозоидов. После однократного отдельного промывания сперматозоидов обоих слоев и их взаимодействия с кроличьей анти-А сперматозоидной сывороткой (на предметном стекле), во всех случаях наблюдали следующий результат: отрицательная или сомнительная реакция со сперматозоидами «верхнего» слоя (т. е. свободно плавающими сперматозоидами) и сильно положительная со сперматозоидами «нижнего» слоя (т. е. сперматозоидами крупных агглютинатов, которые были дезагрегированы до проведения теста на предметном стекле).

На основе этих результатов было сделано заключение, что сперматозоиды «верхнего» слоя, неагглютированные (в пробирке) анти-А сперматозоидной сывороткой, содержат антиген В, тогда как сперматозоиды «нижнего» слоя, агглютированные этой же сывороткой, содержат антиген А. Мы пришли к выводу, что сперматозоиды эякулята людей группы АВ являются смесью двух популяций: сперматозоидов А и сперматозоидов В в соотношении приблизительно 1 : 1.

Учитывая, что в крови спермодоноров группы АВ антигены А и В не находятся отдельно в разных эритроцитах, а присутствуют вместе в каждом эритроците, объяснение раздельного присутствия А и В антигенов в сперматозоидах можно дать, предполагая, что у лиц группы АВ во время мейозиса наступает расщепление наследственных признаков, причем таким образом, что антиген А попадает в одни сперматозоиды, а антиген В — в другие (Попиванов и Вылчанов, 1962).

Одновременно и независимо от нас Shahani и Southam (1962) при помощи флюоресцентной техники получили результаты, также подтверждающие наличие двух фенотипически различных популяций сперматозоидов в эякуляте людей с группой крови АВ (секреторы и несекреторы). Глобулиновые фракции человеческих анти-А и анти-В сывороток были конъюгированы соответственно с флюоресценци-изотиоцианатом, и с родамин-изотиоцианатом. Промытые взвеси АВ сперматозоидов окрашивали отдельно конъюгированными анти-А и анти-В сыворотками. При действии каждой из двух конъюгированных сывороток на пробы было установлено, что часть сперматозоидов (приблизительно половина) окрашена, а другая часть — неокрашена. Эти результаты были подтверждены авторами также и при помощи методики подавления гемагглютинации.

Очень важные результаты в поддержку вышензложенных данных по разграничению двух фенотипических классов сперматозоидов в эякуляте гетерозиготных лиц группы АВ были получены недавно в ходе исследований Fellous и Dausset (1970) на трансплантационных антигенах системы HL—А у человека. Используя сперматотоксический тест Hamerlynck и Rütke (1968) с типизирующими анти-Н-А сыворотками, авторы доказали наличие Н—А антигенов (HL—A1, 2, 5, 7, 8, 9, Da4 и Da17) на мембране сперматозоидов здоровых людей. На основании предыдущих данных (Kissmeyer—Nielsen и сотр., 1968; Dausset и сотр., 1969; Mickey и сотр., 1969) о том, что HL—А антигены контролируются аллельными генами, расположенными в двух близких локусах (в первом локусе — гены для HL—A1, 2, 3, 9, Da15 и Da17, а во втором — гены для HL—A5, 7, 8 и Da4), Fellous и Dausset установили, что одних спермодоноров можно считать гетерозиготными в отношении первого локуса, а других — в отношении второго.

Особенно интересным было установление того факта, что типизирующие моноспецифические сыворотки, соответствующие этим антигенам, индуцировали процесс л и з и р о в а н и я только у половины сперматозоидов в пробах этих гетерозиготных доноров. Процент лизированных сперматозоидов (при сперматоксическом тесте) не повышался при концентрировании соответствующих антисывороток. С другой стороны, в пробах спермы двух доноров, у которых семейный анамнез вскрыл гомозиготность по антигену HL—A2, анти-HL—A2 сыворотки индуцировали гораздо более высокую степень лизирования (лизирование 70—80% сперматозоидов пробы). В связи с этим Fellous и Dausset заключают, что указанные значительные различия цитотоксичности соответствующих анти-HL—А сывороток по отношению к сперматозоидам гомозиготных и гетерозиготных лиц «ясно подсказывают наличие двух различных популяций сперматозоидов, каждая

из которых носит на своей мембране антигены одного гаплотипа HL—А локусов». Эта интерпретация доказана другими опытами тех же авторов следующим образом: они обнаружили, что равные смеси антисывороток против антигенов, контролируемых генами в *cis*-конфигурации, не смогли лизировать более половины сперматозоидов в взвеси, тогда как смеси антисывороток против антигенов, контролируемых генами в аллельной или *trans*-конфигурации, индуцировали лизирование 67 и более процентов сперматозоидов в данной пробе. По Fellous и Dausset, все эти данные делают весьма вероятным предположение о том, что HL—А антигены на мембране сперматозоидов являются результатом функциональной активности гаплоидного генома; а это значит, что мембрана сперматозоидов кодируется в гаплоидном геноме.

Если принять предполагаемую гомологичность между HL—А локуса человека и H-2 локуса мыши, то данные Fellous и Dausset находятся в согласии с предыдущими данными Vojtiškova и сотр. (1969) и более поздними данными Goldberg и сотр. (1970). Последние, применяя различные методы, выявили наличие H-2 антигенов в сперматозоидах мыши. Важно отметить, что в опытах Goldberg и сотр., использующих сперматоксический тест, процент лизированных H-2 антисыворотками сперматозоидов обычно был выше (и реакция более интенсивной) в H-2 гомозиготах, чем в H-2 гетерозиготах. В последних своих исследованиях Vojtiškova и Rokorná (1972), доказывая наличие H-2 антигенов в диплоидных клетках — прекурсорах сперматозоидов (сперматогонии и первичные сперматоциты), обсуждают теоретически вероятные механизмы, при помощи которых «мембрана сперматозоида могла бы задержать — по крайней мере в известной степени — H-2 фенотип диплоидных клеток — прекурсоров»; эти авторы не указывают на наличие постсетрегационной активности генов в сперматозоидах мыши.

Оценка всех изложенных до сих пор экспериментальных находок зависит, однако, от выяснения некоторых связанных с ними вопросов, особенно — спорного вопроса о наличии групповых антигенов в сперматозоидах секреторов и несекреторов.

Данные о происхождении групповых антигенов в сперматозоидах человека

Из антигенов, содержащихся в сперматозоидах человека, подходящими для генетических исследований являются только лишь образованные в них, а не антигены, приобретенные путем адсорбции из биологических жидкостей, в которые попадают сперматозоиды — семенной плазмы и слизи шейки матки.

Решающим критерием происхождения групповых антигенов в сперматозоидах человека является факт, содержатся ли они или нет в семенных сперматозоидах несекреторов. Как известно, групповые антигены системы АВ0(Н) содержатся в семенной плазме секреторов, но не содержатся в семенной плазме несекреторов.

По исследованиям Edwards и сотр. (1964), использовавших реакцию смешанной агглютинации, А и В групповые изоантигены при-

сутствуют на мембране семенных сперматозоидов секреторов, но не присутствуют в сперматозоидах несекреторов. Несколько ранее, применяя иммунофлюоресцентную технику и кроличьи анти-А сыворотки высокого титра, Holboogow и сотр. (1960) не обнаружили специфического свечения сперматозоидов яичка у 4 взрослых лиц группы А и в срезах яичек у двух детей. На основании этих и собственных данных Edwards и сотр. (1964) полагали, что групповые антигены, устанавливаемые в сперматозоидах человека, не образуются в этих клетках, а в семенной плазме и прикрепляются (адсорбируются) вторично к сперматозоидам при контакте последних с плазмой; это происходит только у секреторов, в семенной плазме которых содержатся указанные групповые антигены. Такого же мнения придерживается и Boettcher (1965), который установил, что промытые сперматозоиды 0-несекреторов, инкубированные с семенной плазмой А₁-секретора, приобретают способность ингибировать анти-А сыворотку и экстракт семян *Ulex europaeae*, характеризующийся анти-Н активностью. Более поздние данные Edwards и сотр. (1967), Morgenstern (1968) и Rangnekar и Rao (1970) также показывают отсутствие А и В антигенов в сперматозоидах несекреторов.

Имеются, однако, и другие данные, согласно которым антигены А и В присутствуют не только в сперматозоидах секреторов, но и в сперматозоидах несекреторов. В ходе наших исследований (Попиванов, Штыркалев, Еврев и Ананиев, 1966), в которых нормальные анти-А и анти-В сыворотки абсорбировали семенными* сперматозоидами 30 несекреторов групп А, В и АВ, причем результатом было специфическое снижения уровня соответствующих антител или их полное насыщение (исчерпывание).

Наличие групповых антигенов в семенных сперматозоидах несекреторов А-, В- и АВ-групп было доказано и ранее посредством элюционной техники (Levine и Celano, 1961), иммунофлюоресценции (Shahani и Southam, 1962; Krieg, 1967; Askerman, 1967) и смешанного антиглобулинового теста (Pagish и сотр., 1967). По более поздним данным Askerman (1969) специфическая абсорбция антисыворотки (человеческой анти-А, соотв. анти-В) сперматозоидами осуществляется независимо от того, является ли донор спермы секретором АВН антигенов или нет. В этой связи важно отметить, что Edwards и сотр. (1964), доказывая наличие антигенов А и В только в сперматозоидах секреторов, сообщают в той же публикации, что они обнаружили наличие М, N и Tja антигенов (которые не содержатся в семенной плазме) не только в сперматозоидах секреторов, но и в сперматозоидах несекреторов групп А₁, А₂ и 0.

При сопоставлении всех этих противоречивых данных с данными Edwards и сотр. (1964) и нашими данными (Попиванов и сотр., 1967) о наличии антигенов групп крови в сперматозоидах эпидидимиса, становится ясным, что семенные сперматозоиды могут содержать: (1) только собственные групповые антигены, (2) только приобретенные

* Семенные сперматозоиды — из эякулята.

антигены или (3) одновременно и собственные и приобретенные антигены.

В своем докладе на Международном симпозиуме по иммунологии размножения в Женеве в 1968 г. (Popivanov и Vulchanov, 1969) мы сделали следующий вывод: если наличие приобретенных групповых антигенов на сперматозоидах несомненно, то наличие собственных АВ0(Н) антигенов в сперматозоидах все еще является спорным. Это, однако, не спор по вопросу о том, есть ли вообще групповые антигены в сперматозоидах, а скорее всего спор о наличии только антигенов А и В; даже авторы, которые отказались от утверждения о наличии антигенов системы АВ0 в сперматозоидах несекреторов, доказали присутствие на мембране сперматозоидов М, N и Tja антигенов — т. е. антигенов, не содержащихся в семенной плазме. Очевидно, что, если семенные сперматозоиды несекреторов содержат групповые антигены, то последние могут быть только их собственными, а не адсорбированными из семенной плазмы.

Несмотря на то, что этот факт не находится в прямой связи с вопросом происхождения групповых антигенов в сперматозоидах человека, интересно отметить, что присутствие трансплантационных антигенов в сперматозоидах не зависит от секреторного статуса. Так, в опытах Vojtiškova и сотр. (1969) H-2 антигены были обнаружены в сперматозоидах эпидидимиса, т. е., до того как они вошли в контакт с семенной плазмой; кроме того, растворимая форма трансплантационных антигенов, соответствующая растворимой форме у антигенов АВ0, не известна. Таким образом, трансплантационные антигены сперматозоидов являются их собственными, а не вторично приобретенными.

Можно ли допустить, что гены в гаплоидном наборе человеческих сперматозоидов активны?

До сих пор нам неизвестны прямые биохимические данные, свидетельствующие о постгрегационной генной активности в сперматозоидах. Некоторые экспериментальные находки даже дают основание ряду авторов полагать, что гены в гаплоидном наборе являются «немыми» или «спящими». Одним из самых веских аргументов в пользу этой концепции являются результаты Monesi (1964, 1965), на основании которых он делает вывод, что при сперматогенезе у мышей синтез РНК автосомами прекращается вскоре после второго мейотического деления и не восстанавливается после этого. Исходя из установленного Edwards и сотр. (1964) и Edwards (1965) отсутствия А и В антигенов в сперматозоидах несекреторов и учитывая противоречивые данные относительно значения АВ0 несовместимости для бесплодия человека, Boettcher (1967) заключает: не происходит дозиготной селекции сперматозоидов в зависимости от их генотипа; гены сперматозоидов человека не функционируют.

Однако только упомянутыми данными не исчерпывается объяснение этого важного теоретического и практического вопроса. Что касается конкретно дозиготной селекции, то необходимо

иметь в виду следующее: в сыворотке или в слизи шейки матки могут существовать нормально или могут быть индуцированы антитела против существующих в человеческих сперматозоидах групповых и других антигенов. Доказано, что эти антитела могут проявлять спермоагглютинирующие, спермоиммобилизирующие, спермолизидные, спермоопсонизирующие, спермопреципитирующие, спермотоксические, энзимингибирующие и пр. свойства. Эти свойства спермоантител дают возможность полагать, что *in vitro* и *in vivo* (в половых путях женского организма) возможна антигенная дозиготная селекция сперматозоидов. В первом случае речь идет об искусственной дозиготной селекции — результате лабораторной обработки, в ходе которой (как это было упомянуто) можно выделять сперматозонды с определенными наследственными качествами; во втором случае дозиготная селекция может наступить под влиянием спермоантител, содержащихся в женском половом тракте (изоантитела или аутоантитела, реагирующие со сперматозоидами) — в таком случае она естественна. Несмотря на противоречивость опубликованных в литературе данных относительно значения несовместимости группы крови родителей для бесплодия, некоторые наши результаты, демонстрирующие что анти-А, соотв. анти-В сыворотка сперматозоидов понижает специфическую фруктолитическую активность А и В сперматозоидов (Попиванов и Еврев, 1964), можно интерпретировать как подтверждение возможности дозиготной селекции в условиях *in vivo*.

Существование постсегрегационной генной активности известна у растений.¹ У животных, за исключением оспариваемых данных о синтезе РНК во второй фазе мейоза у трех видов насекомых (Henderson, 1964), в качестве единственного «хорошо аттестированного» и «очевидно неоспоримого» (Beatty, 1970) примера постсегрегационной генной активности в зрелом или развивающемся сперматозоиде можно указать на поведение генетических факторов Т (tailless) локусе мыши. Изучение наследования дефекта «отсутствие хвоста» мыши (Braden, 1958; Dunn, 1960; Glueckson-Waelsch, 1962 и пр.) показали, что при скрещивании бесхвостых мышей-самок (Тt) с нормальными самцами (++) получается потомство из 50% с короткими хвостами (Т+) и 50% с нормальными хвостами (t+). Однако, при обратном скрещивании, т. е. Тt♂ x ++♀ получается потомство из 13% Т+ : 87% t+. Эти данные показывают, что мужские гаметы — сперматозоиды, содержащие Т, обладают более низкой способностью к оплодотворению по сравнению со сперматозоидами, содержащими ген t. Оба типа сперматозоидов, как известно, образуются в одинаковом количестве, а оплодотворение сперматозоидом, содержащим ген Т, происходит реже; отсюда вывод, что аллель Т является функционально активной в соответствующих

¹ У кукурузы известна одна пара аллелей гена, который определяет крахмалистый или восковидный тип эндосперма и одновременный крахмалистый или восковидный тип пыльцевых зерен. Если эти зерна гибридной кукурузы (Аа) обработать йодом, то крахмалистые приобретают синюю окраску, а восковидные — красноватую, и их можно подсчитать. Это расщепление будет точно соответствовать отношению 1 : 1 (Лобашев, 1967).

сперматозоидах; это, в свою очередь, обуславливает фенотипические свойства, подвергаемые дозиготной селекции.

Соглашаясь с Beatty (1970), что «по более упрощенной терминологии генная активность может быть определена как осуществление синтеза информационной РНК» и учитывая биохимические данные Monesi (1964, 1965) и Moore¹ (1971) и данные Т-аллельной дисторсии у мышей, мы считаем, что приведенные в настоящей статье данные по идентификации двух различных популяций сперматозондов в эякуляте лиц, гетерозиготных в отношении групповых и трансплантационных антигенов, дают основание считать вероятным существование постсегрегационной генной активности в сперматозоидах человека.

В поддержку гипотезы, допускающей постсегрегационную генную активность в гаметном гаплотипе, можно привести и полученные в нашей лаборатории данные Еврева и сотр. (1970), которые показывают, что Х-фракция лактатдегидрогеназы (LDH-X) обнаруживается только в человеческих сперматозоидах и при длительном культивировании содержимого семенных канальцев семенников половозрелых индивидов (т. е. в материалах, содержащих большое число сперматозондов). Эта фракция не обнаруживается в материалах, не содержащих сперматозонды, таких как: длительно культивированное содержимое семенных канальцев лиц, не достигших половой зрелости, в однослойных культурах семенников, в семенной плазме, сыворотке крови и гемолизате эритроцитов.

Косвенным доказательством этой гипотезы являются факты, что сперматозоиды человека могут существовать в анаэробных условиях, что они способны использовать различные субстраты, такие как: сахара, липиды, пируваты и пр. Это является указанием быстрого включения различных энзимных систем. Учитывая отмеченные обстоятельства, было бы трудно допустить, что все эти процессы осуществляются без генетического контроля. Можно полагать, следовательно, что энзимные системы синтезируются *ad hoc* в сперматозоидах, и, весьма вероятно, что именно благодаря этим системам гаплоидная клетка адаптируется к новым условиям окружающей среды. Естественно, указанные процессы могли бы контролироваться также и находящимися в цитоплазме половой клетки генными продуктами, производ-

¹ Аугорадиографические данные Moore (1971) о РНК-полимеразной активности сперматогенных клеток показывают, что во время мейотической профазы I активность этого энзима низкая в лептотенных сперматоцитах; она нарастает во время зиготенной стадии и достигает до максимума во время пахитенной стадии, после чего снова уменьшается, причем момент ее исчезновения выражен неотчетливо ввиду невозможности сохранения сперматоцитов в профазе I в ходе эксперимента. В последующих этапах спермиогенеза снова устанавливается синтез РНК в ранних сперматиде (круглая стадия), причем РНК-полимеразная активность прогрессивно уменьшается после конденсирования ядра сперматид и исчезает в ранней фазе удлинения ядра (удлиняющаяся сперматиде). В конечных стадиях конденсации ядер и в созревающем сперматозонде синтеза РНК не установлено. На основании этих данных Moore заключает, что «сперматиде обладают по крайней мере «аппаратом» транскрибирования информации в гаплоидном геноме, несмотря на то, что неизвестно, в какой мере эта генетическая активность вносит вклад в сложные события морфогенетического характера в ходе спермиогенеза».

ными от досегрегационной РНК (Beatty, 1970), но, очевидно, в случае контроля синтеза групповых и трансплантационных антигенов значение может иметь функционирование лишь определенных генов.

Из всего вышесказанного и, главным образом, на основании иммунологических данных, показывающих наличие двух различных популяций в эякуляте лиц, гетерозиготных в отношении групповых и трансплантационных антигенов, можно сделать вывод, что феномен функционирования гаплоидного генного набора мужской половой клетки после мейоза нельзя исключить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вълчанов, В. х. — Имунпатологични аспекти на оплождането при човека. — *Съвр. мед. (Соф.)*, 21, 1970, 10, 3—9.
2. Косяков, П. Н. Антигенные вещества организма и их значение в биологии и медицине. Москва, «Медицина», 1954, 267 с.
3. Краинская-Игнатова, В. П. О групповых свойствах спермы. — *Врач. дело*, № 8, 1929. (цит. в Косяков, 1954).
4. Кучеренко, Ю. Г. Про специфични групови рецептори в тканниах та органах людини. — *Медицинский журн. АН УССР*, 4, 1, 79—109. (цит. в Косяков, 1954).
5. Лобашев, М. Е. Генетика. 2 изд., Ленинград, Изд. ЛУ, 1967, с. 12.
6. Малыгина, А. А. Исследование групповой специфичности спермы в судебно-медицинской практике. — *Тр. Гос. НИИ инст. Суд. мед.*, 1949, 169. (цит. в Косяков, 1954).
7. Попиванов, Р. и В. х. Вълчанов. Разделяне на човешките сперматозоиди от група АВ на сперматозоиди А и сперматозоиди В чрез аглутинация с имунен заешки серум. — *Изв. Микробиол. инст. БАН*, 14, 1962, 175—181.
8. Попиванов, Р. и В. х. Вълчанов. Наши изследвания върху имуногенетичните основи на безплодието. — *Съвр. мед. — (Соф.)*, 21, 1970, 4, 3—7.
9. Попиванов, Р. и Т. Еврев. Определяне груповата принадлежност на човешките сперматозоиди по фруктолитичната им способност. — *Експ. мед. и морфол. (Соф.)*, 3, 1964, 1, 8—16.
10. Попиванов, Р. и Л. Ерменкова. Определяне на груповите качества на човешките сперматозоиди чрез абсорбция и елуция. — *Изв. Инст. физиол. БАН*, 4, 1960, 141—145.
11. Попиванов, Р., И. Щъркалев, Т. Еврев и Т. Ананиев. Групови антигени в сперматозоидите на несекретори. — *Акуш. и гинекол. (Соф.)*, 4, 1966, 237—242.
12. Попиванов, Р., И. Щъркалев, Т. Еврев, Л. Наков, С. Живков, К. Киров, Л. Русев и И. Буланов. Собствени и придобити групови антигени в човешки тестисни клетки и сперматозоиди. В кн.: *Имунология сперматозоидов и оплодотворения. Тр. междунар. симпоз. Варне, Болг.*, 1967. София, БАН, 1969, 85—93.
13. Трибулев, Г. П., И. И. Подоплелов, А. И. Глинский, В. Г. Крюков, Р. Попиванов, С. Живков и Л. Наков. О появлении антигенов А и В в культурах клеток линии HeLa и Tg33 после взаимодействия с живыми сперматозоидами человека. В кн.: *Имунология сперматозоидов и оплодотворения. Тр. междунар. симпоз. Варне, Болг.* 1967. София, БАН, 1969, 95—99.
14. Трибулев, Г. П., И. И. Подоплелов, Р. Попиванов и В. х. Вълчанов. Върху наличието на антигенна общност между клетките HeLa и сперматозоидите на човека. — *Експ. мед. и морфол. (Соф.)*, 4, 1965, 3, 157—166.

15. Ackerman, D. R. Antibodies of the ABO system and the metabolism of human spermatozoa. — *Nature (Lond.)*, 213, 1967, 253—256.
16. Ackerman, D. R. The adsorption of anti-A and anti-B antibodies on human spermatozoa. — *Fert. Steril.*, 20, 1969, 324—334.
17. Beatty, R. A. The genetics of the mammalian gamete. — *Biol. Rev.*, 45, 1970, 73—119.
18. Boettcher, B. Human ABO blood group antigens on spermatozoa from secretors and non-secretors. — *J. Reprod. Fert.*, 9, 1965, 267—268.
19. Boettcher, B. Correlation between human ABO blood group antigens in seminal plasma and on seminal spermatozoa. — *J. Reprod. Fert.*, 16, 1968, 49—54.
20. Boettcher, B. Are the genes in spermatozoa functional? In: *Immunology of Spermatozoa and Fertilization. Proc. Intern. Symp. Varna, 1967*, Sofia, BAS, 1969, 359—363.
21. Braden, A. W. H. Influence of time of mating on the segregation ratio of alleles of the T locus in the house mouse. — *Nature (Lond.)*, 181, 1958, 786—787 (cit. in Beatty, 1970).
22. Coombs, R. R. A., D. Bedford & L. M. Rouillard. A and B blood antigens on human epidermal cells. — *Lancet*, 1, 1956, 461.
23. Dausset, J., R. L. Walford, J. Colombany, L. Legrand, N. Feingold, A. Barge & F. T. Rapaport. The HL-A system sub-loci and their importance in transplantation. — *Transplant. Proc.*, 1, 1969, 331.
24. Dunn, L. C. Variations in the transmission ratios of alleles through egg and sperm in *Mus musculus*. — *Am. Nat.*, 94, 1960, 385—393. (cit. in Beatty, 1970).
25. Edwards, R. G. Antigenicity of spermatozoa with respect to fertility and infertility. In: *Immunology of Spermatozoa and Fertilization. Proc. Int. Symp. Varna, 1967*. Sofia, BAS, 1969, 27—34.
26. Edwards, R. G., L. C. Ferguson & R. R. A. Coombs. Blood group antigens on human spermatozoa. — *J. Reprod. Fert.*, 7, 1964, 153—161.
27. Evrev, T., S. Zhivkov & L. Russev. LDH isoenzymes in testicular cultures and human testes. — *Human Heredity*, 20, 1970, 70—73.
28. Fellous, M. et J. Dausset. Probable expression of HL-A antigens on human spermatozoon. — *Nature (Lond.)*, 225, 1970, 191—193.
29. Gluecksohn-Waelsch, S. Mammalian genetics in medicine. — *Progr. med. Gen.*, 2, 1962, 295—330.
30. Goldberg, E. H., T. Aoki, E. A. Boyse & D. Bennet. Detection of H-2 antigens on mouse spermatozoa by the cytotoxic test. — *Nature (Lond.)*, 228, 1970, 570—572.
31. Gullbring, B. Investigation on the occurrence of blood group antigens in spermatozoa from man, and serological demonstration of the segregation of characters. — *Acta med. scand.*, CLIX, 1957, 169—172.
32. Hamerlynck, J. & Ph. Rümke. A test for the detection of cytotoxic antibodies to spermatozoa in man. — *J. Reprod. Fert.*, 17, 1968, 191—194.
33. Henderson, S. A. RNA synthesis during male meiosis and spermiogenesis. — *Chromosoma*, 15, 1964, 345—366.
34. Holborow, E. J., P. C. Brown, L. E. Glynn, M. D. Hawes, G. A. Gresham, T. F. O'Brien & R. R. A. Coombs. The distribution of the blood group A antigen in human tissues. — *Br. J. exp. Path.*, 41, 1960, 430—437.
35. Kissmeyer-Nielsen, F., A. Svejgaard & M. Hauge. Cit. in Fellous & Dausset, 1970.
36. Krieg, H. Blood group substances and infertility. In: *Immunology of Spermatozoa and Fertilization. Proc. Int. Symp. Varna, 1967*. Sofia, BAS, 1969, 237—241.
37. Kulangara, A. C. & R. A. Beatty. Reflection of genetic differences by spermatozoan antigens. — *Nature New Biology*, 231, 1971, 22, 144—146.
38. Landsteiner, K. & P. Levine. On blood specific substances in human spermatozoa. — *J. Immunol.*, 12, 1926, 415—418.
39. Levine, P. & M. J. Celano. The question of D(Rh) antigenic sites on human spermatozoa. — *Vox sang.*, 6, 1961, 720—723.

40. Mickey, M. R., P. D. Singal & P. I. Terasaki. Serotyping for homotransplantation. XXV. Evidence for three HL-A sub-loci.— *Transplant. Proc.*, 1, 1969, 347 (cit. in Fellous a. Dausset, 1970).
41. Monesi, V. Ribonucleic acid synthesis during mitosis and meiosis in the mouse testis.— *J. Cell Biol.*, 22, 1964, 521—532.
42. Monesi, V. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein.— *Exp. Cell. Res.*, 39, 197—223.
43. Moore, G. P. M. DNA-dependent RNA synthesis in fixed cells during spermatogenesis in the mouse. In: *Proc. Int. Symp. The Genetics of the Spermatozoon, Edinburgh, Aug. 16—20, 1972*, 90—96.
44. Morgenstern, L. L. ABO blood group antigens on human spermatozoa. In: *VI^e Congr. Int. Reprod. Anim., Paris, 1968*, 1, 557—559.
45. Parish, W. E., J. A. Carron-Brown & C. B. Richards. The detection of antibodies to spermatozoa and to blood group antigens in cervical mucus.— *J. Reprod. Fert.*, 13, 1967, 469—483.
46. Popivanov, R. & V. H. Vulchanov. Segregation of man's AB group spermatozoa in A- and B-spermatozoa through agglutination with immune anti-A rabbit serum.— *Z. Immunitätsforsch.*, 124, 1962, 206—210.
47. Popivanov, R. & V. H. Vulchanov. Immunogenetics of human spermatozoa. In: *Immunology and Reproduction. Proc. Int. Symp. Geneva, 1968*. London, IPPF, 1969, 155—167.
48. Rangnekar, K. N. & S. S. Rao. The source of blood group antigens on spermatozoa and their significance.— *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 37, 1970, 49—53.
49. Shahani, S. & A. Southam. Immunofluorescent study of the ABO blood group antigens in human spermatozoa.— *Am. J. Obstet. Gynec.*, 84, 1962, 660—666.
50. Vojtišková, M. & Z. Pokorná. Developmental expression of H-2 antigens in the spermatogenic cell series: possible bearing of haploid gene action.— *Fol. biol. (Praha)*, 18, 1972, 1, 1—9.
51. Vojtišková, M., M. Poláčková & Z. Pokorná. Histocompatibility antigens on mouse spermatozoa.— *Fol. biol. (Praha)*, 15, 1969, 322—332.
52. Vulchanov, V. H. & R. Popivanov. Immunological data suggesting postsegregational gene action in human spermatozoa. In: *Proc. Int. Symp. The Genetics of the Spermatozoon, Edinburgh, Aug. 16—20, 1972*, 177—190.

ON THE IMMUNOLOGICAL EVIDENCES SUGGESTING POSSIBLE FUNCTIONING OF THE HAPLOID GENOME IN HUMAN SPERMATOZOA

R. P. Popivanov, V. H. Vulchanov

Department of General Biology, Medical Academy, and Laboratory of Cellular Immunology,
Institute of Zoology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

SUMMARY

In previous studies, employing a monospecific rabbit serum against human spermatozoa from A blood group donors, the authors have shown that the washed ejaculate of AB men contains two phenotypes of spermatozoa (those with A and those with B antigen) which can be separated by agglutination technique. From these results, along with the other authors' data on the immunological identification of two different spermatozoan populations in individuals heterozygous for AB and MN blood group antigens and for histocompatibility antigens, obtained by various techniques, an inference is made that all these findings suggest a functioning of the haploid gene complement in the human spermatozoon. Recent enzymeimmunological data as well as theoretical considerations are adduced in favour of a hypothesis supporting the existence of post-segregational gene action in human spermatozoa.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНУ ИЗ СЕМЯН ГОРОХА (PISUM SATIVUM)

Н. И. КУЗНЕЦОВА

Центральный Орден Трудового Красного Знамени Научно-исследовательский институт судебной психиатрии им. проф. В. П. Сербского, Москва

Известно, что слюна человека независимо от его групповой принадлежности содержит полисахариды, способные ингибировать гем-агглютинирующую активность водно-солевого экстракта из семян гороха и других бобовых растений (1, 5). Однако не изучалась ингибирующая активность слюны по отношению к фитогемагглютинином в зависимости от тех или иных функциональных состояний человека, хотя известно, что выделение в слюну группоспецифических полисахаридов связано с функциональным состоянием центральной нервной системы (2). Можно думать, что в результате дальнейших исследований в этом направлении удастся получить факты, которые найдут практическое использование при клинической оценке тех или иных расстройств, вызванных аномальной активацией функции центральной нервной системы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование концентрации в слюне полисахаридов, взаимодействующих с фитогемагглютинином из семян гороха (ФГА), производили следующим образом. Отцентрифугированный 10%-ый экстракт из размолотых семян посевного гороха, неразведенный и в разведениях 1 : 2 — 1 : 256, разливали по одной капле в пробирки диаметром 0,6 см, соединяли с равным объемом слюны, разведенной 1 : 2 физиологическим раствором, и через 15 минут приливали 2%-ую взвесь отмытых эритроцитов человека (использовали эритроциты одного и того же лица группы А/П). Смесь оставляли на 18 часов при +4°, после чего учитывали интенсивность торможения гемагглютинации по конфигурации осадка. Контролем служил результат гемагглютинации ФГА,

«ингибированного» буферным физиологическим раствором. Отсутствие торможения расценивали как негативный результат (0), торможение в последнем агглютинирующем разведении ФГА — как 0,5 условных единиц (ЕД), торможение в 2-х, 3-х и более разведениях, считая от конечного, — как 1, 2 ЕД и т. д.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами была исследована ингибирующая активность слюны практически здоровых лиц, мужчин и женщин, взятой утром натощак вскоре после пробуждения и среди дня, а также слюна мужчин, стационарированных для лечения по поводу хронического алкоголизма. Исследование последних было проведено в период отсутствия признаков абстиненции; исследовали образцы слюны, взятой у одних и тех же больных вскоре после пробуждения натощак и в бодрствующем состоянии среди дня. В таблице 1 представлены результаты этих исследований в виде средних титров ингибиторов в условных единицах и показатели распределения низких и отрицательных значений ингибиторов (реакция в 1, 0,5 и 0 ЕД).

Из таблицы видно, что слюна здоровых мужчин не отличалась существенным образом от слюны здоровых женщин ни по среднему титру, ни по частоте распределения низких и отрицательных показателей в группах. В противоположность этому ингибирующая активность утренних образцов слюны в группе мужчин, страдающих хроническим алкоголизмом, отличалась от активности аналогично полученных образцов слюны в группе здоровых мужчин и женщин более низким средним титром ингибиторов, а также увеличением ($P < 0,01$) числа лиц с негативными и низкими значениями ингибиторов.

Т а б л и ц а 1

Содержание ингибиторов ФГА гороха в слюне

Группы обследованных	Образцы слюны*	Количество обследованных	Средний уровень ингибиторов	Количество лиц с низкими и отрицательными показателями ингибиции
Практически здоровые мужчины	I	19	$2,3 \pm 0,45^{**}$	3 (15%)
	II	21	$3,1 \pm 0,27$	4 (14,8%)
Практически здоровые женщины	I	28	$2,4 \pm 0,22$	6 (28,6%)
	II	102	$3,3 \pm 0,15$	15 (14,7%)
Мужчины, страдающие хроническим алкоголизмом	I	24	$1,4 \pm 0,2$	14 (58,3%)
	II	24	$3,9 \pm 0,29$	2 (8,3%)

Примечания: *) I и II — образцы слюны, взятой утром и днем соответственно.
**) Средняя ошибка разности.

Из таблицы видно также, что исследование образцов слюны, полученных днем, дает возможность выявить во всех обследованных группах статистически достоверное ($P < 0,05$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно по группам) повышение ингибирующей активности.

В связи с тем, что это обстоятельство можно было объяснить влиянием приема пищи отдельными лицами в дневное время, мы исследовали парные образцы слюны 35 женщин, взятые натощак в дневное время (между 13 и 14 часами) до принятия пищи и спустя 30—40 минут после еды. Относительно значительное повышение ингибиторной активности (на 3 ЕД) было обнаружено в порциях слюны, взятых после еды лишь у 6 человек, у 13 лиц различий практически не было выявлено, а у остальных лиц имело место повышение ингибирующей активности на 1—2 ЕД. В среднем различие по всей группе составило 1 ЕД ($m \pm 0,16$), что оказалось достоверным ($P < 0,0001$).

Нами была сделана попытка проанализировать значение возрастного фактора на ингибиторную активность слюны по отношению к ФГА, для чего использовали данные исследования дневных образцов слюны 102 практически здоровых женщин. Было установлено, что средний титр ингибиторов в группе женщин в возрасте от 16 до 25 лет был равен 3,1 ЕД, а низкие и негативные показатели имели место у 4 из 23-х обследованных. В группе лиц, в возрасте от 25 до 50 лет, средний титр ингибиторов составлял 3,2 ЕД, а низкие и негативные результаты имели место у 10 из 58. Средний титр ингибиторов у лиц в возрасте от 50 лет и старше (21 человек) был равен 3,7 ЕД, негативная реакция отмечена лишь у одного лица. Таким образом, можно отметить некоторую тенденцию к нарастанию ингибиторов ФГА в слюне лиц старше 50 лет, хотя различие с группами лиц более молодого возраста и не имело статистически достоверного характера, возможно, из-за небольшого количества обследованных.

Особенный интерес представлял вопрос о содержании ингибиторов в слюне лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, поскольку удалось обнаружить снижение ингибиторной активности в сравнении со здоровыми в пробах слюны взятой утром натощак. С накоплением фактического материала оказалось возможным провести более дифференцированный анализ ингибиторных свойств слюны у лиц, поступивших в стационар в состоянии ремиссии и с наличием выраженного абстинентного синдрома. Результаты этих исследований представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, лица, стационарированные с признаками абстиненции, характеризовались более высокими средними показателями ингибирующей активности слюны и меньшим числом невыделителей и слабых выделителей ингибиторов ФГА, чем лица, стационарированные без признаков абстиненции ($P < 0,001$). Исследование стационарированных лиц в динамике позволило установить, что по выходе из состояния абстиненции у больных устанавливается более низкий уровень содержания ингибиторов в слюне и соответственно возрастает частота выявления негативных и низких показателей ингибиции ($P < 0,01$). В группах лиц, стационарированных без признаков

Т а б л и ц а 2

Выделение в слюну ингибиторов ФГА у лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, в период наличия и отсутствия абстинентного синдрома*)

Состояние при поступлении	Длительность стационарирования до обследования (дни)	Количество обследованных	Количество лиц с низкими и негативными показателями	Средний титр ингибиторов в условных единицах
Абстиненция	1—10	69	13 (18%)	$2,7 \pm 0,16$
	11—20	23	11 (47,8%)	$1,7 \pm 0,23$
Ремиссия	1—10	51	24 (47%)	$1,8 \pm 0,17$
	11—20	22	10 (44,4%)	$1,9 \pm 0,35$

*) Исследовали слюну, полученную утром натощак.

абстиненции, показатели ингибиции ФГА оставались невысокими на протяжении периода обследования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Групповые антигенные вещества системы АВ0 и другие полисахариды, секретлируемые в слюну, относятся к естественным буферным системам организма, встречающимся на пути антителоподобных веществ пищевого происхождения (1, 3). В связи с этим динамика их выработки и секреции в слюну при различных функциональных состояниях в норме и при патологии может представить определенный научно-практический интерес. Установлено, в частности, что при ревматизме и различного рода заболеваниях желудочно-кишечного тракта частота распределения так называемых невыделителей и слабых выделителей групповых полисахаридов в слюну увеличивается (6, 7). Сходные данные были получены и при исследовании лиц, страдающих хроническим алкоголизмом (8) однако при этом не учитывалась возможность функциональных изменений на разных этапах заболевания, вследствие чего возникло предположение о связи этого заболевания с генетическими особенностями лиц, относящихся к категории невыделителей и слабых выделителей. Нами было показано, что при хроническом алкоголизме функциональное состояние лиц имеет существенное значение для выделения в слюну групповых веществ А и В: у одного и того же больного оно может быть снижено в состоянии абстиненции и такой больной может быть отнесен к категории невыделителей и слабых выделителей, а по мере выхода в ремиссию, напротив, возрастет (4).

Как следует из данных, представленных в настоящей работе, интенсивность выделения в слюну полисахаридов, взаимодействующих с антителами растительного происхождения (ФГА из семян посевного гороха) также изменяется в зависимости от функциональных особен-

ностей, на фоне которых производилось обследование. Особый интерес в этом отношении представили результаты исследования слюны больных хроническим алкоголизмом. Было установлено, что полисахариды, взаимодействующие с ФГА, в противоположность группоспецифическим полисахаридам, выделяются в слюну в большем количестве в состоянии абстиненции, чем в состоянии ремиссии. Возможно, что состояние абстиненции, представляющее собой сложное нейро-соматическое расстройство дизадаптационного генеза, вызывает нарушение синтеза группоспецифических антигенов или же приводит к избирательному торможению их секреции в слюну. Синтез неспецифических полисахаридов, т. е. полисахаридов, взаимодействующих с растительным гемагглютинином, использованным нами, видимо, не нарушается ни в состоянии ремиссии, ни в состоянии абстиненции. Уменьшение секреции в слюну неспецифических полисахаридов у больных хроническим алкоголизмом вне периода абстиненции при обследовании их вскоре после пробуждения следует, видимо, объяснить тормозящим влиянием центральной нервной системы, поскольку у тех же больных имело место значительное увеличение секреторной активности при обследовании в течение одного дня.

Результаты наших исследований, таким образом, подтверждают представление о том, что секреция полисахаридов в слюну определяется не только генетическими особенностями индивида, но и функциональным состоянием корково-подкорковых взаимосвязей (2). Обнаруженный нами факт колебания секреторной активности слюны у больных хроническим алкоголизмом может иметь значение при изучении вопросов терапии психоневрологических расстройств, вызванных хронической алкогольной интоксикацией.

ВЫВОДЫ

1. Интенсивность секреции в слюну человека полисахаридов, взаимодействующих с гемагглютинином из семян посевного гороха, не является стабильным показателем и варьирует в зависимости от функционального состояния организма.

2. У лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, секреция в слюну ингибиторов ФГА увеличена при абстинентном синдроме и снижена в состоянии ремиссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косяков П. Н. В кн.: Вопросы иммунологии нормальных и злокачественных тканей. М., 1956, 135.
2. Косяков П. Н., Г. В. Морозов, В. Е. Рожнов. — *Журн. высш. нерв. деят.*, 1954, 4, 177.
3. Косяков П. Н. В кн.: Иммунология изоантигенов и изоантител, М., 1965, 264.
4. Кузнецова Н. И., Т. П. Константинова. В кн.: Нервные и психические заболевания инфекционной и интоксикационной этиологии.

- Ташкент, 1972, в печати.
5. Strauchen, J. A., Ch. F. Moldow, A. A. Silber. — *J. Immunol.*, 1970, 104, 766.
 6. Glynn, A. A., L. E. Glynn, E. J. Holborow. — *Brit. med. J.*, 1959, 2, 266.
 7. Clarke, C. A., J. Edwards et al. — *Brit. med. J.*, 1959, 2, 725.
 8. Camps, F. E., B. E. Dodd. — *Brit. med. J.*, 1967, 1, 30.

STUDIES OF THE INHIBITORY EFFECT OF HUMAN SALIVA
ON PHYTOHEMAGGLUTININ, DERIVED FROM PEA'S SEEDS
(PISUM SATIVUM)

N. I. Kouznetzova

V. P. Serbsky Central Research Institute of Forensic Psychiatry

Moscow, USSR

S U M M A R Y

Samples of saliva from healthy individuals, as well as from persons suffering from chronic alcoholism were tested with respect to its inhibitory effect on phytohemagglutinin, obtained from pea's seeds. It is established that the secretion of polysaccharides with the saliva is not a stable quality, at least in some of the tested individuals; it is subject to variations in dependence with the functional status of the organism. Further, it was demonstrated, that the secretion of phytohemagglutinin inhibitors in patients with chronic alcoholism varied in dependence with the uptake of alcohol: it increased in abstention periods and decreased in alcoholic relapses

М И N АНТИГЕНЫ В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА

Р. П. ПОПИВАНОВ, Л. С. НАКОВ, И. И. ПОДОПЛЕЛОВ

Кафедра общей биологии Медицинской академии, София, Болгария
и НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Исследования групповых антигенов человеческих сперматозоидов затруднены ввиду наличия не только собственных (2, 4, 6, 10, 12, 13, 14, 15), но и приобретенных (3, 5, 7, 8) путем адсорбции из семенной плазмы А и В антигенов. Этим затруднениям можно избежать путем исследования собственных антигенов сперматозоидов, которые не секретируются в семенную плазму. Этому условию отвечают антигены М и N, которые были выявлены в сперматозоидах методом смешанной агглютинации Edwards и соотр. (8).

Целью настоящей работы является изучение наличия антигенов М и N в сперматозоидах человека с помощью сперматотоксического теста Hamerlynck и Rümke (11).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сперматозоиды. После инкубации в течение 30—60 мин при комнатной температуре каждую спермальную пробу разводили буферированным (до рН 7,4) физиологическим раствором в соотношении 1 : 10, центрифугировали со скоростью 500—1000 об/мин в течение 30 мин. Осажденные сперматозоиды использовали для сперматотоксического теста.

Были использованы моноспецифические абсорбированные и инактивированные иммунные кроличьи анти-М (титр 1 : 16) и анти-N (титр 1 : 32) сыворотки. Источником комплемента служила свежая сыворотка лиц группы АВ.

Живые сперматозоиды от мертвых отличали с помощью добавления 1%-ого раствора трипанового синего, который окрашивал мертвые клетки. Раствор краски изготовляли посредством смешивания равных объемов 2%-ого раствора трипанового синего в дистиллированной воде и 0,9%-ого раствора хлорида натрия.

Сперматотоксический тест, описанный Hamerlynck и Rümke (11), проводили со следующими незначительными модификациями:

1. Препараты с мазками сперматозоидов окрашивали дополнительно в течение 3—5 мин 1%-ым водным раствором эозина.

2. Подсчитывали не сперматоксический индекс, а процент мертвых (окрашенных трипановым синим) сперматозоидов посредством подсчета 200 сперматозоидов.

Контрольные опыты были поставлены со сперматозоидами каждой спермальной пробы, к которым добавляли буферированный физиологический раствор вместо соответствующих реагентов (анти-М, анти-Н, сывороток, комплемента).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследовано 9 спермальных проб 3 лиц типа М, 12 проб 4 лиц типа N и 9 проб 2 лиц типа MN. Результаты представлены на рис. 1.

Из рисунка видно, что в пробах лиц типа М процент мертвых сперматозоидов после воздействия анти-М сывороткой в среднем составляет $26,2 \pm 2,9$ (в контроле $12,7 \pm 1,1$), а после воздействия анти-Н сывороткой — $14,2 \pm 2,2$ (в контроле $9,0 \pm 1,8$). В пробах лиц типа N процент мертвых сперматозоидов после воздействия анти-М сывороткой составляет $19,1 \pm 1,1$ (в контроле $11,9 \pm 1,2$), а после воздействия анти-Н сыворотки — $24,5 \pm 0,8$ (в контроле $13,8 \pm 1,3$). В пробах лиц типа MN процент мертвых сперматозоидов после воздействия анти-М сывороткой равен $28,3 \pm 2,5$ (в контроле $14,6 \pm 1,3$), а после воздействия анти-Н сывороткой — $30,9 \pm 3,3$ (в контроле $15,2 \pm 1,1$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что у лиц типа М процент мертвых сперматозоидов после воздействия анти-М сывороткой (26,2%) почти вдвое превышает процент мертвых сперматозоидов после воздействия анти-Н сывороткой (14,2%). И, наоборот, у лиц типа N процент мертвых сперматозоидов после воздействия анти-М сывороткой (19,1%) явно ниже процента полученного после воздействия анти-Н сывороткой (24,5%). Эти результаты подтверждают сообщение Edwards и сотр. (8) о наличии М и N антигенов в человеческих сперматозоидах.

Fellous и Dausset (9) проводили аналогичные исследования на антигенах системы HL—A и установили, что при обработке сперматозоидов смесью антисывороток к антигенам, детерминированным одним гаплотипом, количество мертвых сперматозоидов при сперматоксическом тесте не превышает 46%, тогда как при воздействии на сперматозоиды смесью антисывороток к антигенам, детерминированным двумя гаплотипами, количество мертвых сперматозоидов превышает 67%.

В наших исследованиях после воздействия анти-М сывороткой процент мертвых сперматозоидов у лиц типа MN (28,3%) выше процента мертвых сперматозоидов у лиц типа М (26,2%). Разница значительно больше при сравнении эффекта анти-Н сыворотки на сперма-

тозонды лиц типа MN (30,9%) и на сперматозонды лиц типа N (24,5%). Наблюдаемый феномен можно объяснить вероятными перекрестными реакциями M- и N-антигенов, особенно сильно выраженными при действии анти-N сывороток (1).

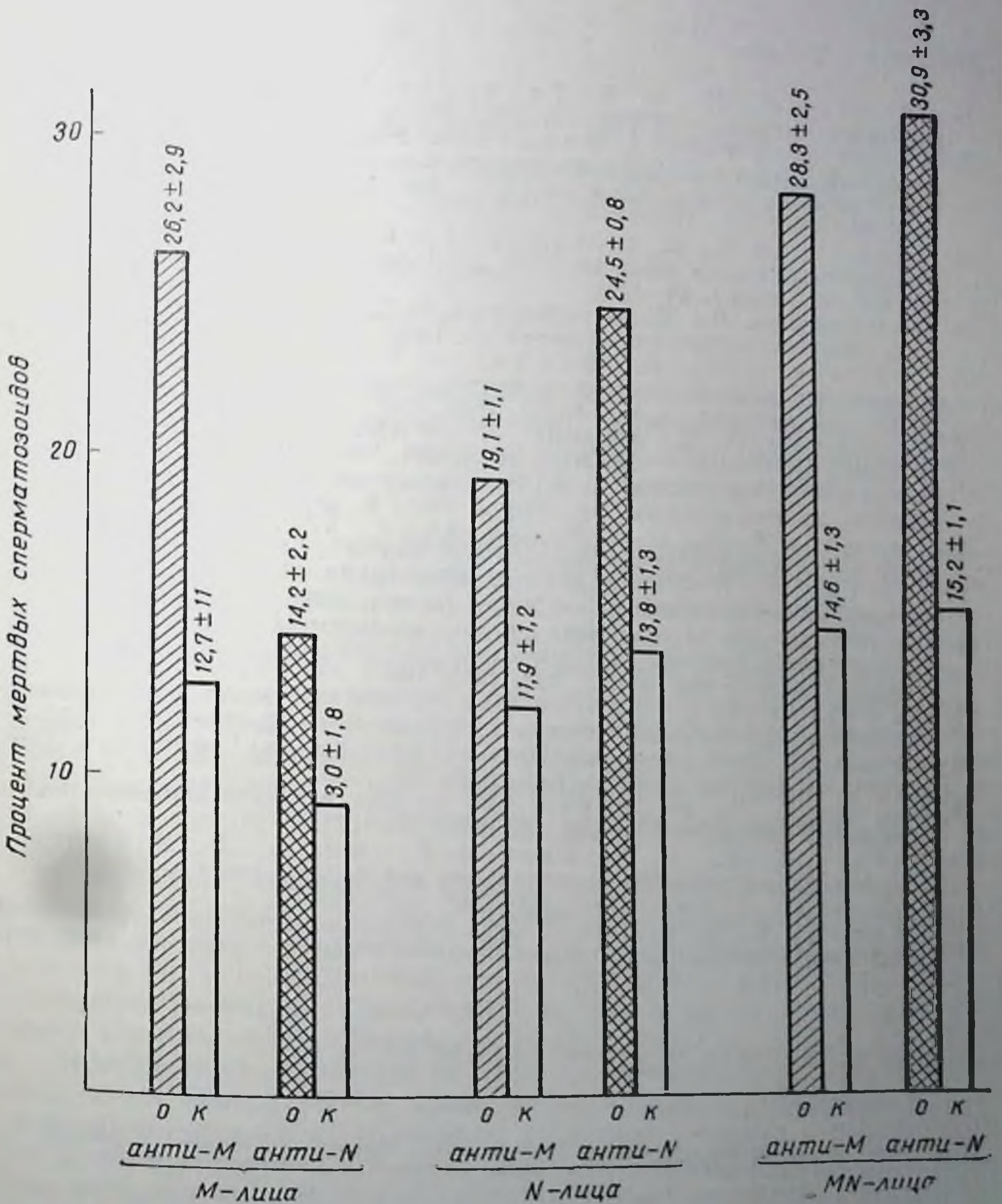


Рис. 1. Процент мертвых сперматозоидов (средняя величина ± стандартная ошибка) у лиц типов M, N и MN после воздействия анти-M и анти-N сыворотками
о — опыт; к — контроль.

Эти результаты доказывают наличие М и N антигенов в человеческих сперматозоидах, но они являются недостаточными для решения вопроса, наступает ли при мейозе сегрегация М и N генов и, соответственно, М и N антигенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. Типоспецифические М и N факторы в органах. — ЖМЭИ, 18, 1937, 270.
2. Попиванов Р., В. х. Вълчанов. Разделяне на човешките сперматозонди от група АВ на сперматозонди А и сперматозонди В чрез аглутинация с имунен заешки серум анти-А. — Изв. Микробиол. инст. БАН, София, 14, 1962, 175—181.
3. Попиванов Р., В. х. Вълчанов. Върху имунологичните данни, интерпретирани като израз на генна активност в човешките сперматозонди. — Сърв. мед. (Соф.), 24, 1973.
4. Попиванов Р., И. Щъркалев, Т. Евреви др. Групови антигени в сперматозондите на несекретори. — Акуш. и гинекол. 4, 1966, 237—242.
5. Попиванов Р., И. Щъркалев, Т. Евреви др. Собствени и придобити групови антигени в човешки тестисни клетки и сперматозонди. В кн.: Тр. междунар. симп. в Варне, Болг. 1967. София, БАН, 1969, 85—93.
6. Аскерман Д. R. Antibodies of the ABO system and the metabolism of human spermatozoa. — *Nature (Lond.)*, 213, 1967, 235—256.
7. Boettcher B. Human ABO blood group antigens on spermatozoa from secretors and non-secretors. — *J. Reprod. Fert.*, 9, 1965, 267—268.
8. Edwards R. G., L. C. Ferguson, R. R. A. Coombs. Blood group antigens on human spermatozoa. — *J. Reprod. Fert.*, 7, 1964, 153—161.
9. Fellous M., J. Dausset. Probable haploid expression of HL-A antigens on human spermatozoon. — *Nature (Lond.)*, 225, 1970, 191—193.
10. Gulbring B. Investigations on the occurrence of blood group antigens on spermatozoa from man and serological demonstration of the segregation of characters. — *Acta med. Scand.*, 157, 1957, 169.
11. Hamerlynck J., Ph. Rümke. A test for detection of cytotoxic antibodies to spermatozoa in man. — *J. Reprod. Fert.*, 17, 1968, 191—194.
12. Krieg H. Blood group substances and infertility. In: *Immunology of Spermatozoa and Fertilisation*. Sofia, BAS, 1969, 237—241.
13. Levine P., M. J. Celano. The question of D(Rh) antigenic sites on human spermatozoa. — *Vox sang.*, 6, 1961, 720—723.
14. Parish W. E., J. A. Carron-Brown, C. B. Richards. The detection of antibodies to spermatozoa and to blood group antigens in cervical mucus. — *J. Reprod. Fert.*, 13, 1967, 469—483.
15. Shahani S., A. L. Southam. Immunofluorescent study of ABO blood group antigens in human spermatozoa. — *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 84, 1962, 660.

M AND N ANTIGENS IN HUMAN SPERMATOZOA

R. P. Popivanov, I. I. Podoplelov, L. S. Nakov

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria, and Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

It has been demonstrated by the spermatotoxic test of Hamerlynck and Rümke, using immune rabbit anti-M and anti-N serum, that human spermatozoa possess the M and N antigens.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННЫХ АНТИГЕНОВ, СХОДНЫХ У ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ С ИЗОАНТИГЕНАМИ ЧЕЛОВЕКА СИСТЕМЫ АВО

И. И. ПОДОПЛЕЛОВ, А. С. САМОЙЛЕНКО

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Проблема гетерогенных антигенов (сходных по своей специфичности у различных видов организмов) является весьма актуальной для понимания эволюции микроорганизмов, роли генетического полиморфизма в человеческой популяции и механизма развития аутоиммунных заболеваний.

В 1944 г. Н. Н. Жуков-Вережников и Г. Гусева (1) выявили антиген, общий для чумного микроба и эритроцитов человека, и впервые было высказано предположение (2), что наличие этого антигена объясняет слабую иммуногенность возбудителя чумы и медленное развитие иммунитета в процессе инфекции. Вследствие этого снижается возможность организма различать «свое и чужое» и соответственно повышается вирулентность патогенных микробов. Впоследствии этот феномен получил название «антигенной мимикрии», а подобные антигены были выявлены у ряда микроорганизмов, в частности сходные не только с антигенами эритроцитов, но и тканей человека (3, 4, 8, 10, 13).

В последние годы большой интерес привлекают данные по изучению штаммов кишечной палочки, содержащих гетерогенные антигены, сходные с антигенами системы АВО (11, 12) и антигенами кишечника человека (9). С наличием этих антигенов в *E. coli* в настоящее время связывают некоторые особенности клиники, включая хроническое течение колитов, энтероколитов, пиелонефритов.

Задачей наших исследований явилось изучение кишечной палочки различного происхождения (энтеропатогенного и уропатогенного) на возможное наличие гетерогенных антигенов, сходных с групповыми антигенами человека типа АВО. Была использована модифицированная методика абсорбции специфических изоагглютининов гетероантигенами бактерий (5). При постановке реакции для устранения неспецифических результатов использовали бактерии после выращивания на минимальной безбелковой среде в течение 2—3-х пассажей. Опыт

повторяли не менее 3 раз с разными сериями моноспецифических антисывороток, используя разведения также в арифметической прогрессии. Полученные данные подтвердили представление о том, что одним из признаков вирулентности энтеропатогенных штаммов может быть наличие гетерогенных антигенов типа АВ0.

В первой серии наших исследований (5) при анализе 22 музейных энтеропатогенных штаммов кишечной палочки, полученных из Всесоюзного центра по эшерихиям, часто встречающихся серотипов 086, 026, 055, 0111 и 0128 и других было выявлено 5 штаммов, содержащих гетероантигены, а именно: тип 0 — у 1 штамма серотипа 0128, типа В — у 3-х штаммов серотипа 086, типа А и В — у одного серотипа 086.

Во второй серии наших исследований была поставлена задача анализа уропатогенных штаммов кишечной палочки на наличие антигенов типа АВ0 в связи с анализом клинической картины пиелонефрита у больных, от которых выделены эти штаммы. Как известно (6), пиелонефрит является самым частым заболеванием почек, в ряде случаев не выявляется и обычно диагностируется уже в хронической форме, причем из мочи в 85% случаев высеивается кишечная палочка. В наших исследованиях (7), охвативших 47 больных хроническим пиелонефритом, было выявлено, что лишь у половины больных наблюдалось обострение (повышение температуры, РОЭ, лейкоцитоз), а у остальных диагноз был поставлен лишь на основании пиурии и выделения кишечной палочки из мочи. При клиническом анализе мочи почти во всех случаях отмечено наличие белка и лейкоцитурии; активные лейкоциты были обнаружены лишь в 5 случаях. Как правило, у больных выделяли один и тот же штамм кишечной палочки, причем с заметной резистентностью к 4—5 антибиотикам из 9.

Групповые факторы у 47 больных по системе АВ0 распределялись с некоторым возрастанием группы А по сравнению с нормальной популяцией, а именно: 0 — 28%, А — 40%, В — 19%, АВ — 13%. Интересно также отметить, что титры анти-А и анти-В антител у некоторых больных отклонялись от средних цифр ($1/32$ — $1/128$), достигая $1/8$ — $1/16$ (у 7 больных) и $1/256$ — $1/512$ (у 6 больных).

В связи со слабой изученностью в литературе уропатогенных штаммов (12) в наших опытах были исследованы 33 штамма, выделенные от больных, причем у 15 были обнаружены гетерогенные антигены типа АВ0, а именно: 0 — в 11, А — в 2, В — в 2 штаммах.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что у значительного числа уропатогенных штаммов, выделенных от больных пиелонефритом, имеются гетероантигены типа АВ0, что может указывать на их значение в развитии хронического пиелонефрита с ослабленным иммунологическим ответом организма больного. На основании этих данных в последующих исследованиях необходима проверка предположения о том, что между антигенными особенностями уропатогенных штаммов кишечной палочки и антигенной структурой организма хозяина может существовать закономерная связь, определяющая скрытое течение болезни с переходом в хроническую форму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков-Вережников Н. Н., Г. Гусева. — *ЖМЭИ*, 1944, 3, 14.
2. Н. Н. Жуков-Вережников. — *ЖМЭИ*, 1947, 11, 84.
3. Лямперт И. М. В. кн.: Тезисы докладов 3-й всесоюзной конференции по иммунопатологии, 1969, Л., 16.
4. Мазина Н. М. — *Бюлл эксп. биол. и мед.* 1967, 3, 92.
5. Подоплелов И. И., Г. М. Бочко, В. П. Щипков. — *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 1971, 11, 61.
6. Пытель А. Я., В. С. Рябинский, В. Е. Родоман. В кн.: Новые методы выявления пиурии при пиелонефрите. М., 1968.
7. Подоплелов И. И., И. И. Юдина, Д. Я. Баканова, И. В. Голубева, Г. М. Бочков, А. В. Марченкова, В. П. Щипков, А. Г. Хволес, Н. И. Лысенко, А. С. Самойленко, В. И. Горшков, Г. В. Крюкова. В сб. Проблемы современ. иммунологии, М., 1972, 130.
8. Карпан М., М. Suchy. — *J. Exp. Med.*, 1964, 119, 643.
9. Perlman P., S. Hamarströms, R. Lagerstrandz, D. Campbell. — *Proc. Exp. Biol. Med.*, 1967, 125, 975.
10. Springer G. — *Naturwissensch.*, 1970, 57, 4, 162.
11. Springer G. F., P. Williamson and W. C. Brandes. — *J. Exp. Med.*, 1961, 113, 1077.
12. Друмчев Ив., Ас. Тошков. — *Эпидем. микробиол. и инфекц. бол.*, 1969, 6, 3, 267.
13. Вылчанов В. Х., Р. Попиванов. — *Бюлл. exper. биол. и мед.*, 1961, 10, 89.

STUDIES ON THE HETEROGENIC ANTIGENS IN PATHOGENIC STRAINS OF INTESTINAL BACTERIA. SIMILAR TO THE ABO HUMAN ISOANTIGENS

I. I. Podoplelov, A. S. Samoylenko

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

S

SUMMARY

A study was carried out on 22 enteropathogenic and 33 uropathogenic bacterial strains. Heteroantigens were discovered only in 5 of the enteropathogenic strains: type O — in 1, type B — in 3 and type A and B — in 1 strain. Among the uropathogenic strains heteroantigens were revealed in 15:0 — in 11, A — in 2 and B — in 2 strains of *E. coli*.

The data obtained in these experiments suggest, that the increase in virulence of the pathogenic bacterial strains, as well as the decrease of immunity in patients with colibacillosis is possibly related to the presence of heterogenic antigens.

повторяли не менее 3 раз с разными сериями моноспецифических антисывороток, используя разведения также в арифметической прогрессии. Полученные данные подтвердили представление о том, что одним из признаков вирулентности энтеропатогенных штаммов может быть наличие гетерогенных антигенов типа АВ0.

В первой серии наших исследований (5) при анализе 22 музейных энтеропатогенных штаммов кишечной палочки, полученных из Всесоюзного центра по эшерихиям, часто встречающихся серотипов 086, 026, 055, 0111 и 0128 и других было выявлено 5 штаммов, содержащих гетероантигены, а именно: тип 0 — у 1 штамма серотипа 0128, типа В — у 3-х штаммов серотипа 086, типа А и В — у одного серотипа 086.

Во второй серии наших исследований была поставлена задача анализа уропатогенных штаммов кишечной палочки на наличие антигенов типа АВ0 в связи с анализом клинической картины пиелонефрита у больных, от которых выделены эти штаммы. Как известно (6), пиелонефрит является самым частым заболеванием почек, в ряде случаев не выявляется и обычно диагностируется уже в хронической форме, причем из мочи в 85% случаев высевается кишечная палочка. В наших исследованиях (7), охвативших 47 больных хроническим пиелонефритом, было выявлено, что лишь у половины больных наблюдалось обострение (повышение температуры, РОЭ, лейкоцитоз), а у остальных диагноз был поставлен лишь на основании пиурии и выделения кишечной палочки из мочи. При клиническом анализе мочи почти во всех случаях отмечено наличие белка и лейкоцитурии; активные лейкоциты были обнаружены лишь в 5 случаях. Как правило, у больных выделяли один и тот же штамм кишечной палочки, причем с заметной резистентностью к 4—5 антибиотикам из 9.

Групповые факторы у 47 больных по системе АВ0 распределялись с некоторым возрастанием группы А по сравнению с нормальной популяцией, а именно: 0 — 28%, А — 40%, В — 19%, АВ — 13%. Интересно также отметить, что титры анти-А и анти-В антител у некоторых больных отклонялись от средних цифр (1/32 — 1/128), достигая 1/8 — 1/16 (у 7 больных) и 1/256—1/512 (у 6 больных).

В связи со слабой изученностью в литературе уропатогенных штаммов (12) в наших опытах были исследованы 33 штамма, выделенные от больных, причем у 15 были обнаружены гетерогенные антигены типа АВ0, а именно: 0 — в 11, А — в 2, В — в 2 штаммах.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что у значительного числа уропатогенных штаммов, выделенных от больных пиелонефритом, имеются гетероантигены типа АВ0, что может указывать на их значение в развитии хронического пиелонефрита с ослабленным иммунологическим ответом организма больного. На основании этих данных в последующих исследованиях необходима проверка предположения о том, что между антигенными особенностями уропатогенных штаммов кишечной палочки и антигенной структурой организма хозяина может существовать закономерная связь, определяющая скрытое течение болезни с переходом в хроническую форму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков-Вережников Н. Н., Г. Гусева. — *ЖМЭИ*, 1944, 3, 14.
2. Н. Н. Жуков-Вережников. — *ЖМЭИ*, 1947, II, 84.
3. Дямперт И. М. В. кн.: Тезисы докладов 3-й всесоюзной конференции по иммунопатологии, 1969, Л., 16.
4. Мазина Н. М. — *Бюлл эксп. биол. и мед.* 1967, 3, 92.
5. Подоплелов И. И., Г. М. Бочко, В. П. Щипков. — *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 1971, II, 61.
6. Пытель А. Я., В. С. Рябинский, В. Е. Родоман. В кн.: Новые методы выявления пиурии при пиелонефрите. М., 1968.
7. Подоплелов И. И., И. И. Юдина, Д. Я. Баканова, И. В. Голубева, Г. М. Бочков, А. В. Марченкова, В. П. Щипков, А. Г. Хволес, Н. И. Лысенко, А. С. Самойленко, В. И. Горшков, Г. В. Крюкова. В сб. Проблемы современ. иммунологии, М., 1972, 130.
8. Карпан М., М. Suchy. — *J. Exp. Med.*, 1964, 119, 643.
9. Perlman P., S. Hamarströms, R. Lagerstrand, D. Campbell. — *Proc. Exp. Biol. Med.*, 1967, 125, 975.
10. Springer G. — *Naturwissensch.*, 1970, 57, 4, 162.
11. Springer G. F., P. Williamson and W. C. Brandes. — *J. Exp. Med.*, 1961, 113, 1077.
12. Друмчев Ив., Ас. Тошков. — *Эпидем. микробиол. и инфекц. бол.*, 1969, 6, 3, 267.
13. Вялчанов В. Х., Р. Попиванов. — *Бюлл. exper. биол. и мед.*, 1961, 10, 89.

STUDIES ON THE HETEROGENIC ANTIGENS IN PATHOGENIC STRAINS OF INTESTINAL BACTERIA, SIMILAR TO THE ABO HUMAN ISOANTIGENS

I. I. Podoplelov, A. S. Samoylenko

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

S

SUMMARY

A study was carried out on 22 enteropathogenic and 33 uropathogenic bacterial strains. Heteroantigens were discovered only in 5 of the enteropathogenic strains: type O — in 1, type B — in 3 and type A and B — in 1 strain. Among the uropathogenic strains heteroantigens were revealed in 15: O — in 11, A — in 2 and B — in 2 strains of *E. coli*.

The data obtained in these experiments suggest, that the increase in virulence of the pathogenic bacterial strains, as well as the decrease of immunity in patients with colibacillosis is possibly related to the presence of heterogenic antigens.

РАЗДЕЛЕНИЕ ГРУППОВЫХ АНТИГЕНОВ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ ПО МЕТОДУ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

И. Д. БУЛАНОВ, Л. С. НАКОВ, С. М. ЖИВКОВ, Т. И. ЕВРЕВ, Ц. Н. СЫРНЕВА

Кафедра общей Спологии Медицинской академии, София, Болгария

Семенная плазма является многообразной гаммой белков, иммунологические свойства которых изучались рядом авторов (1, 2, 5). Групповые вещества системы АВ0(Н) являются одними из антигенов семенной плазмы, наличие которых обязательно во всех секретах.

Сперматозоиды обладают способностью адсорбировать эти вещества. Косяков (3) считает, что групповые вещества выполняют защитную функцию, предохраняющую сперматозоиды от действия α - и β -антител в женских половых путях.

Настоящая работа посвящена изучению характеристики групповых антигенов семенной плазмы. По этому вопросу данных в литературе очень мало.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Многократно и в отдельности нами исследована семенная плазма 4 доноров: двух — группы А, одного — группы В и одного — группы АВ. Плазму сепарировали путем центрифугирования эякулата в течение 20 мин со скоростью 15000 об/мин и до начала обработки хранили при температуре -20°C .

Фракционировали нативные пробы и пробы, диализированные в течение 72 часов:

а) 0,01 М фосфатным буфером при $\text{pH}=7,5$ с содержанием 0,15 М хлорида натрия (PBS);

б) физиологическим раствором и

в) 0,01 М ацетатным буфером при $\text{pH}=3,2$ с содержанием 0,15 М хлорида натрия.

При гель-фильтрации мы использовали колонку из Седафекса G-200 ($2,5 \times 83$ см). До фракционирования проб, диализированных против физиологического раствора, колонки эквilibрировали физиологическим раствором в течение 72 часов. При работе с нативной се-

менной плазмой и с диализированной против PBS плазмой эквивалентную производили с помощью PBS, а при диализированных против ацетатного буфера пробах при $pH=3,2$ — тем же буфером, но при $pH=5,8$, по рекомендациям Кочеткова и сотр. (4).

Работали с пробами по 2 мл с белковым содержанием от 12,5 до 25 мг/мл, элюирование которых проводили с помощью буфера, используемого для эквивилибирования колонки. Отбирали фракции по 2,5 мл. В каждой фракции определяли содержание белков по методу Lowry—Folin и количество групповых веществ посредством ингибиционно-агглютинационного теста.

В двух опытах по фракционированию семенной плазмы А, концентрацию фракций отдельных белковых пиков увеличивали в 20 раз и концентраты исследовали иммуноэлектрофоретически с сыворотками, полученными при иммунизации кроликов: а) человеческой семенной плазмой и б) гемоллизатом эритроцитов группы крови А (сыворотка анти-А).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сопоставлении результатов экспериментов по сепарированию семенноплазменных антигенов А в нативных и диализированных против PBS, физиологического раствора и ацетатного буфера пробах одного и того же человека нами установлено, что получаются приблизительно одинаковые кривые элюации белков и что А-групповое вещество элюируется всегда с первым белковым пиком. Однако, предварительный диализ проб против ацетатного буфера приводит к преципитации части семенноплазменных белков. При этом общее содержание белков в жидкой части пробы в среднем снижается от 7,5 до 1,5 г/%, а титр А-антигена значительно повышается — с 2048 на 32 000. Этот факт показывает, что при диализе семенной плазмы против 0,01 М ацетатного буфера с содержанием 0,15 М хлорида натрия и $pH=3,2$ наступает значительное очищение плазмы от белков, почти не обладающих специфичностью кровяных групп. Это послужило нам основанием использовать в дальнейших исследованиях обработанную по вышеописанному способу семенную плазму.

Результаты фракционирования трех семенных проб лиц с группами крови А, В и АВ показаны на рис. 1. Если сравнить кривые элюации белков на трех графиках (сплошная линия), видно, что у них приблизительно одинаковый профиль. Приблизительно одинаковую хроматографическую характеристику имеют и групповые вещества семенной плазмы. Главный пик их элюентных кривых (пунктир), которые на графиках выражают их количество в отдельных фракциях в гемагглютинационных единицах, всегда совпадает с первым белковым пиком. У двух исследованных лиц (рис. 1 — графики А и В) кривая групповых веществ показывает во всех повторениях бимодальный характер — один главный пик и расположенный правее второй пик. Для лица с группой крови АВ (рис. 1 — график АВ) и для одного

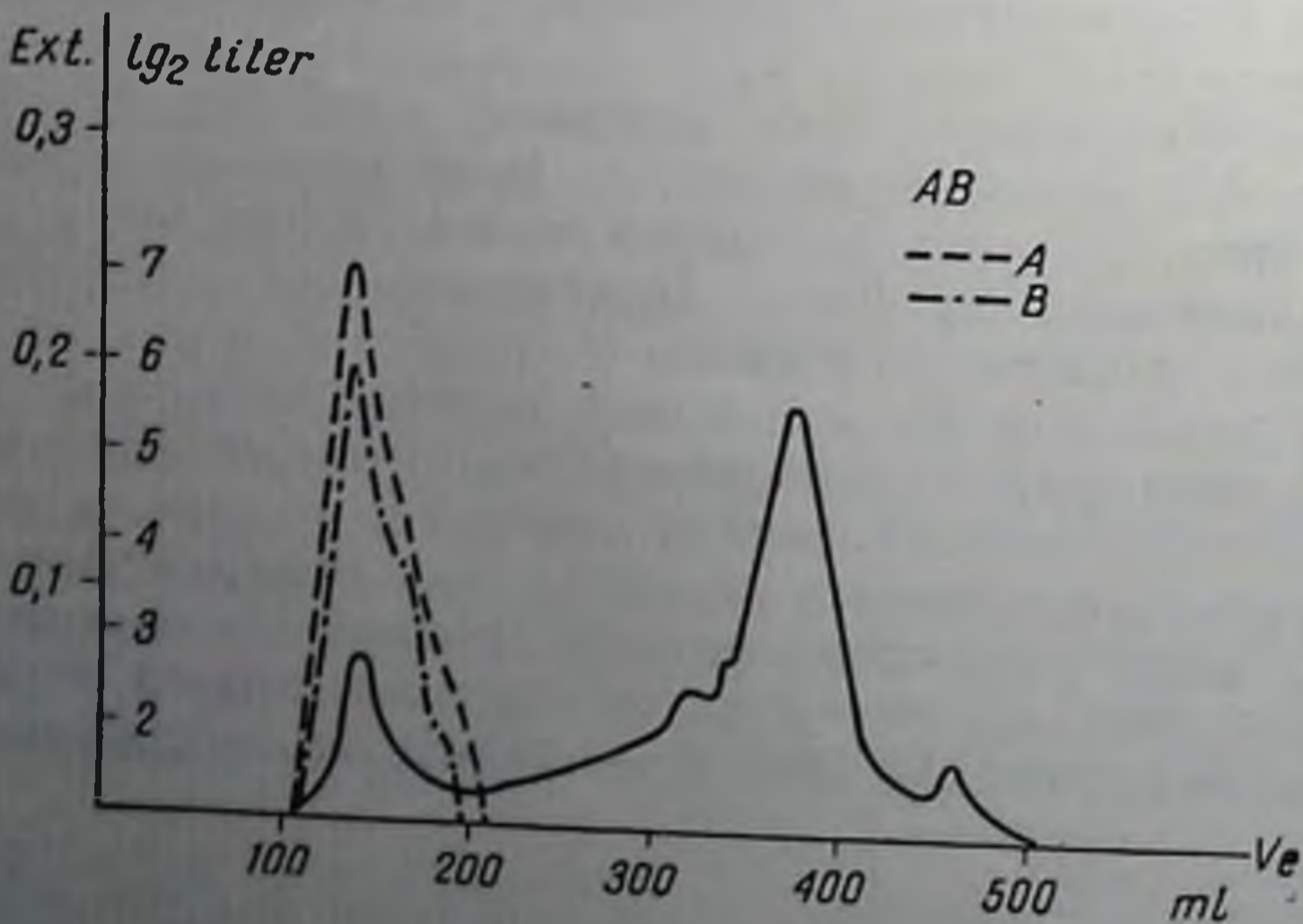
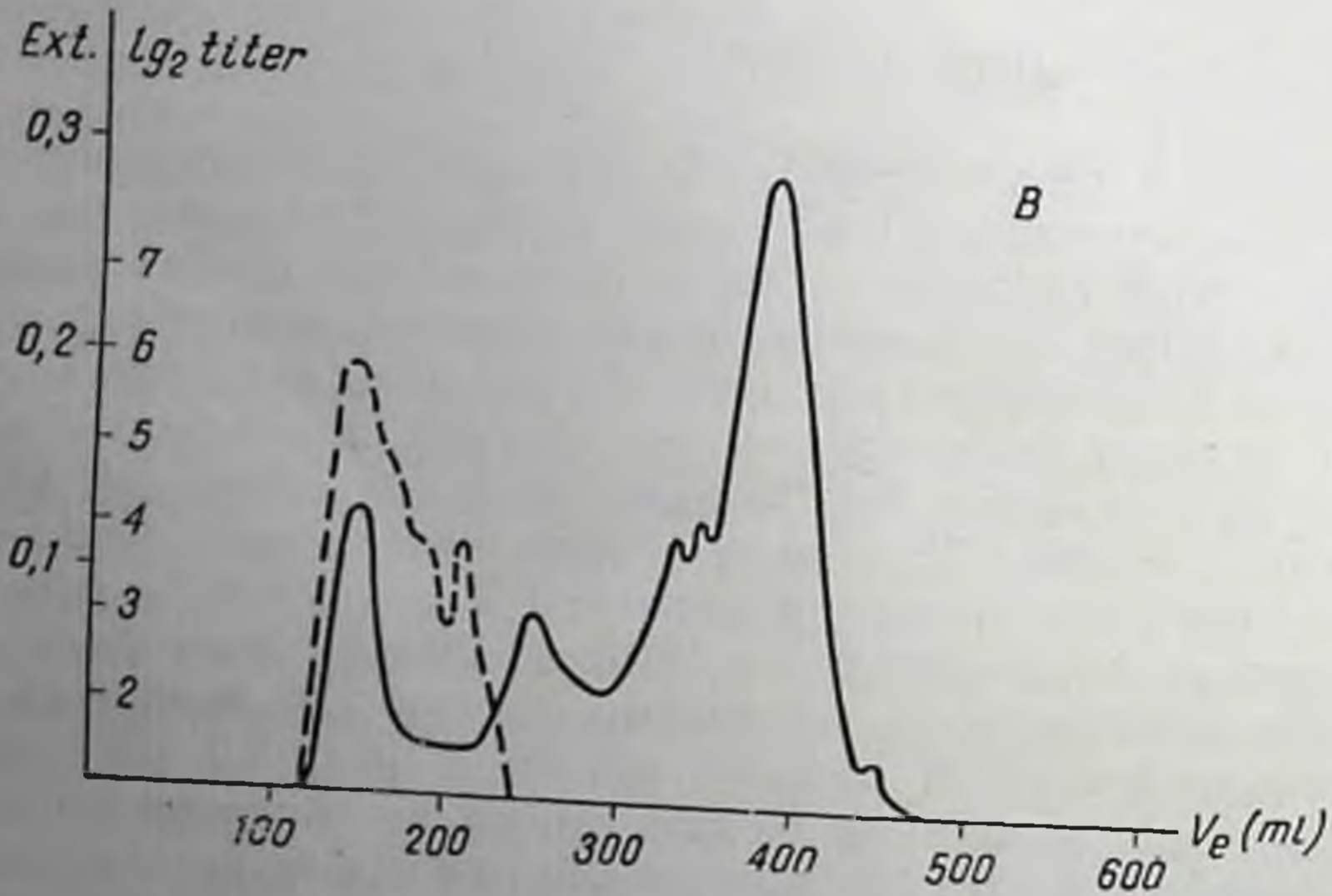
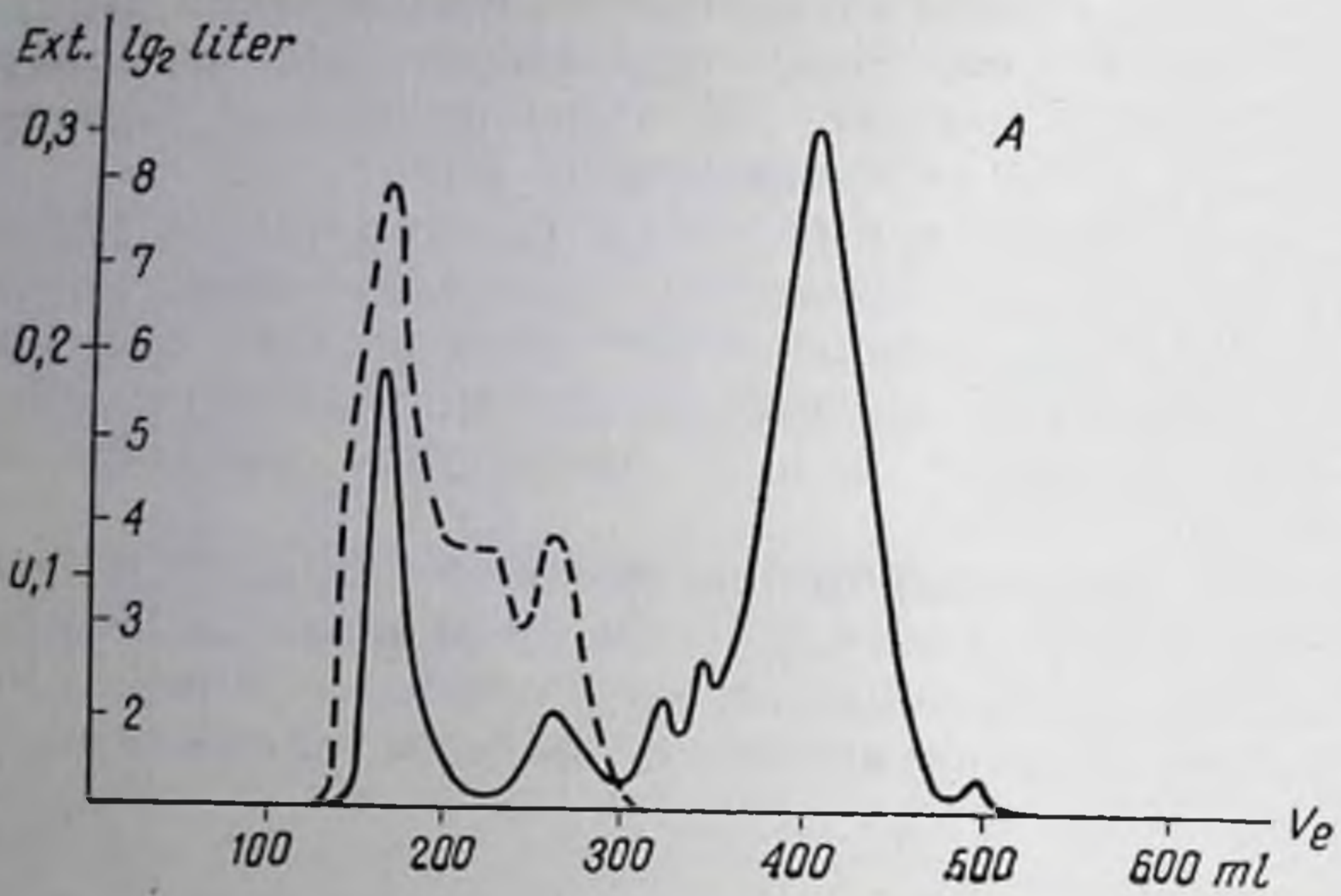


Рис. 1. Результаты фракционирования семенных проб лиц групп крови А, В и АВ; — элюентная кривая белков; - - - элюентная кривая групповых веществ.

лица группы А элюэнтная кривая групповых веществ во всех случаях была одномодальной. Ввиду этого нам представляется, что описанные различия в хроматографической характеристике групповых веществ зависят от индивидуальных качеств доноров.

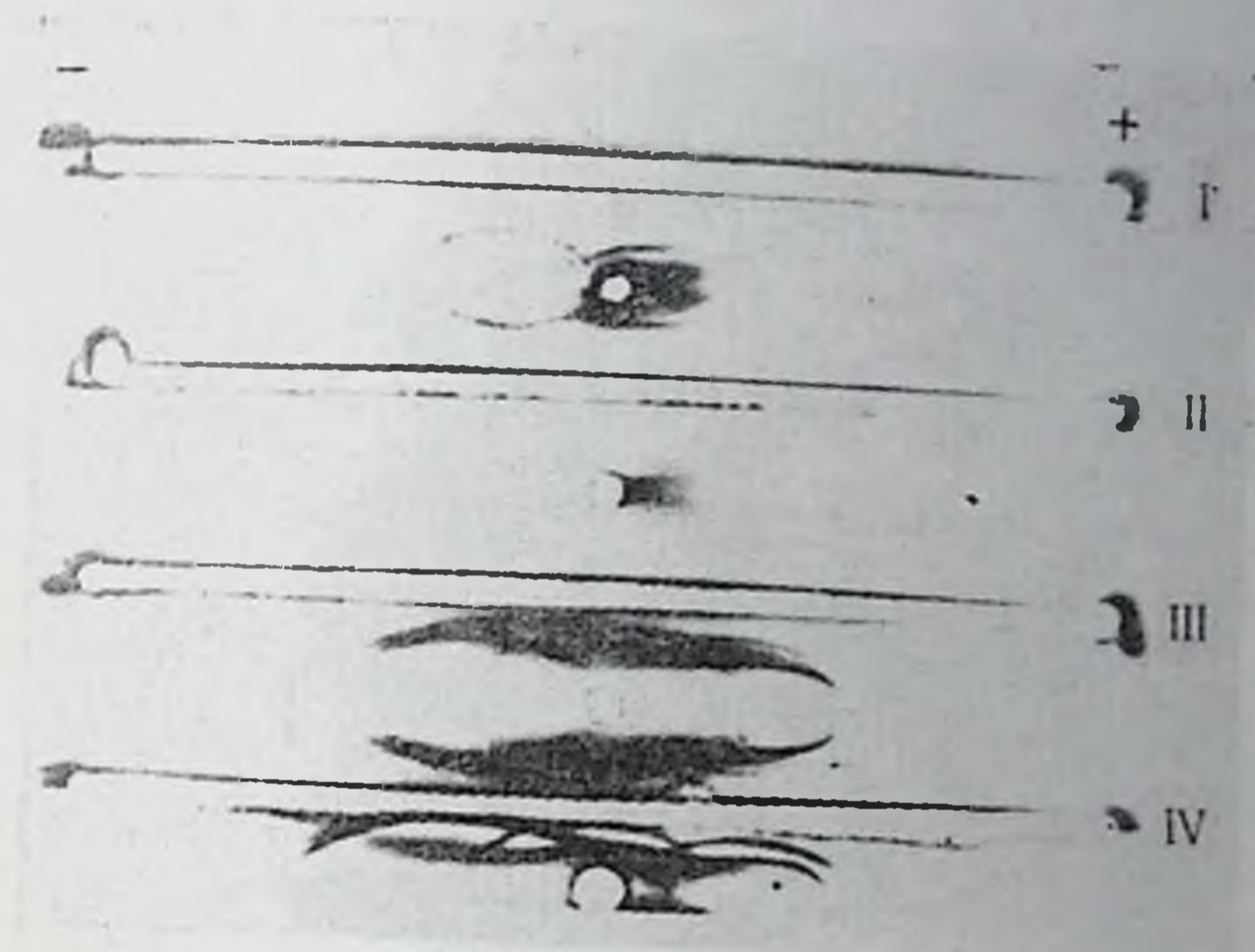


Рис. 2. Иммуноэлектрофорез антисеменноплазменной сывороткой:

- I — первый белковый пик
- II — второй белковый пик
- III — третий белковый пик
- IV — цельная семенная плазма.

На рис. 2 представлен результат иммуноэлектрофоретического исследования сыворотки против семенной плазмы двадцатикратно концентрированных сборных фракций отдельных белковых пиков, полученных при фракционировании одной семенной пробы А. Если в контроле (цельная семенная плазма) обнаружено 12—16 преципитационных полос, а третий пик дает около 10 полос, то в первом пике, включающем преимущественно вещества с групповой специфичностью, наблюдаются лишь 3 преципитационные полосы — две в области β -глобулинов и одна, слабо выраженная, по подвижности соответствующая IgA. Вторым пиком, который содержит меньшую часть групповых веществ, с противосеменноплазменной сывороткой дает две полосы с подвижностью β -глобулинов.

Те же пробы, исследованные иммуноэлектрофоретически с кроличьей иммунной анти-А сывороткой (предварительно нейтрализованная семенной плазмой лиц с группой крови В и 0), показали следующее (рис. 3): с первым белковым пиком получают две преципитационные полосы в области α_2 - и β -глобулинов. По подвижности они соответствуют полосе, которую дает сыворотка со стандартизованным А-группоспецифическим веществом, полученным из желудка свиньи в Инсти-

туте биохимии в Упсале. Остальные белковые пики не реагируют с анти-А сывороткой.

Описанные иммуноэлектрофоретические исследования показывают, что посредством гель-фильтрации с Седафексом G-200 можно изоли-

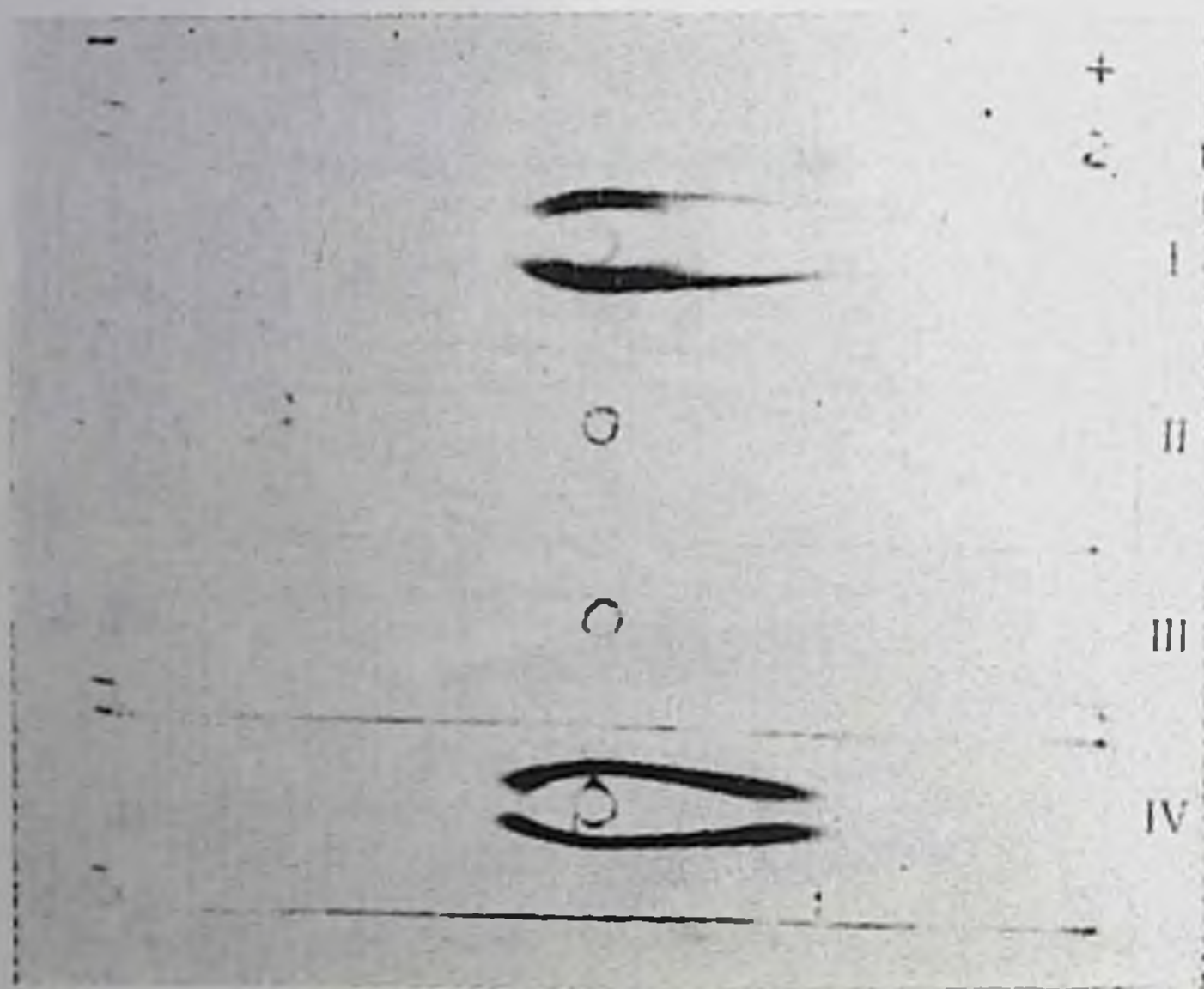


Рис. 3. Иммуноэлектрофорез анти-А сывороткой:

- I — первый белковый пик
- II — второй белковый пик
- III — третий белковый пик
- IV — стандартизованное групповое вещество А.

ровать в относительно чистом виде групповые вещества семенной плазмы человека. Они элюируются преимущественно с первым белковым пиком вместе не более, чем с тремя другими антигенами, которые имеют одинаковый с ними молекулярный вес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атапо У., S. J. Веггман. — *Intern. J. Fertil.*, 1968, 13, 61.
2. Веггман S. J. and У. Атапо. — *Intern. J. Fertil.*, 1967, 12, 291.
3. Косяков П. Н. Иммунология изоантигенов и изоантител. «Медицина», Москва, 268, 1965.
4. Кочетков Н. К., С. Г. Кара-Мурза, В. А. Деревицкая. — *ДАН СССР*, 163, № 2, 1965, 500.
5. Mischler T. W. and E. P. Reineke — *J. Reprod. Fert.*, 12, 1966, 125.

SEPARATION OF SEMINAL PLASMA GROUP ANTIGENS BY GELFILTRATION

I. D. Boulanov, L. S. Nakov, S. M. Zhiukov, T. I. Evrcu, N. N. Sarneva

Department of General Biology, Medical Academy,
Sofia, Bulgaria

SUMMARY

Using a Sefadex-G-200-chromatography equipment the authors isolated blood group antigens (A, B and AB in relatively pure condition) from human seminal plasma. The group antigens appear mainly in the first protein pick and as a rule they are accompanied by not more than three other antigens with the same molecular weight.

О ГЕТЕРОГЕННЫХ АНТИГЕНАХ ТКАНЕЙ СЕРДЦА, ОБЩИХ С ГЕМОЛИТИЧЕСКИМ СТРЕПТОКОККОМ

Н. М. МАЗИНА

Институт ревматизма АМН СССР, Москва

В общей патологии человека большое значение придается наличию у ряда патогенных бактерий и вирусов субстанций, общих с тканями и органами человека. Отмечено их влияние на развитие целого ряда заболеваний: вирусных, инфекционных, аллергических. О существовании антигенов подобного рода следует помнить при пересадке тканей и создании вакцин (Н. Н. Жуков-Вережников, 1945, 1972; П. Н. Косьяков, 1965; Massel et al., 1969; Raparport et al., 1969 и др.).

Обнаружение феномена иммунологической общности тканей сердца человека и стрептококка открыло новые перспективы для изучения патогенеза ревматизма. Длительное сосуществование А-стрептококка и человека нашло свое выражение в развитии так называемой антигенной мимикрии. В настоящее время субстанции, характерные для человека, обнаружены во всех структурных компонентах стрептококка: капсуле (Sandson, 1968), оболочке (И. М. Лямперт, 1962, 1970; Т. А. Данилова, 1968; В. И. Иоффе, 1969; Kaplan, 1962, 1970; Halbert, 1968; Halpern, 1967; Nakhla, 1967), мембране (Zabriskie, 1966, 1970, 1964; Raparport, 1969, 1969), цитоплазме (Н. М. Мазина, И. И. Рассохина, 1964; А. А. Тустановский, 1965), а также стрептолизине-0 (В. И. Сисенко, 1969). При этом у гемолитического стрептококка выработалась сложная система антигенов, общих с различными тканями и органами человека: сердце (И. М. Лямперт, Т. А. Данилова, Kaplan, Halpern, Halbert, Zabriskie и др.), почки (Markowitz, Lange, Freimer и др.), кожа (Ю. Н. Зубжицкий, Raparport, Chase и др.), синовиальная жидкость, хрящ (Sandson), эритроциты (Zih, Thoma), которая, очевидно, и обуславливает уникальные свойства этого микроба быть этиологическим фактором широкого спектра заболеваний человека, таких различных по клинике, патогенезу и эпидемиологии, как: ревматизм и рожистое воспаление, хронический тонзиллит, нефрит, скарлатина.

Субстанции стрептококка, общие с тканями человека, маскируя гетерогенную специфику возбудителя, способны тормозить или изменять ответную реакцию организма. Антигены подобного рода могут выпол-

нять роль первичного пускового механизма в возникновении иммунопатологических процессов.

В задачу данной работы входило изучение феномена иммунологической общности тканей сердца человека и гемолитического стрептококка и его роли в развитии аутоиммунных реакций и тканевых изменений сердца.

Экспериментальное исследование проведено на 90 кроликах породы Швинцала и 30 морских свинках.

Факт существования антигенов, общих для тканей сердца человека и гемолитического стрептококка группы А, был доказан перекрестной постановкой опытов с кардиальной и стрептококковой антисыворотками в шести иммунологических реакциях: связывания комплемента, пассивной гемагглютинации, латекс-агглютинации, преципитации в агаре, иммуносорбции и пассивной анафилаксии с десенсибилизацией.

Общий для стрептококка и тканей сердца антиген был дифференцирован от антигена Форсмана, а также от возможных примесей животных белков питательной среды, на которой выращивалась культура стрептококка. Антигенное сходство с тканями сердца было обнаружено у некоторых серотипов стрептококка группы А, не выявлено в С и R группах этого микроба, а также в золотистом стафилококке и кишечной палочке, также сапрофитирующих у человека (Н. М. Мазина, 1967).

Было показано, что общий со стрептококком антиген не индуцируется длительным воздействием этого микроба на ткани сердца. Он постоянно содержится в последних не только у больных ревматизмом, но и у здоровых людей (Karlan, 1964; Н. М. Мазина, 1966). При этом сходные со стрептококком антигенные детерминанты связаны с белковой фракцией гиалоплазмы, но не обнаружены в ядерной митохондриальной и микросомальной структурах тканей сердца.

Принадлежность общих антигенов к группе органоспецифических субстанций сердца была показана следующими экспериментальными данными.

Стрептококковые антисыворотки реагировали с экстрактом сердечных тканей независимо от их видовой специфичности (человек, собака, крупный рогатый скот, кошка, морская свинка, крыса, мышь, курица). Стрептококковые сыворотки не реагировали с экстрактами других органов и тканей. Адсорбция антистрептококковой сыворотки гомологичной культурой и сердечным экстрактом подавляла реакцию с сердечными тканями, в то время как истощение нормальной сывороткой человека, а также экстрактами других органов, не меняло активности стрептококковой сыворотки в отношении как тканевых антигенов сердца, так и стрептококка. У морских свинок, пассивно сенсibilизированных к тканям сердца и сывороточным белкам человека, при внутрикожном введении стрептококка инфильтраты образовывались только у первой группы животных (Н. М. Мазина, 1967).

Соответствие перекрестно реагирующих антигенов стрептококка органоспецифическим компонентам тканей сердца имеет важное зна-

чение, т. к. это дает основание предположить кардиотропные свойства стрептококковых антител к тем типам этого микроба, которые имеют общие антигенные детерминанты с тканями сердца. Целью следующей серии экспериментов и явилось исследование возможности появления аутоиммунных реакций, а также структурных и субструктурных изменений в тканях сердца под влиянием так называемых перекрестно реагирующих антител. Шести равным группам кроликов (по 10 животных в каждой группе) вводилась по одинаковой схеме глобулиновая фракция кроличьей антисыворотки: 1 — к 5 типу А-стрептококка, содержащему общий с тканями сердца антиген, 2 — к 12 типу А-стрептококка, не содержащему подобного антигена, 3 — к сальмонеллам, 4 — к риккетсиям, 5 — к тканям сердца; 6-ой группе кроликов вводилась нормальная кроличья сыворотка.

У животных первой группы наблюдалась стимуляция выработки кардиальных антител. При этом антитела к другим тканям и органам не обнаруживались, либо наблюдались в малых концентрациях.

Динамика антителообразования у животных, получавших антисыворотку к 5 типу, содержащему общий с сердцем антиген, очень близка к таковой у кроликов, получавших кардиальную антисыворотку (Н. М. Мазина и др., 1969, 1971). Это обстоятельство позволяет нам предположить сходство в механизме возникновения аутоиммунных реакций, вызываемых действием этих двух видов гомологических антисывороток: цитотоксической и стрептококковой, содержащей перекрестно реагирующие с тканями сердца антитела.

Гистологические, гистохимические и электронномикроскопические исследования тканей сердца опытных животных указывают на возникновение в них значительных изменений под влиянием стрептококковых перекрестно реагирующих антител. Патоморфологическая картина в сердечно-сосудистой системе характеризовалась нарушением сосудистой и тканевой проницаемости. Это наблюдение было важным для понимания механизмов проникновения вводимых перекрестно реагирующих антител. Патогенетическая функция рассматриваемых антител могла реализоваться лишь при условии, если они получают доступ к внутриклеточным антигенам, сходным со стрептококковыми. Наряду с изменением проницаемости тканей и сосудов, характерными были выраженные дистрофические изменения миокарда. В более поздние сроки опыта наблюдались участки с полной гибелью мышечной ткани и обнажением соединительнотканного каркаса.

Электронномикроскопически также наблюдался комплекс ультраструктурных изменений, которые можно интерпретировать как признаки дистрофии мышечных волокон, связанные с нарушением жирового и углеводного обмена. Субмикроскопические сдвиги прежде всего выражались в увеличении числа размеров лизосом, гиперплазии комплекса Гольджи и гранулярного эндоплазматического ретикулума.

В соединительнотканых структурах сердца наблюдались экссудативно-пролиферативные изменения, а в ряде случаев очаги фибриноидного набухания. Гистохимически это выражалось в усилении активности щелочной фосфатазы в интерстициальной соединительной ткани,

а электронномикроскопически — в появлении активности фибробластов окруженных волокнами из новообразованных коллагеновых фибрилл.

Раннее появление кардиальных антител, морфологических и гистохимических изменений в сердце свидетельствует об избирательном действии на ткани сердца перекрестно реагирующих антител. Введение по такой же схеме антисыворотки к 12 типу А-стрептококка, не содержащего общего антигена, а также антисывороток к другим микроорганизмам и нормальной кроличьей сыворотки не сопровождалось подобными иммунологическими и морфологическими изменениями со стороны сердечно-сосудистой системы.

Итак, в тканях сердца как больных ревматизмом, так и здоровых людей, содержится антиген, общий с β -гемолитическим стрептококком группы А. Он относится к группе органоспецифических антигенов сердца и связан с белками гиалоплазмы. При длительном воздействии стрептококковой антисыворотки к 5 типу, содержащему общий с тканями сердца антиген, возникают аутоиммунные реакции, морфологические изменения со стороны сердечно-сосудистой системы, изменения лизосомного аппарата в миокарде, усиление активности фибробластов, увеличение массы коллагеновых волокон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилова Т. А. — *ЖМЭИ*, № 2, 99, 1966.
2. Жуков-Вережников Н. Н. — *ЖМЭИ*, № 4—5, 34, 1945.
3. Жуков-Вережников Н. Н. В кн.: Проблемы современной иммунологии 1972, 12.
4. Зубжидкий Ю. Н., Р. П. Огурцов — *Бюлл. эксперим. биол. мед.* № 4, 107, 1968.
5. Иоффе В. И. — *Вопр. ревматизма* № 1, 31, 1969.
6. Косяков П. Н., З. И. Ровнова. — *Вопр. вирусологии* № 1, 17, 1955.
7. Лямперт И. М., Л. В. Белецкая, Н. А. Бороднюк, М. Н. Смирнова. — *ЖМЭИ*, № 2, 62, 1962.
8. Мазина Н. М. — Материалы Эстонской республиканской конференции по аллергологии, 37, 1967.
9. Мазина Н. М. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.* № 3, 92, 1967.
10. Мазина Н. М., И. И. Рассохина. — *Вопр. ревматизма*, № 1, 8, 1966.
11. Мазина Н. М., М. И. Ундринцов, В. Д. Ахназарова, М. С. Русева, Т. В. Мельникова. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, № 9, 38, 1969.
12. Мульдьяров П. Я., Н. М. Мазина, Г. Г. Павлов, Т. В. Мельникова. — *Кардиология* № 6, 3, 1971.
13. Рассохина И. И., А. С. Капланский, А. А. Тустановский. — *Вопр. ревматизма* № 2, 11, 1967.
14. Сисенко В. И., Л. А. Бурова, Л. С. Косицкая, III Всесоюзная конференция по иммунопатологии. Ленинград, 81, 1969.
15. Тустановский А. А. В кн.: Современные проблемы ревматологии, 34, 1965.
16. Halbert S. P., S. E. Holm, A. Thompson — *J. Exp. Med.*, 123, 3613, 1968.

17. Halpern B., J. Goldstein, L. Robert.— *La presse med.* 75, 5, 209, 1967.
18. Kaplan M. H. — *Bull. Rheum. Dis.*, 19, 9, 560, 1969.
19. Kaplan M. H., M. Meyesian. — *Lancet*, 1, 7332, 706, 1962.
20. Kyogoqu. — *Acta path. Jpan*, 18, 3, 297, 1968.
21. Markowitz A. S., C. F. Lange.— *Lab. Clin. Med.*, 60, 1001, 1962.
22. Markowitz A. S., C. F. Lange. — *J. Immunol.* 92, 565, 1964.
23. Massel B., L. H. Honikman, J. Amezcua. — *J. Amer. med. Ass.*, 207, 6, 1115, 1969.
24. Nakhla L. S., L. E. Glynn. — *Immunol.*, 13, 209, 1967.
25. Rapaport F. T., R. M. Chase. — *Science*, 3630, 407, 1969a.
26. Rapaport F. T., A. S. Markowitz, R. T. McCluskey. — *J. Exp. Med.*, 129, 623, 1969.
27. Sandson J., D. Hamerman. — *Arthritis a. Rheumat*, XI, 1, 115, 1968.
28. Zabriskie J. B., K. C. Asu, B. C. Seegal. — *Clin. Exp. Immunol.*, 7, 147, 1970.
29. Zabriskie J. B., E. H. Freimer.— *J. Exp. Med.*, 124, 4, 661, 1966.
30. Zih S. Thoma. — *Humangenetik*, 4, 42, 1968.

ON THE HETEROGENIC HEART-TISSUE ANTIGENS SHARED WITH HEMOLYTIC STREPTOCOCCI

N. M. Mazina

Institute of Rheumatology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow, USSR

SUMMARY

The existence of an antigen, shared by human heart-tissue and hemolytic streptococcus group A has been demonstrated. The common antigen was differentiated from the Forssman antigen and from the admixed animal proteins by the culture medium, on which the streptococcus strain was cultivated. The common antigen is related to the group of heart organ-specific antigens; it is bound to the hyaloplasm proteins.

The protracted action with an antiserum to type 5-streptococcus which contains an antigen shared by heart tissue initiates an autoimmune reaction, accompanied by morphologic alterations in the cardio-vascular system, disturbances in the myocardial lysosome apparatus, increased fibroblastic activity and augmentation of the collagen bundles. The same experimental model was applied for testing antiserum to type-12-A-streptococcus, deprived of this common antigen, as well as antisera against other microorganisms and normal rabbit serum. No similar immunologic and morphologic reactions in the cardio-vascular system were observed.

ИЗУЧЕНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ ГЕТЕРОГЕННЫХ АНТИГЕНОВ

Н. Н. ЖУКОВ-ВЕРЕЖНИКОВ, Г. М. БОЧКО, Н. И. РЫБАКОВ

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Гетерогенные антигены или антигены «мимикрии», т. е. сходные для тканей человека и животных и микроорганизмов, являются в настоящее время предметом разностороннего исследования. Изучение их проводят в направлении исследования биохимических особенностей антигенной общности микроорганизмов и клеток человека и животных (14), выявления их роли в трансплантационном иммунитете (11) и в инфекционной патологии (10). Гетерогенные антигены обнаруживают у многих возбудителей инфекционных заболеваний (1, 2, 9, 13). Их наличие в составе патогенных микробов имеет немаловажное значение для изучения механизмов патогенеза, диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Значительный интерес в этом плане представляет вопрос об антигенных субстанциях, общих для тканей человека и возбудителей особо опасных инфекций. В 1944 г. Н. Н. Жуков-Вережников и Г. Гусева обнаружили антиген, общий для эритроцитов человека и чумного микроба (6).

На основании этих данных впервые была высказана гипотеза о том, что наличие гетерогенного антигена в составе возбудителя чумы способствует повышению его вирулентности, т. к. у организма снижается возможность различать «свое и чужое» (антигенная мимикрия) (5). Этим можно объяснить слабую антигенную активность чумного микроба и медленное развитие иммунитета в процессе инфекции, что оказывает влияние на конечный исход заболевания у человека (6).

Такое предположение правомерно также и для других возбудителей инфекционных заболеваний.

При изучении различных штаммов грамотрицательных видов бактерий в их составе были обнаружены антигенные субстанции, сходные с тканями человека и животных (таблица 1).

Подробные методики исследования приведены в наших предыдущих работах (1, 8).

Т а б л и ц а 1

Выявление гетерогенных антигенов у различных штаммов грамотрицательных видов бактерий

Вид микроорганизмов	Гетерогенные антигены	Авторы
<i>P. pestis</i>	Эритроциты человека, печень и селезенка морской свинки	Н. Н. Жуков-Вережников, Г. Гусева, 1944; Н. Н. Жуков-Вережников, 1945, 1948; Н. Н. Жуков-Вережников, А. К. Адамов, П. И. Анисимов, Г. М. Бочко, И. И. Подоплелов, Н. С. Гончарова, З. Н. Карасева, И. И. Щуркина, 1972.
<i>V. cholerae</i>	Эпителий тонкого кишечника человека	Н. Н. Жуков-Вережников, А. К. Адамов, П. И. Анисимов, Г. М. Бочко, И. И. Подоплелов, Н. С. Гончарова, З. Н. Карасева, И. И. Щуркина, 1972.
<i>V. El-Tor</i>	Эпителий тонкого кишечника человека	
<i>E. coli</i>	Антигены человека типа АВО	Г. М. Бочко, И. В. Голубева, Н. И. Шатровская, Е. В. Стрелец, А. И. Байкова, 1971.
<i>Sh. sonnei</i>	Антигены человека типа АВО	Г. М. Бочко, Е. В. Стрелец, Н. И. Рыбаков, А. И. Байкова, 1972.

Обращает на себя внимание факт обнаружения гетерогенных антигенов в вакцинных штаммах *P. pestis* (EV5, Otten).

Анализ литературных данных показывает, что вакцинные штаммы *P. pestis* содержат антигены, сходные с группоспецифическими антигенами человека. Ряд авторов отмечают зависимость наличия гетерогенных антигенов в некоторых микроорганизмах, в том числе и *P. pestis*, от состава используемой питательной среды. При выращивании вакцинного штамма *P. pestis* на среде с содержанием пептидов и пептонов животного происхождения в коммерческой вакцине был обнаружен антиген, сходный с антигеном человека типа А, в то время как при использовании среды с пептидами и пептонами растительного происхождения гетерогенный антиген не выявлялся (12).

Таким образом, вопрос о гетерогенных антигенах приобретает особое значение при приготовлении вакцинных препаратов. Их наличие нельзя не учитывать в практической работе эпидемиологов и инфекционистов при вакцинации штаммами микроорганизмов, содержащих гетерогенные антигены. Как известно, одним из решающих факторов иммуногенности вакцин является их чужеродность. В 1932 г. Н. Н. Жуков-Вережников указывал на то, что слабо выраженная чужеродность у отдельных видов микробов является основным препятствием на пути развития вакцинно-сывороточного дела (3). Анализируя причины затруднений, возникающих во время вакцинации, нельзя не считаться с возможностью присутствия в организме человека антигенов, родственных антигенам микроба, используемого для приготовления

вакцины (7). Поэтому при подборе вакцинных штаммов необходимо, во-первых, прежде всего производить их контроль на содержание антигенов, сходных с тканями человеческого организма. Во-вторых, следует использовать для выращивания микроорганизмов питательные среды, по возможности синтетические, без примесей субстанций, родственных антигенам человека. И наконец, известные результаты могут иметь дальнейшие попытки активировать микробный антиген, ставший уже в значительной мере неполноценным, путем прибавления к вакцинам «свежих», новых для организма белков.

Решение этих вопросов имеет большое значение для создания эффективных вакцинных препаратов против различных инфекционных заболеваний, в том числе и особо опасных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочко Г. М., И. В. Голубева, Н. И. Шатровская, Е. В. Стрелец, А. И. Байкова. В сб.: Проблемы современной иммунологии. М., Медицина, 1972, 127.
2. Бочко Г. М., Е. В. Стрелец, Н. И. Рыбаков, А. И. Байкова. — *Антибиотики*. 1972, № 2, 135.
3. Жуков-Вережников Н. Н. — *Вестн. микробиол., эпидемиол. паразитол.*, 1932, № 4, 221.
4. Жуков-Вережников Н. Н., Г. Гусева. — *ЖМЭИ*, 1944, № 3, 14.
5. Жуков-Вережников Н. Н. — *ЖМЭИ*, 1945, № 4—5, 34.
6. Жуков-Вережников Н. Н. — *ЖМЭИ*, 1947, № 11, 84.
7. Жуков-Вережников Н. Н. — Труды научной конференции, посвященной 25-летию юбилею института «Микроб», Саратов, 1948, 137.
8. Жуков-Вережников Н. Н., А. К. Адамов, П. И. Анисимов, Г. М. Бочко, И. И. Подоплелов, Н. С. Гончарова, З. Н. Карасева, И. И. Щуркина. — *Бюлл. exper. биол. мед.*, 1972, № 4, 63.
9. Косяков П. Н., З. И. Ровкова. — *Вопр. вирусол.*, 1965, № 4, 17.
10. Asherson G. *Progress in allergy*. 1968, 12, 132.
11. Chase R., F. Raper. — *J. Exp. Med.*, 1965, 122, 721.
12. Luzzio A. J. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1969, 131, 853.
13. Springer G. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1970, 169, 1347.
14. Williamson P., G. Springer. — *Fed. Proc.*, 1959, 18, 604.

STUDIES ON SOME VACCINAL STRAINS OF MICROORGANISMS WITH REGARD TO THE PROBLEM OF HETEROGENIC ANTIGENS

N. N. Zhoukov-Verezhnikov, G. M. Botchko, N. I. Ribakov

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The heterogenic antigens of several gram-negative microorganisms, including *P. pestis*, *V. cholerae*, *V. El-Tor*, *E. coli* and *Sh. sonnei* have been studied. The importance of the microbial heterogenic antigens in relationship to the vaccine and serum production is discussed.

ГРУППОВЫЕ АНТИГЕНЫ В КУЛЬТИВИРОВАННЫХ IN VITRO КЛЕТКАХ СЕРТОЛИ

С. М. ЖИВКОВ, Р. П. ПОПИВАНОВ, Т. И. ЕВРЕВ, И. Д. БУЛАНОВ, Л. Н. РУСЕВ

Кафедра общей биологии Медицинской академии, София

Человеческие сперматозонды обладают способностью устойчиво адсорбировать антигены системы АВ0 (Н), содержащиеся в семенной плазме доноров (1). Кроме таких приобретенных антигенов, они обладают и собственными групповыми антигенами: это доказывается фактом, что эпидидимные сперматозонды и сперматозонды несекреторов содержат групповые антигены (2, 5). Существует возможность получения этих антигенов путем адсорбции, происходящей в яичке.

Это дало нам основание для попытки выявить групповую принадлежность сертолиевых клеток, в цитоплазме которых сперматиды превращаются в сперматозонды. Конечно присутствие групповых антигенов в сертолиевых клетках не означает, что они могут передаваться сперматозоидам, но обнаружение этих антигенов было бы шагом вперед к разрешению все еще спорного вопроса о существовании собственных групповых антигенов как результата протекающего в сперматозоидах биосинтеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культуры сертолиевых клеток были получены из яичек покойников с группами крови А, В, АВ и 0 по методу Кодани (4).

Цитологичную идентификацию вырастающих в культурах клеток проводили на покровных стеклах после фиксации в алкоголь-уксусной кислоте (3 : 1) и окрашивания препаратов по Харрису.

Часть культур была исследована на групповые антигены системы АВ0 посредством теста подавления агглютинации и смешанной агглютинации (3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из поставленных 21 опыта для культивирования человеческих клеток Сертоли 12 были успешными, из них иммунологически были исследованы 7.

Цитологическим исследованием установлено, что форма культивированных клеток очень разнообразна — треугольная, полигональ-

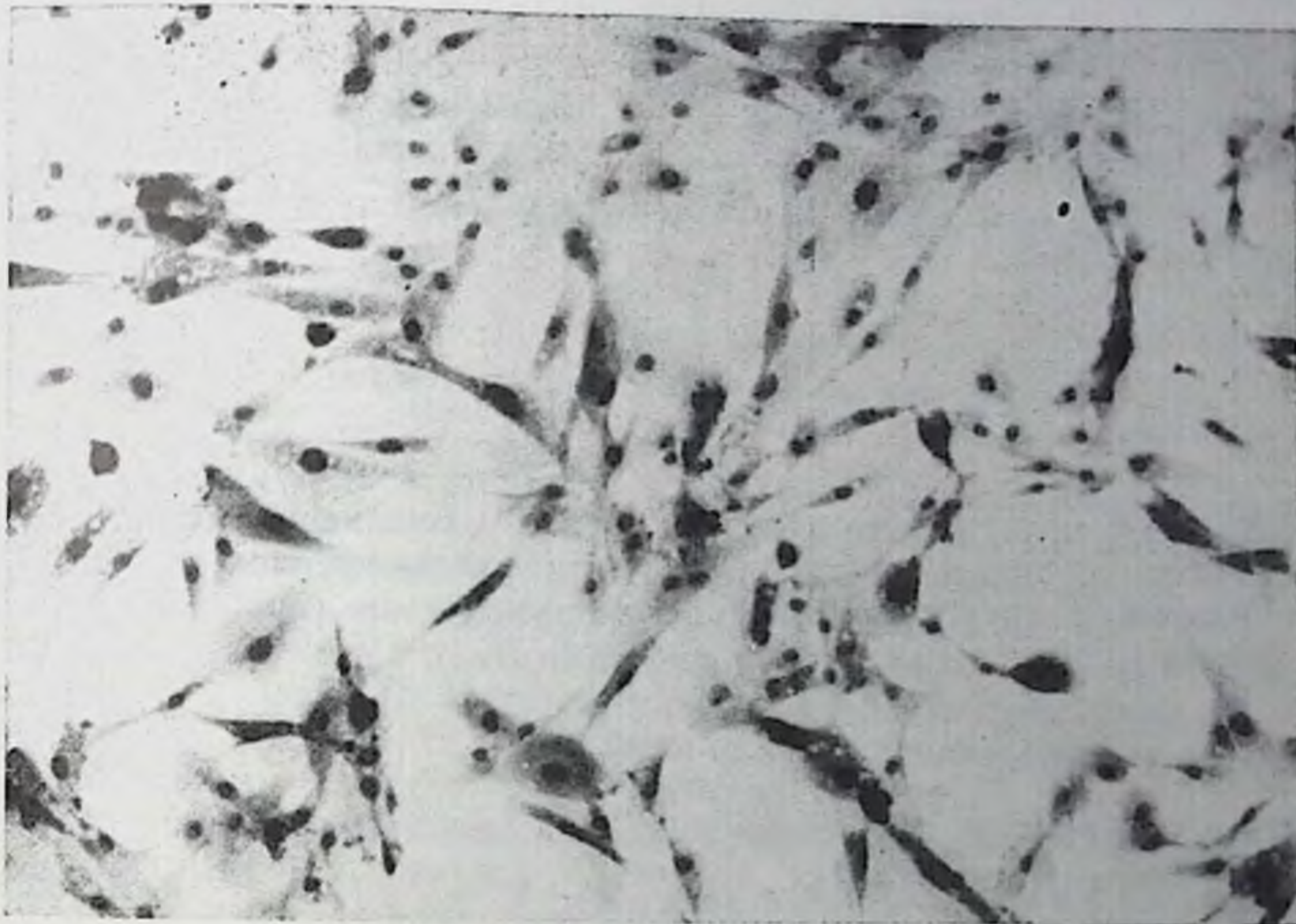


Рис. 1. Монослойная культура клеток Сертоли человека. Третий пассаж; 42 дня после начала инкубации.

ная, круглая и веретенообразная (рис. 1). У них часто наблюдается веероподобный вырост с несколькими полулунными выемками по краю. Цитоплазма клеток пенообразная, содержит много гранул и часто образует значительные по размерам вакуоли. Вокруг ядра почти всегда наблюдается зона просветления. Ядра клеток преимущественно или слегка овальные, реже — удлиненные. В некоторых случаях отмечаются сморщенность и дольчатость ядер. В кариоплазме наблюдается большое ядрышко, несколько кариосом и гетерохроматическая сеть, образования из нитей и гранул разных размеров.

Описанные морфологические признаки соответствуют морфологическим признакам клеток Сертоли в культурах из яичек крыс (4) и морских свинок (6). Это дает нам основание считать, что клетки в полученных нами культурах человеческих яичек принадлежат к тому же клеточному типу.

Результаты иммунологических исследований на наличие групповых антигенов системы АВО (Н) в монослойной культуре человеческих клеток Сертоли (в первичных культурах и после пересева до третьего пассажа), представлены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Групповые антигены в культивированных человеческих клетках Сертоли, исследованные посредством абсорбции анти-А и анти-В сывороток с титром 1:32 и посредством смешанной агглютинации

Число случаев	Группа крови умершего	Титр сывороток после абсорбции		Смешанная агглютинация с эритроцитами		
		Анти-А	Анти-В	А	В	О
3	А	2	32	+	—	—
2	В	32	0	—	+	—
1	АВ	2	0	+	+	—
1	0	32	32	—	—	—

Из таблицы видно, что путем абсорбции и смешанной агглютинации в культивированных клетках Сертоли доказаны групповые антигены, одинаковые с групповыми антигенами умерших, из яичек которых получена культура.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попиванов Р., Т. Еврев и Т. Ананиев — *Акуш. и гинекол.*, 1, 1968, 33.
2. Попиванов Р., Ил. Щъркалев, Т. Евреви др. — *Акуш. и гинекол.*, 1, 25, 1968.
3. Edwards R. G., L. C. Ferguson and R. R. A. Coombs. — *J. Reprod. Fertil.*, 7, 1964, 153.
4. Kodani M., K. Kodani. — *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 56, 1966, 4, 1200.
5. Popivanov R., I. Starkalev, T. Evrev and T. Ananiev. In: *Proc. Intern. Symp. Immunol. Spermatozoa, Varna, Bulgaria, 1967*, 53.
6. Russell T. S. Katsh N. Stackelburg. — *Nature*, 192, 1961, 1053.

GROUP ANTIGENS IN *IN VITRO* CULTIVATED SERTOLI CELLS

S. N. Zhiukov, R. P. Popivanov, T. I. Evrev, I. D. Boulanov, L. N. Roussev

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria

SUMMARY

Monolayer cultures of Sertoli cells, obtained from testes of deceased persons have been prepared. Using the inhibition-agglutination test and the mixed agglutination test it was proved that the Sertoli cells possess group antigens of the ABO (H) system, which correspond to the blood group of the deceased person, from whom the cell-culture-material was obtained.

НАСЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА СЕКРЕТИРОВАННЫХ СЛЮНОЙ АВН-АНТИГЕНОВ (ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРОВЕДЕННЫЕ НА БЛИЗНЕЦАХ)

Ц. СЫРНЕВА

(Республиканский НИИ скорой медицинской помощи им. Пирогова, София)

Исследования, проведенные на сиб-парах* (3) и их семьях (2, 5), показали, что количество секретированных слюной группоспецифических антигенов контролируется отчасти генетическим путем. Кроме того, установлено, что количество АВН-антигенов в слюне одного индивида, исследуемого в различные часы суток и через продолжительные интервалы времени, отличается удивительным постоянством (4, 1). Объяснением этого факта может быть наличие генетического контроля количественного секретирования этих антигенов.

Настоящая работа имеет целью изучить этот вопрос посредством более прецизионного метода близнецов, так как полученные до сих пор данные недостаточно убедительны (6). Если количество секретруемых слюной группоспецифических антигенов определяется наследственными факторами, то можно ожидать, что у однойцевых близнецов оно будет одинаковым, а у двуяйцевых близнецов, которые могут обладать как одинаковой, так и различной наследственностью, это количество чаще всего будет различным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы слюны брали одновременно от каждой сравниваемой пары, центрифугировали и полученную жидкость кипятили в течение 10 мин на водяной бане. Готовые пробы сохраняли в холодильнике до начала исследования, проводимого на следующий день.

Сборные тест-сыворотки использовали после стандартизации по методу Clarke и соавт. (3).

A₁, A₂, B и 0 тест-эритроциты получали от одних и тех же доноров.

* Сибси — дети одних и тех же родителей.

Количественное исследование А, В и Н антигенов в слюне проводили по методу Wiener (7) с продолжением времени инкубации по Clarke и соавт. (3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По количественному методу ингибирования гемагглютинации было исследовано 180 пар близнецов. Из них 106 были сравнимыми — секреторы одной и той же группы и под группы; 56 — однояйцевыми и 50 двуяйцевыми.

Для более наглядного представления данных и для удобства при статистическом анализе титры АВН-антигенов преобразовали в \log_2 с переменной знака.

На рис. 1 представлены преобразованные величины титра Н-антигена для близнецов группы 0. Каждая пара означена кружком, у которого ордината равна титру первого близнеца и абсцисса равна титру второго близнеца. Через полученные для однояйцевых близнецов точки (плотные кружки) можно провести прямую линию с угловым коэффициентом равным единице, тогда как для двуяйцевых близнецов (помеченных пустыми кружками) получается сравнительно большой разброс точек около этой прямой. Такие же результаты

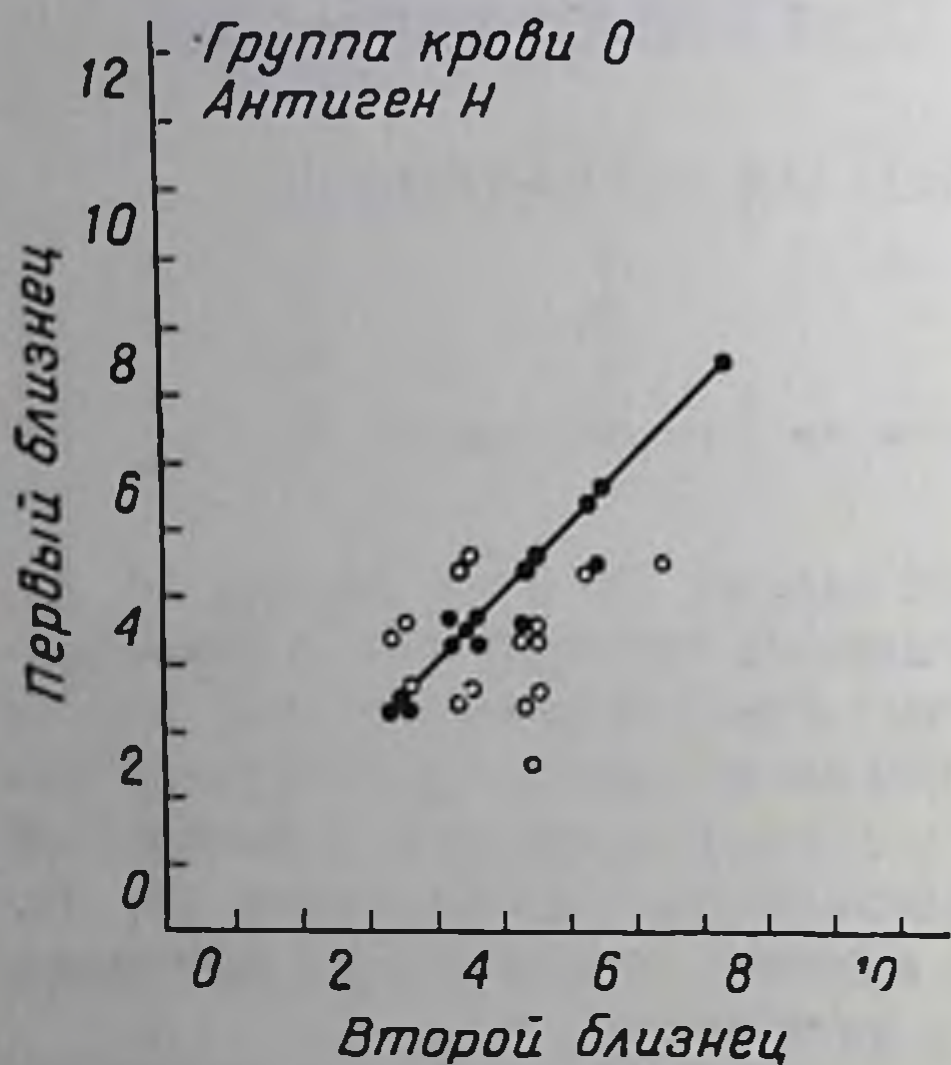


Рис. 1. Титры ингибиции ($-1.\lg_2$) антигена Н слюны близнецов с группой крови 0;

● — однояйцевые пары;
○ — двуяйцевые пары

получаются при графическом выравнивании антигенных соотношений между близнецами группы крови А — антиген А и Н (рис. 2) и группы крови В — антигены В и Н (рис. 3). Несмотря на большой разброс, из рисунков видно, что у двуяйцевых близнецов также имеется тенденция к пропорциональности между титрами антигенов у обоих близнецов, хотя и менее четко выраженная. Учитывая, что двуяйцевые близнецы могут обладать одинаковой наследственностью в отношении того или иного признака (в данном случае количество секретированных слюной группоспецифических антигенов), указанная тенденция вполне закономерна.

Средние арифметические величины разностей в преобразованных значениях титров А, В и Н антигенов у однояйцевых и двуяйцевых близнецов сопоставлены с соответствующими величинами 170 неродственных контрольных пар в таблице 1. Из таблицы видно, что у однояйцевых близнецов средняя разница титров незначительна, у двуяй-

цевых она почти в 10 раз больше, а у неродственных контрольных пар выражена более всего.

Статистический корреляционный анализ данных представлен в таблице 2. Из таблицы видно, что коэффициенты корреляции А, В и Н антигенов одноййцевых близнецов положительны и отличаются от единицы незначительно. Почти все коэффициенты имеют высокую статистическую достоверность ($P < 0,001$).

Коэффициенты корреляции у двуяйцевых близнецов также положительны, но их значения много ниже, чем у одноййцевых, и они ста-

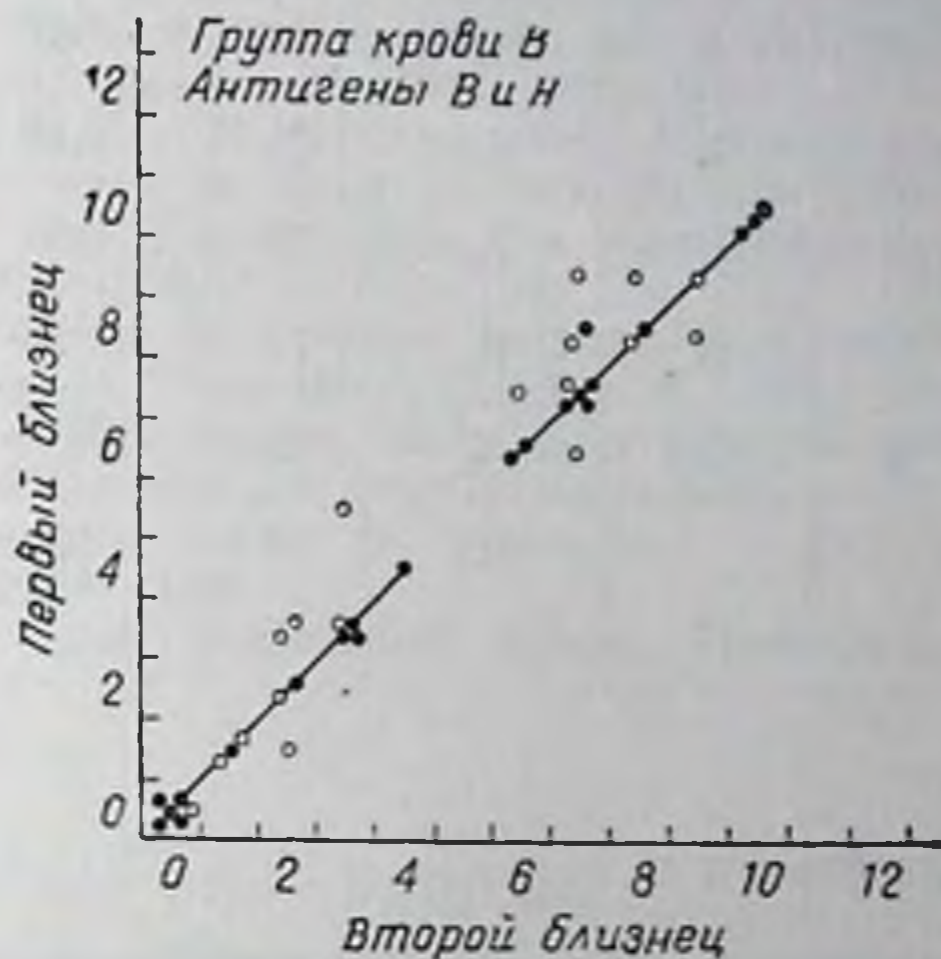
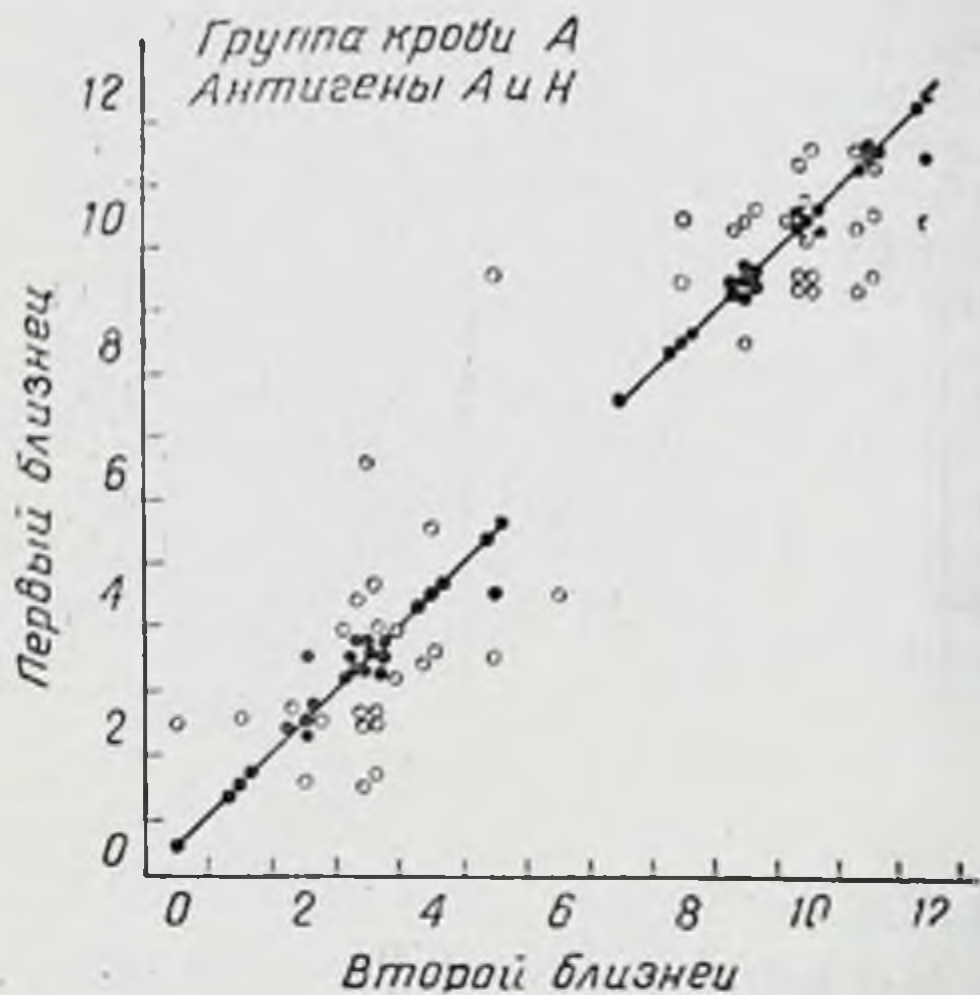


Рис. 2. Титры ингибиции ($-1.lg_2$) антигенов А и Н в слюне близнецов с группой крови А;

● — одноййцевые пары;
○ — двуяйцевые пары.

Рис. 3. Титры ингибиции ($-1.lg_2$) антигенов В и Н в слюне близнецов с группой крови В;

● — одноййцевые пары;
○ — двуяйцевые пары.

статистически недостоверны, за исключением коэффициента корреляции Н-титров у близнецов группы В.

У неродственных контрольных пар коэффициенты корреляции весьма слабо отличаются от нуля, а их значения для Н-антигена в группе А и для В и Н-антигена в группе В отрицательны.

Из проведенного анализа видно, что у неродственных пар не существует корреляции между титрами секретированных слюной А, В и Н-антигенов. У двуяйцевых пар близнецов имеется известная корреляция, особенно ясно выраженная в группе В. Результаты, полученные при изучении остальных групп крови, не являются статистически достоверными, но коэффициенты корреляции в этих случаях больше нуля и превышают коэффициенты у контрольных пар. Это позволяет допустить, что при исследовании большего числа случаев можно ожидать статистически достоверную корреляцию.

Полученные результаты показывают, что существует соответствие в количестве секретированных слюной А, В и Н-антигенов у одноййцевых близнецов, свидетельствующее о наличии строгого генетиче-

Таблица 1

Средняя разница и стандартная ошибка в преобразованных ($-1 \cdot \lg_2$) титров А, В и Н антигенов в слюне однояйцевых и двуяйцевых близнецов и неродственных контрольных пар

Антигены	Группа крови	Тест эритроциты	Однояйцевые близнецы		Двояйцевые близнецы		Контрольные пары	
			№		№		№	
Н	0	0	15	0,13 ±0,09	15	1,13 ±0,21	50	1,46 ±0,15
А	А	А ₁	25	0,16 ±0,07	23	1,39 ±0,27	50	1,68 ±0,16
		А ₂	25	0,04 ±0,04	23	1,22 ±0,19	50	1,42 ±0,11
В	В	В	11	0,09 ±0,09	9	0,78 ±0,21	50	1,34 ±0,14
А	АВ	А ₁	5	0,00 ±0,00	3	2,00 ±0,66	20	1,45 ±0,19
		А ₂	5	0,00 ±0,00	3	1,33 ±0,35	20	1,37 ±0,20

Таблица 2

Коэффициенты корреляции преобразованных ($-1 \cdot \log_2$) величин титров АВН антигенов у однояйцевых и двуяйцевых близнецов и у неродственных контрольных пар

Исследованные пары	Группа крови	Число пар	Антиген	Коэффициент корреляции	Уровень статистической значимости
Однояйцевые близнецы	0	15	Н	0,96780	P < 0,001
	А	25	А ⁺	0,99040	P < 0,001
	В	11	Н	0,96230	P < 0,001
			В	0,98252	P < 0,001
			Н	1,00000	P < 0,001
Двояйцевые близнецы	0	15	Н	0,27843	P > 0,05
	А	23	А	0,18244	P > 0,05
	В	9	Н	0,34862	P > 0,05
			В	0,50549	P > 0,05
			Н	0,85348	P < 0,001
Контрольные неродственные пары	0	50	Н	0,01346	P > 0,05
	А	50	А	0,03452	P > 0,05
	В	50	Н	-0,05248	P > 0,05
			В	-0,00234	P > 0,05
			Н	-0,03185	P > 0,05

† А-антиген исследован тест-эритроцитами А₂.

ского контроля над количеством секретированных антигенов. Таким образом, степень секретирования является наследственным количественным признаком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сърнева - Накова Ц. — Иммуногенетични проучвания върху АВН-антигените в човешката слюнка. Дисерт. София, 1971.
2. Ваег Н., Н. W. Клоерфер, U. Rasmussen. The Immunochemistry and genetics of blood group O. II. A study of the secretion of blood group A, B and O (H) substances in the saliva of family groups using precipitating antibody prepared in chickens. — *J. Immunol.*, 87, 1961, 342—350.
3. Clarke C. A., R. B. McConnell, P. M. Sheppard. A genetical study of the variations in ABH secretion. — *Ann. Hum. Genet. (Lond)*, 24, 1960, 295—307.
4. Lehrs H. Über gruppenspezifische Eigenschaften des menschlichen Speichels. — *Ztschr. Immunitätsforsch.*, 66, 1930, 1/2, 175—195.
5. Plato C. C., H. Gershowitz. Differences between families in the amount of salivary H substances. — *Ann. Hum. Genet. (Lond.)*, 26, 1962, 47—50.
6. Russo G., S. D. 'Agostino. Osservazioni sulla secrezione di sostanze gruppo-specifiche A, B, H. Nota I. Frequenze dei fenotipi «secretore» e «non secretore». Distribuzione delle sostanze nella saliva dei «secretori». — *Riv. Emot. Erap. ed. Immunoematol.*, 11, 1964, 161—182.
7. Wiener A. S. Blood Groups and Transfusion. 3rd ed., Thomas, Lond., 1946.

QUANTITATIVE INHERITANCE OF THE ABH-ANTIGENS SECRETED WITH SALIVA

Ts. Sarneva

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria

SUMMARY

Saliva samples from 56 pairs of homozygous and 50 pairs of heterozygous tweens, have been studied by the hemagglutination-inhibition method. It was established that the quantity of the A, B and H antigens, secreted with saliva is a hereditary character.

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
И РОЛИ АДСОРБЦИИ БЕЛКОВ

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СПЕРМАТОЗОИДОВ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ HeLa И Tg₃₃

Р. ПОПИВАНОВ, Б. БОТЕВ, В. ВЫЛЧАНОВ, А. ШИНДАРОВ, Л. НАКОВ, К. КИРОВ,
Л. МАРХОЛЕВ, Т. ЕВРЕВ, С. ЖИВКОВ, И. БУЛАНОВ, Л. АНТОНОВ, Л. ВАСИЛЕВА,
Д. ПЕНЕВ.

Кафедра общей биологии Медицинской Академии София, Болгария;

Г. П. ТРИБУЛЕВ И. И. ПОДОПЛЕРОВ, И. А. ГЛИНСКИЙ, В. Г. КРЮКОВ, Ю. И. СУХОВ,
Г. В. КРЮКОВА, И. П. КОСОВА НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В ранее проведенных исследованиях (1, 2, 3, 7) было установлено, что при взаимодействии *in vitro* интактных сперматозоидов человека групп А, В, 0 с клетками человека линий HeLa и Tg₃₃ наблюдается массовый фагоцитоз сперматозоидов, усиливающийся после предварительной обработки сперматозоидов трипсином. Одновременно с этим обнаружено (1), что добавление к смеси клеток со сперматозоидами препаратов гепарина и гиалуронидазы вызывает значительное торможение этого процесса. Торможение фагоцитоза сопровождается удлинением срока сохранения в пассажах новых изоантигенов А и В в HeLa и А в Tg₃₃ (1,2). Для объяснения этого факта было высказано предположение, что в результате контакта сперматозоидов с соматическими клетками в культуре развивается сложный процесс, который, по-видимому, нельзя свести только к спермофагоцитозу. При этом не исключена возможность внесения сперматозоидами в клетку новой генетической информации.

В настоящей работе, с целью углубления предыдущих исследований, были использованы разнообразные способы воздействия на сперматозоиды и культуры клеток, включая применение инактивированного ультрафиолетом вируса Сендай по методике Гарриса и сотр. (10). Известно, что с помощью этой методики удалось *in vitro* получить слияние клеток различных видов животных и человека с образованием гибридных клеток, обладающих генетическими маркерами родителей (6).
Особенность излагаемых ниже экспериментов заключалась в постановке следующих вариантов опытов: 1) с предварительной трипсинизацией (в течение 1 часа при 20°) сперматозоидов группы А и 2)

группы В; 3) с предварительной обработкой сперматозоидов тех же групп препаратами гиалуронидазы («хилаза» и др.); 4) с добавлением инактивированного вируса Сендай; 5) с обработкой экстрактом яичника человека вместе с инактивированным вирусом Сендай. В качестве контролей служили клетки HeLa и Tg₃₃, культивируемые в следующих условиях: 1) с добавлением интактных сперматозоидов группы 0; 2) с обработкой культур препаратами гиалуронидазы; 3) с добавлением к культурам инактивированного вируса Сендай; 4) с обработкой культур экстрактом яичника человека; 5) с добавлением в питательную среду спермальной плазмы секреторов А и 6) В.

Морфологические особенности взаимодействия сперматозоидов и клеток изучали в исходной подопытной культуре и в последующих 10 пассажах с помощью цейтраферной киносъемки и анализа окрашенных гематоксилином Майера цитологических препаратов.

В иммунологических исследованиях подопытных и контрольных культур клеток использовали реакции: 1) смешанной агглютинации — в модификации Кумбса и сотр. (8), Хёгмана (11), Метцгара и др. (12); 2) иммуноадгезии по Фультону (9); 3) РСК; 4) прямой и непрямой иммунофлюоресценции; 5) иммунодиффузии в агаровом геле. При постановке методик прямой и непрямой смешанной агглютинации, иммунофлюоресценции и иммуноадгезии использовали сыворотки анти-А и анти-В от рожениц (с титром 1 : 256—1 : 1024), и моноспецифические сыворотки анти-А кроличьи и анти-В бараньи (с титром 1 : 250 — 1 : 512). Для РСК и иммунофлюоресценции использовали кроличьи антисыворотки к сперматозоидам человека (титр 1 : 1024) и лошадиную анти-HeLa сыворотку (с титром 1 : 512). Для исключения неспецифических результатов перед постановкой опытов культуры клеток выращивали соответственно на средах с человеческой и кроличьей сыворотками.

Морфологический анализ препаратов (от первых часов до 7-го дня взаимодействия и на 2-е сутки в последующих десяти пассажах) и цейтраферная киносъемка (первого-второго дня взаимодействия) обнаружили как отдельные стадии (рис. 1, 2), так и последовательные этапы (рис. рис. 3, 4, 5 и 6) фагоцитоза сперматозоидов клетками HeLa и Tg₃₃. Были отмечены различные варианты захвата интактных сперматозоидов клеткой (см. рис. 3, 4 и 5). Особенно интенсивным был фагоцитоз сперматозоидов, обработанных в течение часа 0,25% раствором трипсина. Уже в первые часы взаимодействия наблюдали интенсивное прилипание (адгезию) сперматозоидов к цитоплазматической мембране клеток (см. рис. 1а), захват головок с ограниченными вокруг них в цитоплазме клетки пищеварительными вакуолями (см. рис. 1б). Описанные ранее (1) количественные исследования показали, что наибольшей интенсивности фагоцитоз достигает к 24—48 часам (особенно в клетках HeLa), а затем к 96 часам, резко ослабевает. Клетки, поглотившие большое количество сперматозоидов, как правило, подвергаются деструкции. К 5—7 суткам взаимодействия и в последующих пассажах разрастается монослой клеток, внешне не отличающихся от контрольных культур.

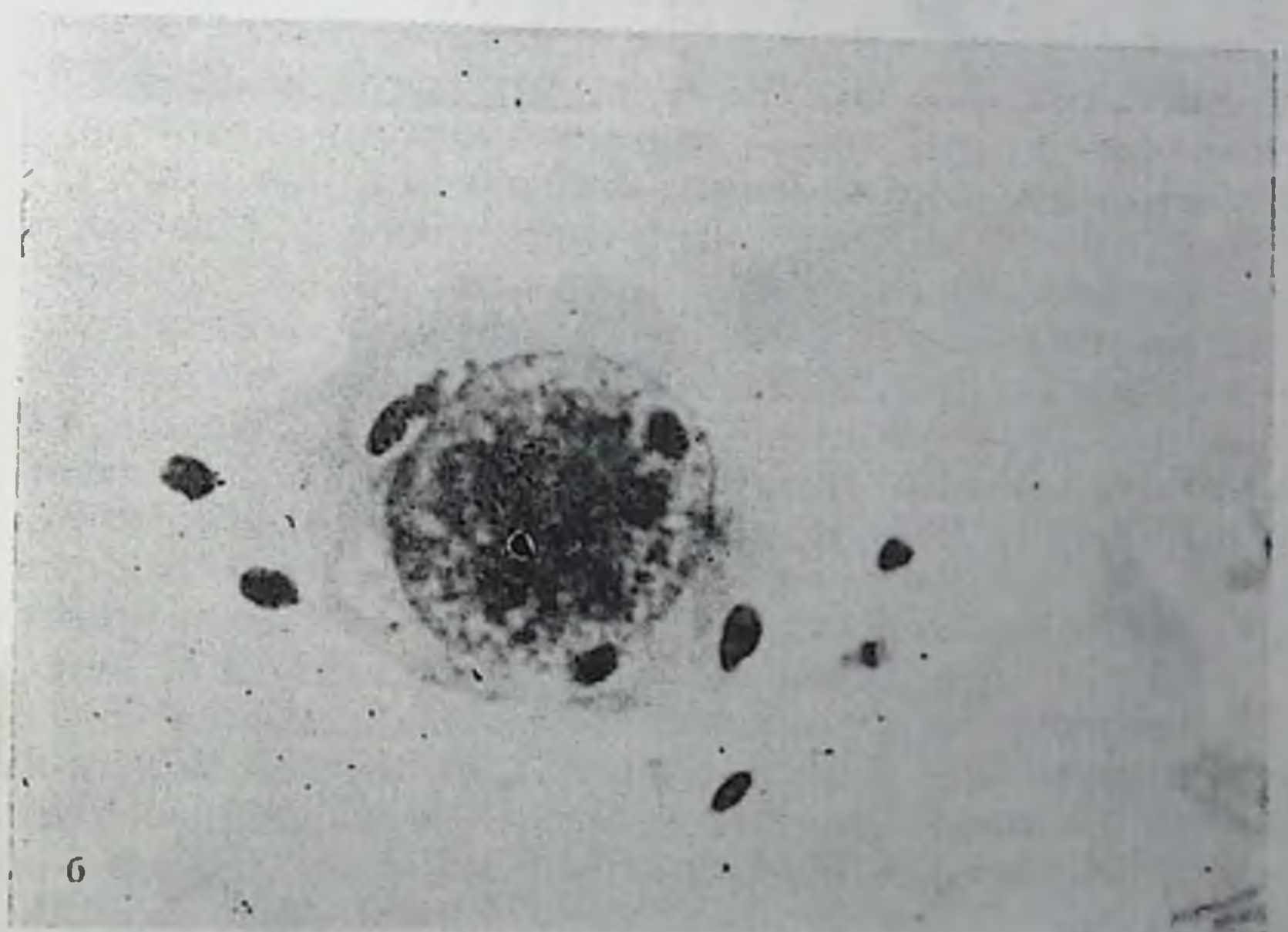
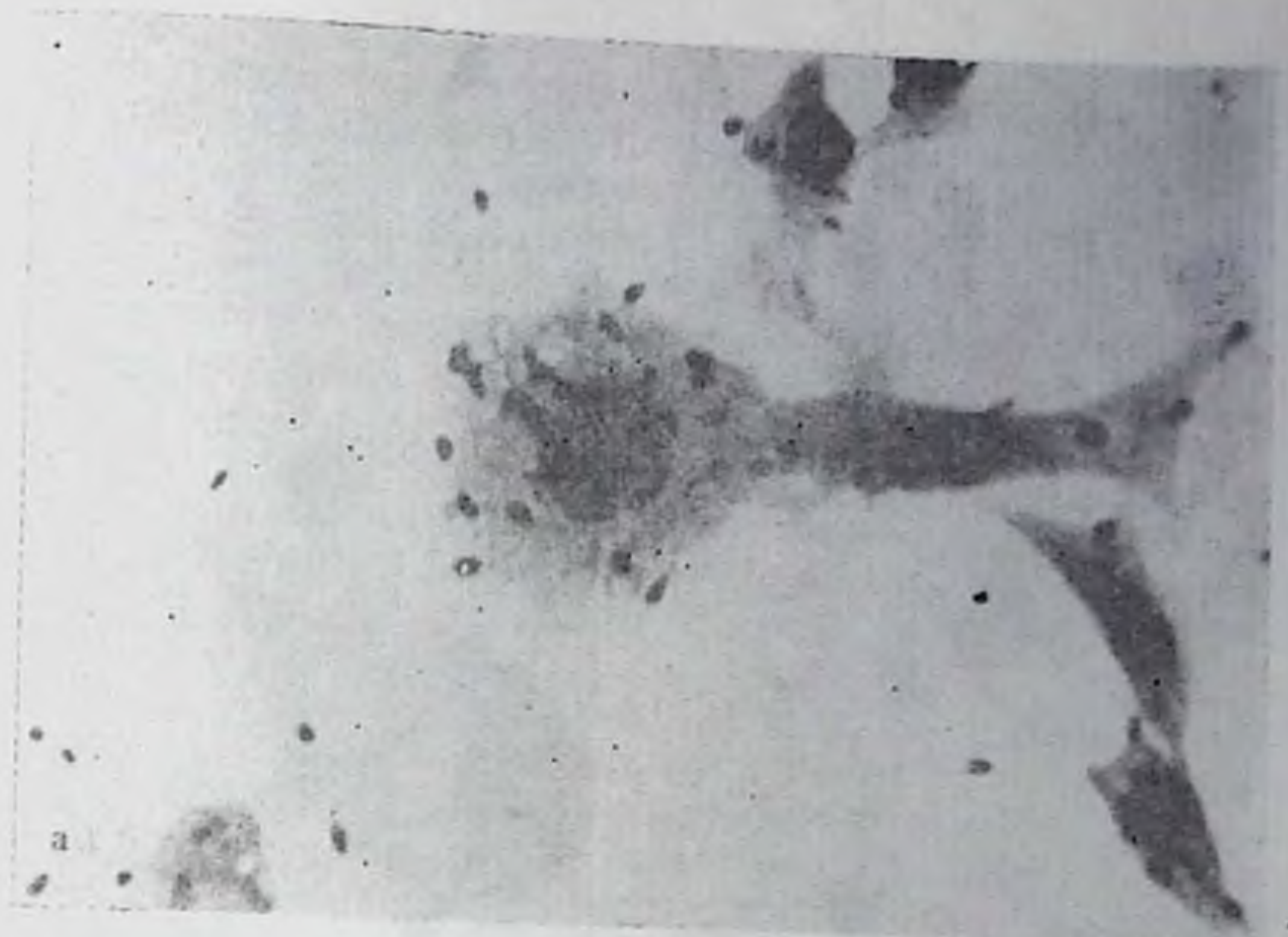


Рис. 1 (а и б). Клетки линии HeLa на второй день роста после добавления трипсиализованных сперматозоидов человека группы А. Фиксация по Буэну. Окраска гематоксилином Майера
 а. Увеличение $\times 900$. Видно интенсивное наличие сперматозоидов на поверхности клеток, а также фагоцитированные сперматозоиды в цитоплазме.
 б. Тот же опыт ($\times 2000$). Видны головки сперматозоидов в фагосомах клетки, просветление хроматина передней части головки наличных сперматозоидов.

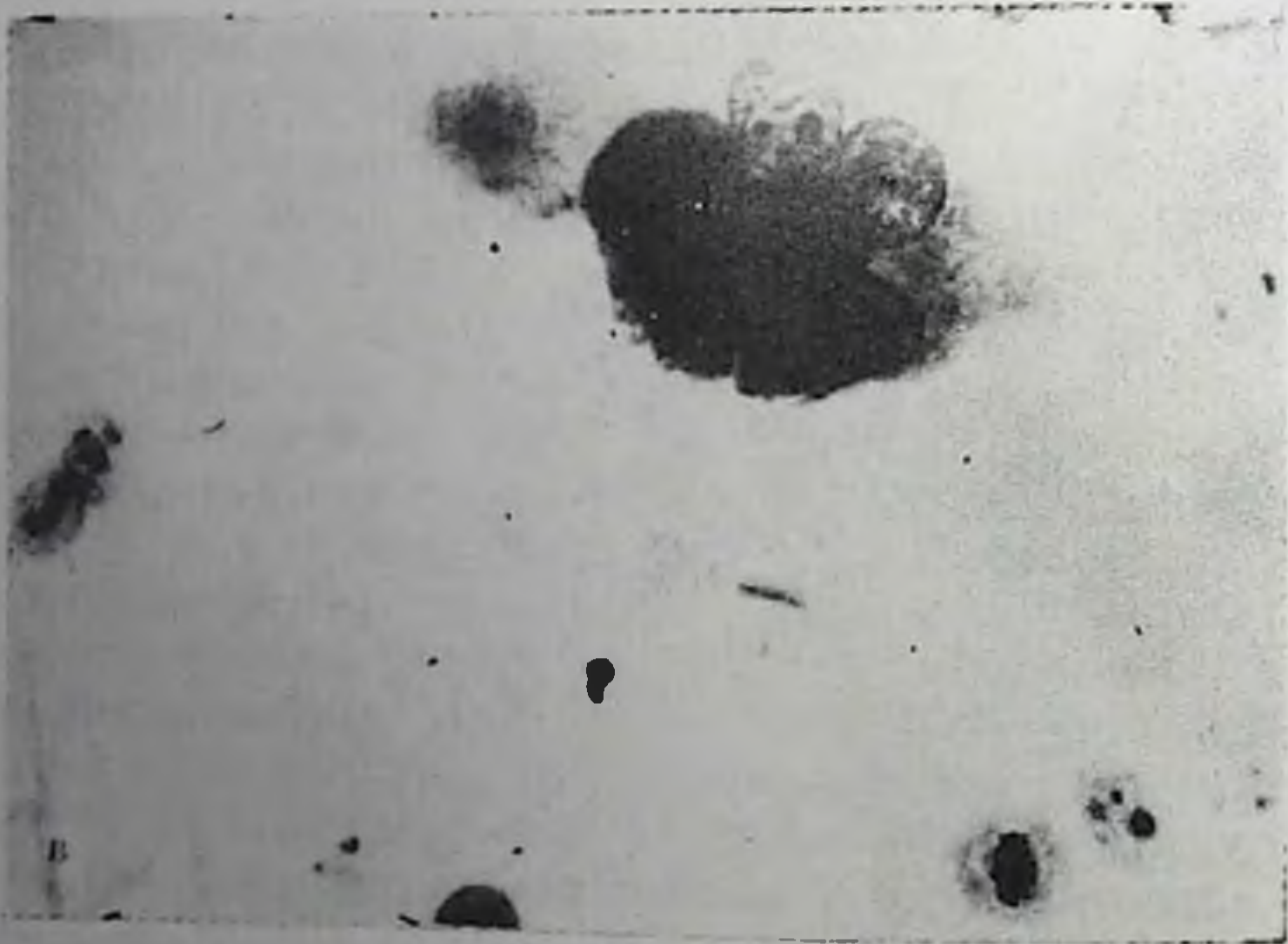
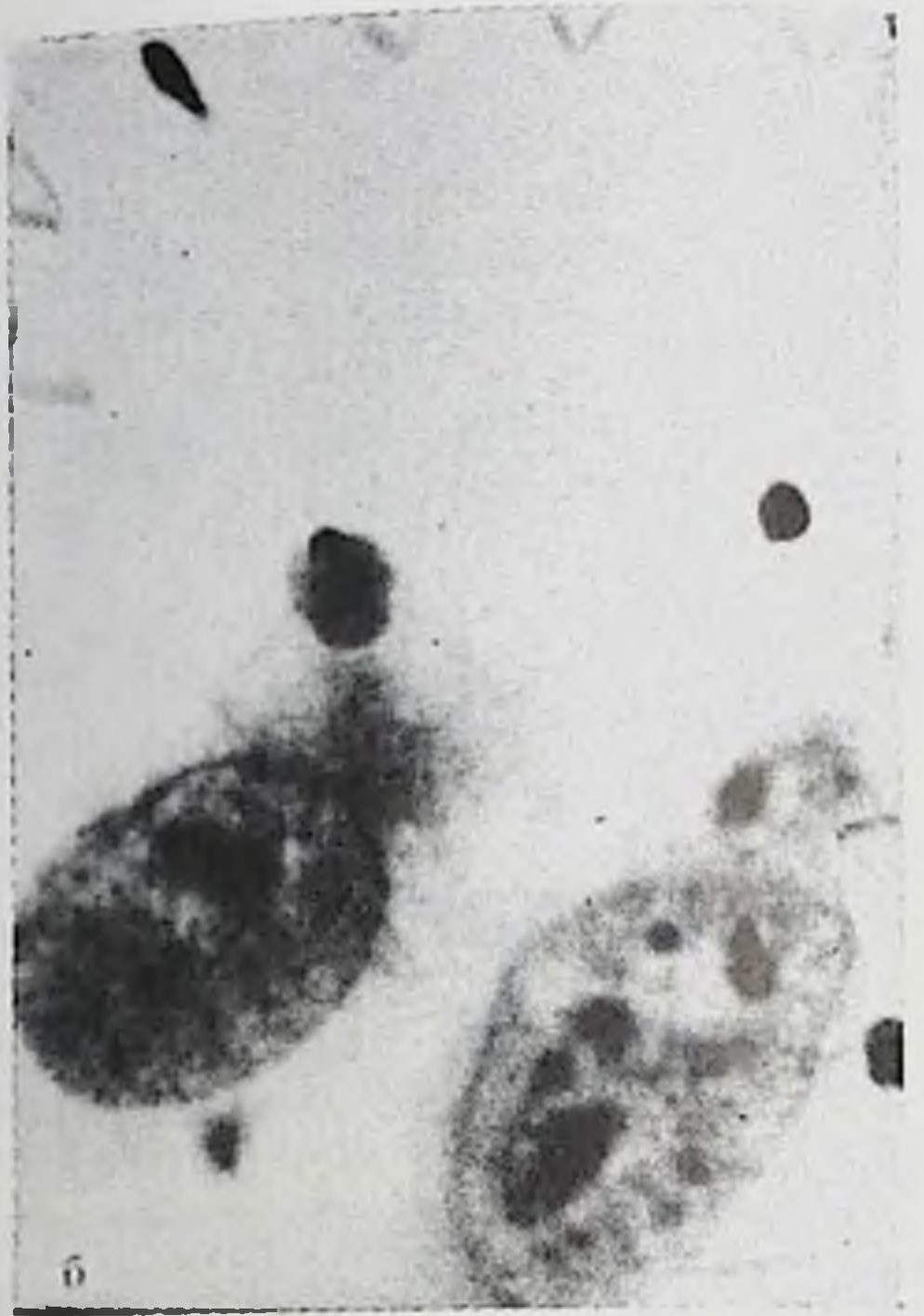
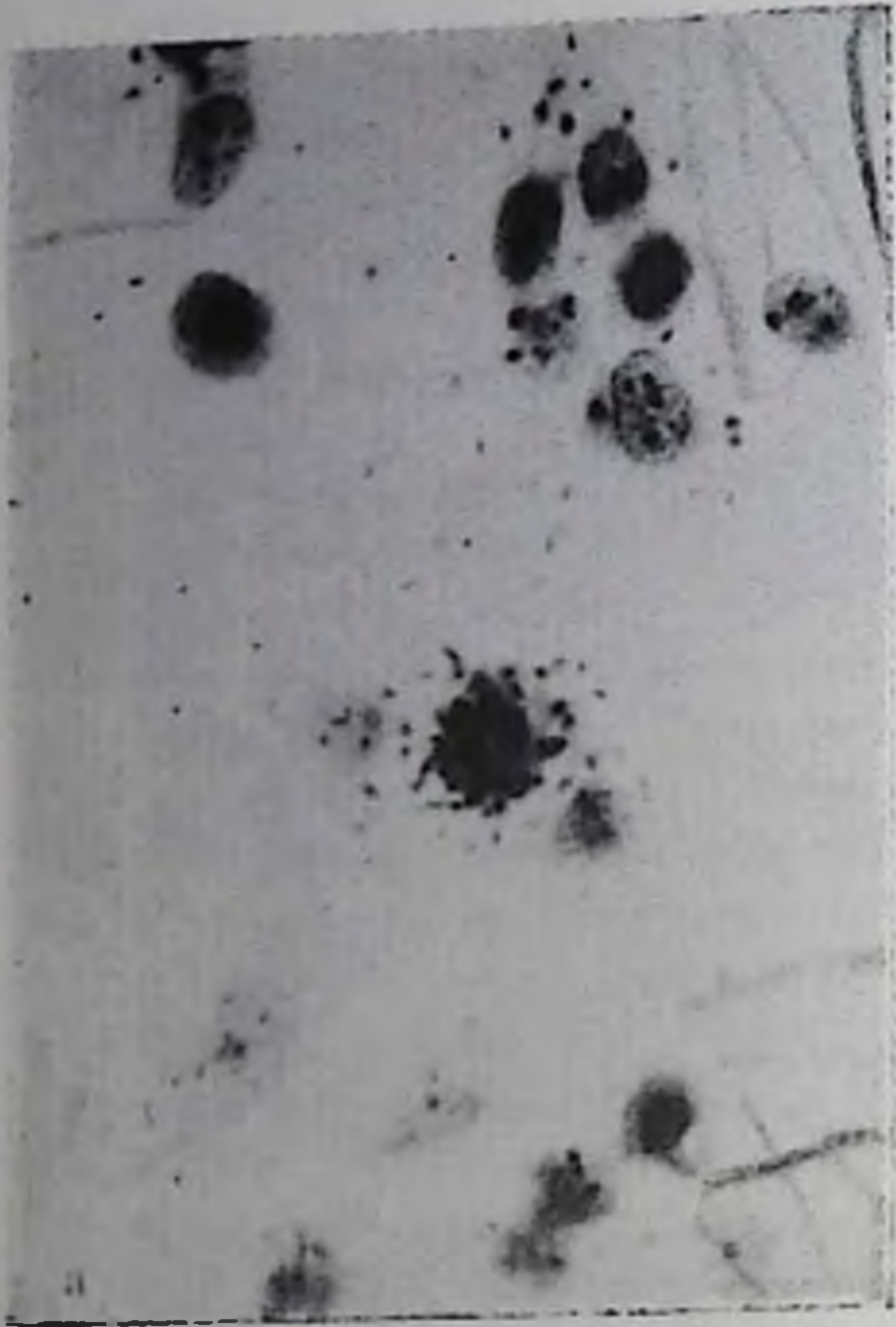


Рис. 2. Клетки линии HeLa на второй день взаимодействия со сперматозоидами человека группы А (в присутствии инактивированного УФЛ вируса Сендай и экстракта яичника человека). (Фиксация и окраска те же, как на рис. 1)

а. Увеличение $\times 900$. Видны сперматозоиды, налипшие на клетки и свободные, а также единичные захваченные клетками.
 б. Тот же опыт ($\times 2000$). Виден сперматозоид с сильно набухшей головкой в цитоплазме клетки.
 в. 2-й пассив. 2 день. Тот же опыт ($\times 900$). Гигантская многоядерная клетка среди клеток обычного размера.

Без обработки сперматозондов трипсином фагоцитоз значительно ослабевает, а при обработке их препаратами гиалуронидазы наблюдали заметное его торможение (1). Торможение спермофагоцитоза с ослабленным образованием пищеварительных вакуолей, выявлено также в опытах с добавлением к взаимодействующим клеткам инактивированного вируса Сендай (см. рис. 2а). Головки спермиев обнаруживаются внутри клеток, причем некоторые из них отчетливо увеличены, а вакуоли вокруг них не всегда отмечаются (см. рис. 2б). В исходной, обработанной вирусом, культуре и в последующих пассажах встречаются многоядерные гигантские клетки (см. рис. 2в), число которых в последующих пассажах постепенно уменьшается. Как правило, в культуре клеток HeLa быстрее наблюдается восстановление интенсивного роста и слабее выражены процессы альтерации клеток, чем в клетках линии Tg₃₃.

Из иммунологических наблюдений особенно демонстративными оказались опыты, в которых для выявления новых групповых антигенов А или В использовали высокочувствительные методики специфической иммуноадгезии и непрямой смешанной агглютинации. В вариантах опытов с добавлением гиалуронидазы и инактивированного вируса Сендай применяли обе вышеупомянутые реакции.

Как было установлено ранее (3), клетки HeLa и Tg₃₃ содержат соответственно антигены групп Н(0) и В. Наблюдения в настоящем исследовании показали, что приобретенные А или В-групповые антигены в клетках HeLa и Tg₃₃ могут быть выявлены в опытах с обработкой гиалуронидазой или инактивированным вирусом Сендай вплоть до 7—9 пассажа (т. е. около 2 месяцев). При постановке опытов с интактными сперматозоидами эти антигены выявляли в клетках культур не более чем в 3—4 пассажах (3, 7), а при добавлении экстракта яичника или спермальной плазмы секреторов А или В — иногда лишь в 1 пассаже (непостоянно). При различных видах обработки культур клеток в контролях живыми сперматозоидами группы 0, трипсилизированными сперматозоидами групп А или В, а также отдельно препаратами гиалуронидазы или вируса Сендай, новых, приобретенных антигенов А или В не выявляли уже в первом пассаже.

На табл. I представлены суммарные результаты иммунологических исследований клеток HeLa и Tg₃₃ в сериях опытов, в которых добавляли инактивированный вирус Сендай и экстракт яичника. Из этих данных видно, что интенсивность обеих реакций начинает ослабевать после 6-го пассажа, но остается слабо положительной (выявляются «розетки») вплоть до 9 пассажа, т. е. до 63 дня от начала взаимодействия.

Таким образом, на основании этих результатов можно сделать заключение, что использование убитых обработкой трипсином сперматозоидов групп А или В в опытах взаимодействия с клетками человека в культуре (линии HeLa и Tg₃₃) приводит к значительному усилению спермофагоцитоза клетками культур без появления на поверхности соматических клеток каких-либо новых изоантигенов А или В. В то же время взаимодействие сперматозоидов человека с такими же



Рис. 3 (а, б, в, г). Последовательные этапы захвата каудальной части сперматозоида клеткой HeLa

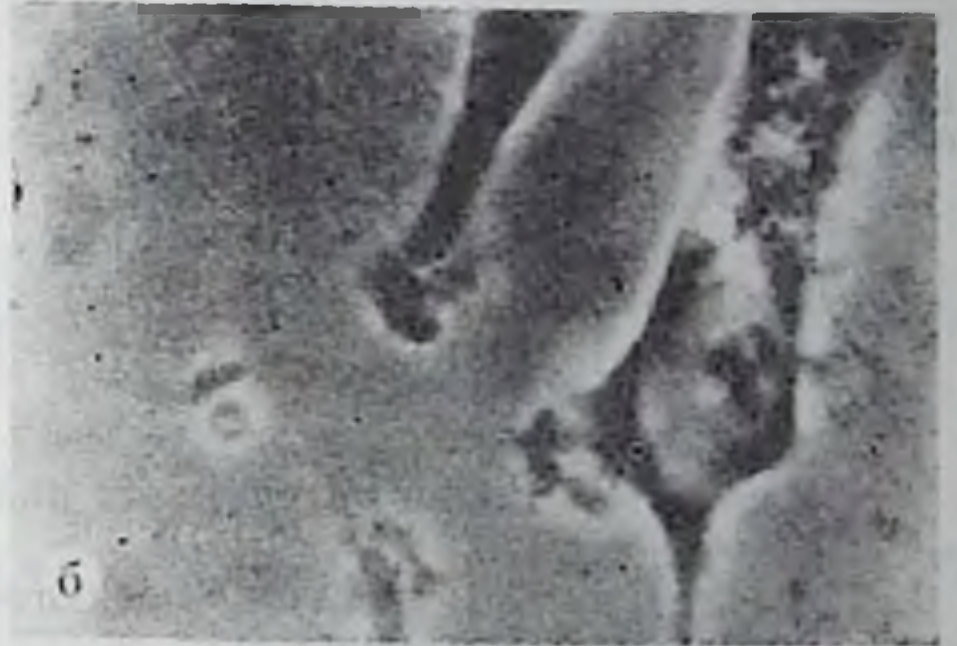


Рис. 4 (а, б, в, слева). Последовательные этапы захвата передней части сперматозоида клеткой HeLa.

Рис. 5 (а, б, справа). Последовательные изменения эктоплазматических отростков клетки HeLa.

Рис. 6 (внизу справа). Охват головки сперматозоида эктоплазматическими отростками.

Кадры центрифужной микрокиносъемки. Фазовый контраст. Вторые сутки взаимодействия. Увеличение $\times 1600$.

Т а б л и ц а 1

Обнаружение А и В-антигенов в клетках культур HeLa и Tg₃₃ после взаимодействия со сперматозоидами человека (суммарные результаты опытов иммуноадгезии и непрямой смешанной агглютинации)

Культура клеток человека (с групповой антиген)	Групповой антиген сперматозоида человека (в сериях опытов)	Групповые антигены клеток культур, выявляемые сыворотками анти-А анти-В (после взаимодействия [*])											
		наименование выявл. в клетках антигена	интенсивность ^{**} реакции в пассажах культур										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
HeLa (0)	A	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—
	B	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tg ₃₃ (B)	A	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	—
	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Взаимодействие в присутствии инактивированного вируса Сендай и экстракта яичника человека.

** Интенсивность реакций обозначена плюсами:

+ («розетки» в 1 пробирке)

++, +++ («розетки» выявлены в 2 и более пробирках)

— (минус) означает отсутствие реакции с сыворотками анти-А и анти-В.

клетками при обработке гиалуронидазой и, особенно, инактивированным вирусом Сендай приводит к появлению на поверхности клеток HeLa или Tg₃₃ новых изоантигенов В или А в соответствии с групповой дифференцировкой добавляемых сперматозоидов. Эти данные о длительном (до 2 месяцев) сохранении таких генетических маркеров, как антигены А или В в клетках подопытных культур свидетельствуют об усилении иммуногенетического взаимодействия в этих условиях и, с нашей точки зрения, подтверждают возможность получения соматической гибридизации клеток в культуре.

В пользу этого объяснения свидетельствуют также некоторые данные литературы (4, 5, 13) о попытках гибридизации *in vitro* соматических клеток со сперматозоидами других видов животных, осуществленные при помощи инактивированного вируса Сендай. Однако в этих исследованиях не учитывалась возможность спермофагоцитоза и не были использованы какие-либо генетические маркеры (антигены и др.) для идентификации гибридных клеток. В нашей работе эти моменты были учтены, причем нами выявлено приобретение клетками культур изоантигенов сперматозоидов (системы АВ0). Безусловно, для изучения механизмов этого процесса необходимо продолжать исследования в данном направлении, что будет способствовать более углубленному пониманию процессов оплодотворения и соматической наследственности у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Подоплелов И. И., И. А. Глинский, В. Г. Крюков, Р. Попиванов, В. Вылчанов, К. Киров, С. Живков, Д. Пенев. — *Докл. БАН*, 1971, **24**, 8, 1101.
2. Подоплелов И. И., Ю. Н. Сухов, И. П. Косова, И. А. Глинский, В. Г. Крюков, Г. М. Бочко, Р. Попиванов, С. Живков, Л. Мархолев, Б. Ботев, Л. Шиндаров, В. Вылчанов, Т. Еврев, Л. Након, И. Буланов, Л. Василева, Л. Антонов. — *Докл. БАН*, 1971, **24**, 11, 1575.
3. Попиванов Р., С. Живков, Л. Након, Г. П. Трибулев, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, В. Г. Крюков. — *Докл. АН СССР*, 1968, **181**, 4, 987.
4. Сенин В. М., И. М. Шапиро. — *Докл. АН СССР*, 1971, **197**, 3, 698.
5. Сенин В. М., И. М. Шапиро. — *Докл. АН СССР*, 1971, **197**, 4, 941.
6. Синискалко М. — *Онтогенез*, 1971, **2**, 2, 115.
7. Трибулев Г. П., И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, В. Г. Крюков, Р. Попиванов, С. Живков, Л. Након. В кн.: Иммунология сперматозоидов и оплодотворения. София, БАН, 1969, 95.
8. Coombs R., D. Bedford, L. Ronillard. — *Lancet*, 1956, **1**, 6921, 461.
9. Fulton F. — *Nature*, 1965, **207**, 5002, 1214.
10. Harris H., J. Watkins, C. Ford, G. Schoeffl. — *J. Cell. Sci.*, 1966, **1**, 1.
11. Högmán C. — *Vox Sang.*, 1959, **4**, 1, 12.
12. Metzgar R., J. Flanagan, C. Zmijewski. — *J. Immunol.*, 1965, **95**, 3, 494.
13. Johnson R., P. Rao, H. Hughes. — *J. Cell. Physiol.*, 1970, **76**, 2, 151.

IMMUNOLOGIC STUDIES ON THE CHARACTER OF THE INTERACTION BETWEEN HUMAN SPERMATOZOA AND HeLa AND Tg₃₃ SOMATIC CELLS IN CULTURES

R. Popivanov, B. Botev, V. H. Vulchanov, L. Shindarov, L. Nakov, K. Kirou, L. Markholev, T. Evrev, S. Zhiukov, I. Boulanov, L. Antonov, L. Vassileva, G. P. Tribulev, I. I. Podoplelov, I. A. Glinsky, V. G. Kryukov, U. N. Soukhov, G. V. Kryukova, I. P. Kossova

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria, and Research Laboratory of Experimental Immunobiology USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The interaction between human somatic cells (cultures of HeLa and Tg₃₃ cell lines) and spermatozoa of donors of group A or B have been studied in different experimental conditions: the spermatozoa, used in these experiments, have been either intact, or preliminarily treated with trypsin and hyaluronidase, or inactivated Sendai virus has been added to them.

It was observed, that the intact spermatozoa are phagocytized by the culture cells. On the other hand, if the spermatozoa have been treated preliminarily with hyaluronidase or with Sendai virus, the spermophagocytosis decreases; along with this under the same conditions, the culture cells for a period of 2 months show the presence of the A or B antigens of the spermatozoa, i. e. the somatic cells acquired the respective blood group antigen of the spermatozoa added to the culture.

Under other conditions — with spermatozoa, treated preliminarily with trypsin — an increase of the spermaphagocytosis is established; at the same time no acquisition of spermatozoa antigens (blood group isoantigens) is observed in the cultured somatic cells.

ОЧИЩЕНИЕ АНТИГЕНОВ МЕТОДОМ «БЛОКАДЫ» ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОЛУЧАЕМЫХ ПРОТИВОТКАНЕВЫХ СЫВОРОТОК

СААКОВ А. К., Г. П. ТРИБУЛЕВ, М. Н. ПЕТРЯШИНА

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Повышение специфичности иммунных сывороток проводится, как правило, двумя путями. Либо истощением полиспецифических сывороток тканями, нативными или подвергнутыми физико-химической обработке, или тканевыми фракциями, «нагруженными» на сорбентах. Либо иммунизацией животных отдельными фракциями тканей с последующим доистощением *in vitro* полученных антисывороток.

В литературе имеются сообщения о возможности повышения специфичности иммунных сывороток введением животным антигенов, у которых блокированы побочные рецепторы соответствующими антисыворотками (Олицкий, 1935; Анатолий, 1957; Карвало, 1963; Ломакин и Соколова, 1963 г. и др.).

Мы разработали метод (1965), при котором происходит «щадящая» очистка тканевого антигена. Он основан на «блокаде» одних белковых компонентов и высвобождении других. Введение подопытному животному такого «очищенного» белка приводит к образованию антисывороток, в которых титр неспецифических антител значительно ниже, чем у контрольной группы животных.

Используя метод «блокады» антигенов, нами была изучена возможность получения повышенной специфичности сывороток против раковой ткани желудка. В этих экспериментах кролики иммунизировались экстрактами раковой ткани, в которых были «блокированы» содержащиеся нормальные антигены человека соответствующей последним антисывороткой. В проведенной работе нами были установлены необходимые количественные соотношения для оптимального истощения из водно-солевого экстракта опухолевой ткани нераковых (побочных) антигенов. В результате соединения определенных объемов экстрактов и антисыворотки, после инкубации смеси в течение 1 часа при 37° С и 18—20 часов при +4° С, выпадал осадок, который отделяли центрифугированием. Надосадочную жидкость, содержащую раковый анти-

ген, исследовали на полноту истощения нераковых антигенов в РСК, а также путем дополнительного повторного добавления иммунной сыворотки.

В процессе иммунизации кроликов таким антигеном, животным дополнительно внутривенно вводили «блокирующую» антисыворотку.

Для устранения изоантигенных отношений в этих опытах «блокирующая» антисыворотка была получена против нормальной части желудка того же больного.

В результате проведенных экспериментов были получены противораковые сыворотки, у которых титр противораковых антител в сравнении с антителами к нормальным тканям был, как правило, в 4 раза выше, т. е. сыворотки оказывались более специфичными, чем контрольные, где иммунизация проводилась обычным водно-солевым экстрактом опухолевой ткани.

В дальнейшей работе мы поставили задачу проверить возможность полного разделения антигенов и сохранения только нужного нам белка. В качестве антигенов, исследованных нами, была использована смесь двух сывороток: лошади и человека АВ группы. Разделение видовых антигенов в этой смеси проводилось с помощью сывороток, преципитирующих белок человека и белок лошади. Обе эти сыворотки были в титре 1 : 10 000. Перед постановкой опыта сыворотки человека и лошади уравнивались по белку разведением на физиологическом растворе и потом смешивались в равных объемах. Полученная смесь делилась на две части. К одной части (5 мл) смеси добавляли по 0,2—0,3 мл сыворотки, преципитирующей белок человека для блокады соответствующего белка, а к другой части — такой же объем сыворотки, преципитирующей белок лошади. Пробы инкубировались в течение одного часа при 37° С и сохранялись ночь в холодильнике. Выпавшие осадки отделялись центрифугированием. От надосадочных жидкостей оставляли пробы для контроля полноты блокады, а к остальной части добавляли снова соответствующие сыворотки и процесс блокады повторяли. Полноту «блокады» очищения смеси от одного из антигенов проверяли реакцией кольцепреципитации.

Опыты эти показали, что после 6—7-кратной блокады из смеси двух сывороток удалялся один видовой антиген и сохранялся другой.

Хотя в процессе блокады происходит некоторое разбавление смеси антигенов добавляемыми преципитирующими сыворотками, можно было полагать, что невыявление после 7-ой блокады того или иного антигена происходило за счет этого разведения. Но специально проведенная концентрация проб и исследование их специфичности показала однозначность результатов как с концентрированными, так и исходными пробами. Концентрация проводилась на холоду под действием струи воздуха (электровентилятором) и объем проб уменьшался до 5—6 раз. В последующих экспериментах мы сократили время проведения истощения, а именно, пробы после инкубации при 37° С уже после 15—20 минутного стояния при комнатной температуре могут быть отцентрифугированы и блокада антигенов повторена.

Для подавления тканевой несовместимости при пересадках тканей и органов, широкое применение находят антилимфоцитарные сыворотки (АЛС). Поэтому разработка новых методов получения и повышения специфичности АЛС приобретает большое практическое значение.

Мы попытались использовать наш метод «блокады» для усиления специфичности АЛС (1970). С этой целью одна группа кроликов иммунизировалась смесью экстрактов тканей сердца, печени, почки и сыворотки человека; полученные сыворотки имели титр антител 1 : 80—1 : 160. Такими антисыворотками проводилась «блокада» соответствующих антигенов в приготавливаемом иммун-антигене, т. е. экстракте селезенки человека. «Блокада» проводилась 3—4 раза. Такой обработанный экстракт использовался для внутривенного и внутрибрюшинного введения опытной группе кроликов. Контрольная группа животных иммунизировалась исходным экстрактом ткани селезенки.

Опыты показали необходимость предварительной 3-х кратной обработки сывороток против тканей органов общепринятым способом от присутствующих в них большого количества лейкоагглютининов.

В ответ на введение кроликам «очищенного» таким способом иммун-антигена были получены АЛС, в которых специфические антитела в РСК выявлялись в титре 1:80 и выше, а против исследованных органов человека — до 1:10.

Таким образом применение предлагаемого нами метода «блокады» антигенов дает возможность полностью разделить отличные в видовом отношении белковые антигены.

В отличие от используемых физико-химических методов, предлагаемый нами метод «блокады» побочных антигенов является щадящим при очистке тканевых антигенов.

Введение таких «очищенных» антигенов кроликам повышает специфичность получаемых противотканевых сывороток. Дальнейшее совершенствование этого метода может повысить качество получаемых иммунных сывороток, необходимых как для практической медицины, так и при теоретических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анатолий С. А. — *ЖМЭИ*, 1957, 7, 100—105.
2. Ломакин М. С., Е. В. Соколова. *Бюл. exper. биол. мед.*, 1963, 4, 94—100.
3. Сааков А. К., Г. П. Трибулев. В кн.: Конфер. по трансплант. органов и ткан. 1970, 40—41.
4. Трибулев Г. П., А. К. Сааков. В кн.: Конфер. по иммунобиол. злокачественных новообразов. 1965, 84—85.
5. Тимофеев В. Т., Ю. Т. Алексанян. В кн.: Материалы конфер. молодых ученых, 1966, 125—127.
6. Corvath S. — *Cancer*, 1963, 16, 3, 306—330.
7. Oitzki L. — *J. Immunol.*, 1935, 29, 453.

PURIFICATION OF ANTIGENS BY THE «BLOCKADE» METHOD
IN ORDER TO INCREASE THE SPECIFICITY OF ANTITISSUE SERA

A. K. Saakov, G. P. Tribulev, M. N. Petriyashina

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The authors applied their own original method of «blockade» of the antigens. This method renders the possibility for a complete separation of species-specific protein antigens.

In comparison with the routine physio-chemical methods for separation, the «blocking» of the antigens, recommended by the authors, proved to be more efficient with regard to the purification of tissue antigens.

The introduction of such «purified» antigens into rabbits increases the specificity of the antitissue sera to be obtained. A further improvement of this method will raise the quality of the immune sera — a condition which is of great importance both for practical medicine, and for theoretical investigations.

ФЕНОМЕН ФАГОЦИТОЗА ЛИМФОЦИТОВ КЛЕТКАМИ-«МИШЕНЯМИ» В КУЛЬТУРЕ

И. А. ГЛИНСКИЙ, В. Г. КРЮКОВ, И. И. ПОДОПЛЕЛОВ, Ю. Н. СУХОВ,
И. П. КОСОВА, М. М. КАПИЧНИКОВ

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В целях изучения процесса отторжения трансплантата был предложен ряд моделей *in vitro*. В этих моделях лимфоциты, получаемые от сенсibilизированного животного, добавляли к взвеси аллогенных клеток, служащих материалом для сенсibilизации, а затем исследовали результат взаимодействия иммунных лимфоцитов с клетками, против которых были направлены эти лимфоциты. При этом клетки изучали в пробирке либо в виде суспензий, либо в условиях монослойных клеточных культур. В последнем варианте на культурах почки модель впервые была предложена Говертсом (13) и усовершенствована Розенау и Муном (17), исследовавших взаимодействие клеток L в монослойных культурах с иммунными и неиммунными лимфоцитами инбредных мышей. Эту же линию — L-клеток — в подобных системах изучали другие авторы (16, 19). В ряде работ в качестве антигенов применяли другие клетки (16). Общим результатом всех этих исследований было выявление цитотоксического эффекта иммунных лимфоцитов на взаимодействующие с ними клетки. Отмечено отсутствие в контроле выраженного скопления лимфоцитов вокруг клеток; без наличия контакта лимфоцита с клеткой цитопатогенный эффект не выявляется. В первых работах отмечали гибель лишь тех клеток, которые взаимодействовали с сенсibilизированными к ним лимфоцитами. В дальнейшем было установлено, что иммунные лимфоциты также гибнут (16).

Иммунный лимфоцит получил название клетки-«э[ф]ектора», а аллогенная клетка — клетки-«мишени». Тем самым подчеркивалась активная роль иммунных лимфоцитов и пассивная — аллогенных клеток.

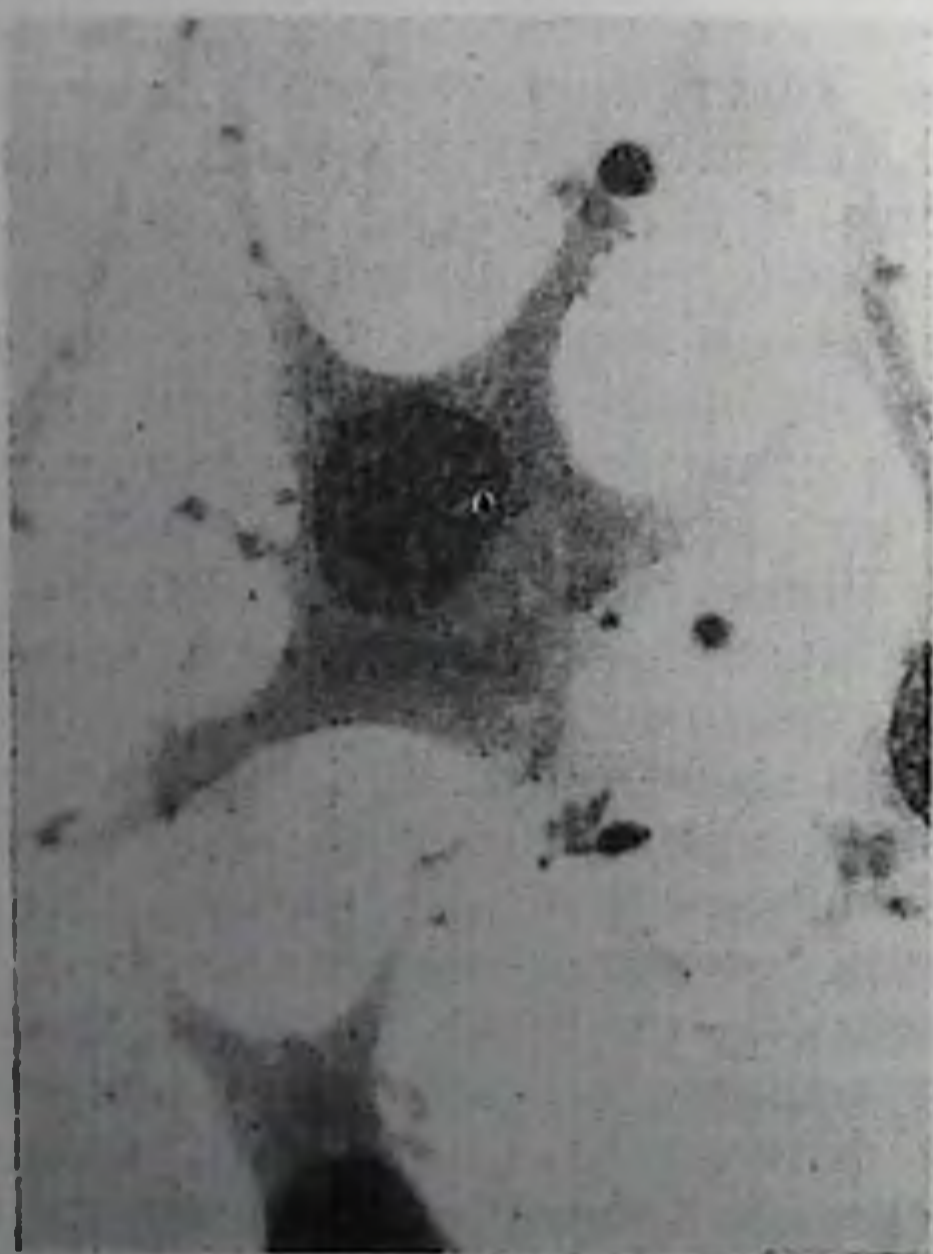
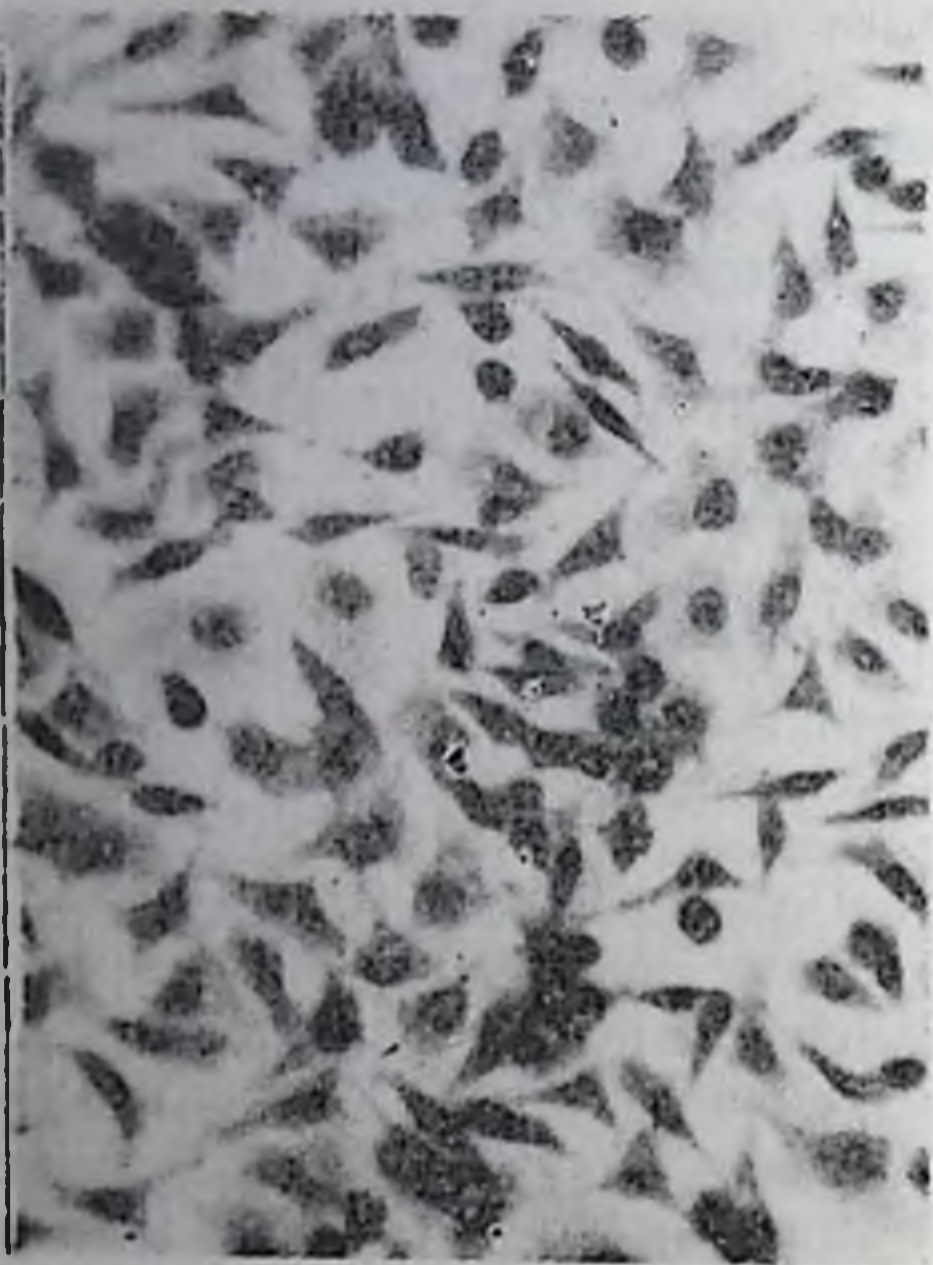
Однако этими работами был выявлен только суммарный результат взаимодействия, но не вскрыто реальное соотношение сторон этого взаимодействия, о чем существуют только гипотезы (7, 8, 3). Так Миклем и Лоутит (15) перечисляют шесть возможных механизмов

этого взаимодействия. Наиболее распространенной гипотезой является концепция о наличии на поверхности иммунных лимфоцитов специфических участков, обладающих способностью комплементарно взаимодействовать с сенсibiliзирующим антигеном. Такие участки, «конфигурации», называют «клеточными» или «структурными» антителами. Предлагается, исходя из этого, представление о двухстадийном действии иммунных лимфоцитов — специфический контакт и неспецифический лизис клеток-«мишеней» (2). Однако есть данные, не укладывающиеся в концепцию клеточных антител (10).

Нужно отметить, что вышеприведенные попытки объяснения не охватывают полностью феномен иммунного взаимодействия клеток и не согласуются с рядом хорошо изученных фактов. Как известно, в культурах тканей и клеток клетки обладают способностью к фагоцитозу. Для ретикуло-эндотелиальных элементов доказана способность их к лимфофагоцитозу в культурах (6, 18). В частности, это продемонстрировано в прижизненных наблюдениях для клеток линии L при постановке опытов с несенсибилизированными лимфоцитами. Было установлено, что объектами фагоцитоза могут быть клетки, ингредиенты клеток и другие частицы (14). В то же время в работах, выполненных с применением методики Розенау и Муна, не описывается фагоцитоз лимфоцитов клеткой L ни в опыте, ни в контроле (16, 19). Исследование фиксированных препаратов в этих работах проводили без достаточного цитологического анализа. Текст, как правило, иллюстрировали микрофотографиями, снятыми при малых увеличениях, применяли неадекватные для культур клеток методы фиксации и окраски.

Наличие существенных противоречий в исследованиях по клеточному иммунитету и невыясненность в связи с этим способов взаимодействия клеток-«мишеней» и клеток-«эффекторов» (7, 8) привели нас к необходимости изучения этого вопроса с привлечением тонкого цитоморфологического анализа, включающего прижизненные наблюдения. Исследования проводили на модели Розенау и Муна, прибавляя к L-клеткам иммунные и неиммунные аллогенные лимфоциты мышей C57BL. Иммунизацию мышей C57BL проводили L-клетками, содержащими сильные антигены H-2^k локуса мышей С3Н (9).

Детальным цитологическим анализом препаратов при сопоставлении полученных данных с прижизненными наблюдениями обнаружены явления фагоцитоза лимфоцитами клетками-«мишенями» как в опыте, так и в контроле. Были выявлены все стадии фагоцитоза, какие обычно характеризуют в целом этот процесс (1): стадия сближения фагоцита — клетки L — с объектом фагоцитоза (лимфоцит), стадия аттракции, стадия погружения объекта в протоплазму фагоцита (в данном случае — погружение лимфоцита в протоплазму L-клетки), стадия внутриклеточного положения и переваривания захваченного объекта внутри фагосомы (рис. рис. 1—14). Активность фагоцитоза в опыте была значительно выше, чем в контроле (соответственно 26% и 3%). В клетках, захвативших большое число лимфоцитов, были обнаружены явления фрагментации цитоплазмы, распада ее до зернистости и лизиса, что соответствует феномену цитопатогенного эффекта.



Этапы фагоцитоза иммунных лимфоцитов клетками-«мишенями» и цитопатогенный эффект.
Рис. 1 (вверху слева). Технический контроль: культура L-клеток без лимфоцитов (200X)
Рис. 2 (вверху справа). Общий вид культуры L-клеток с иммунными лимфоцитами. Лимфоциты находятся преимущественно в контакте с L-клетками (200X).
Рис. 3 (внизу справа). Сближение и аттракция эктоплазматического выроста L-клетки с лимфоцитом. Активация выростов L-клетки (900X).
Рис. 4 (внизу слева). Установление контакта эктоплазматического выроста с лимфоцитом и охват лимфоцита (900X).

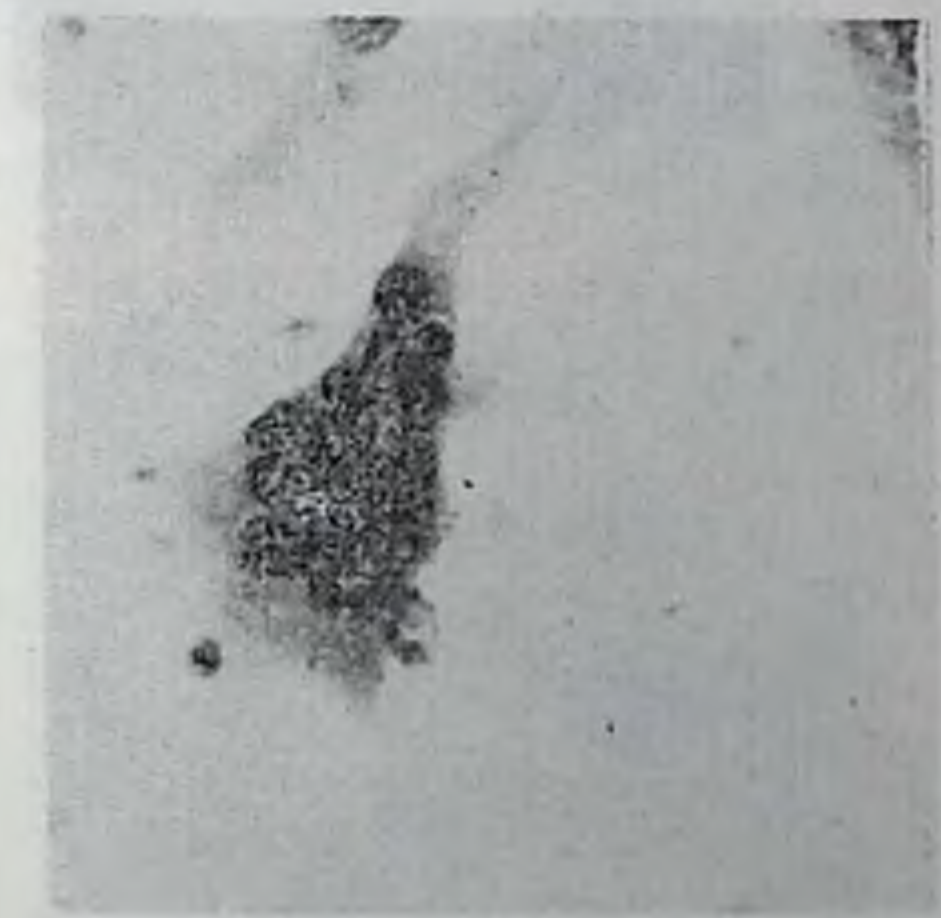
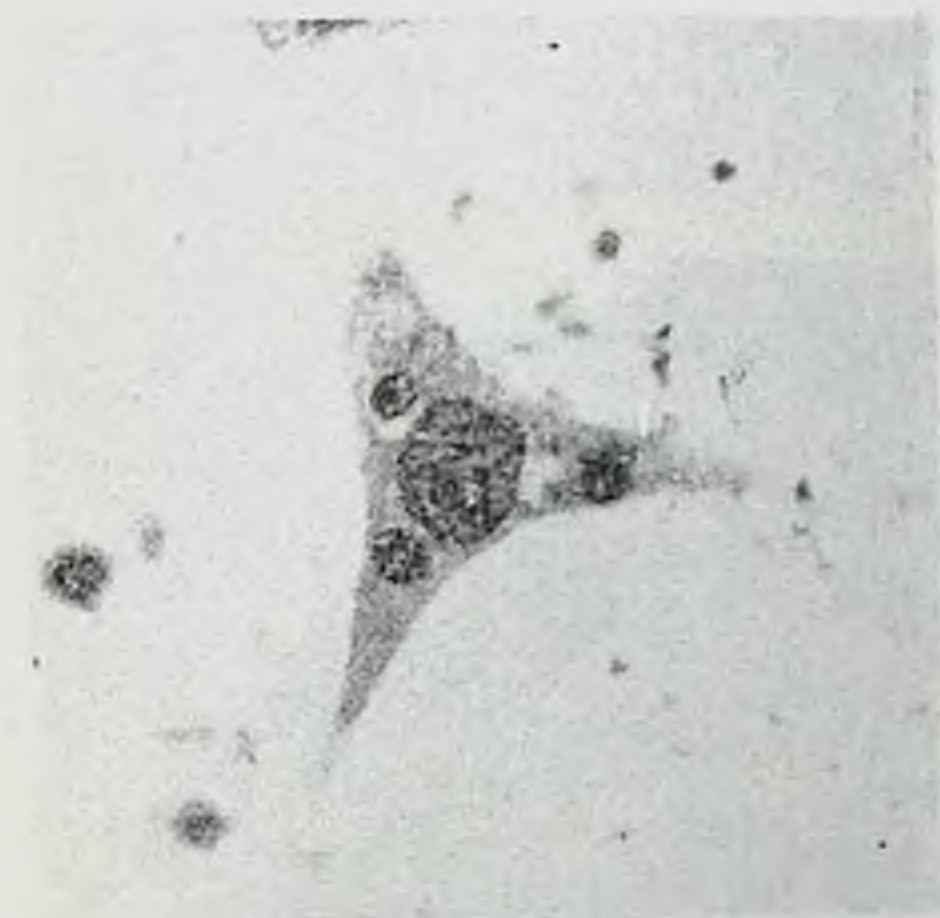
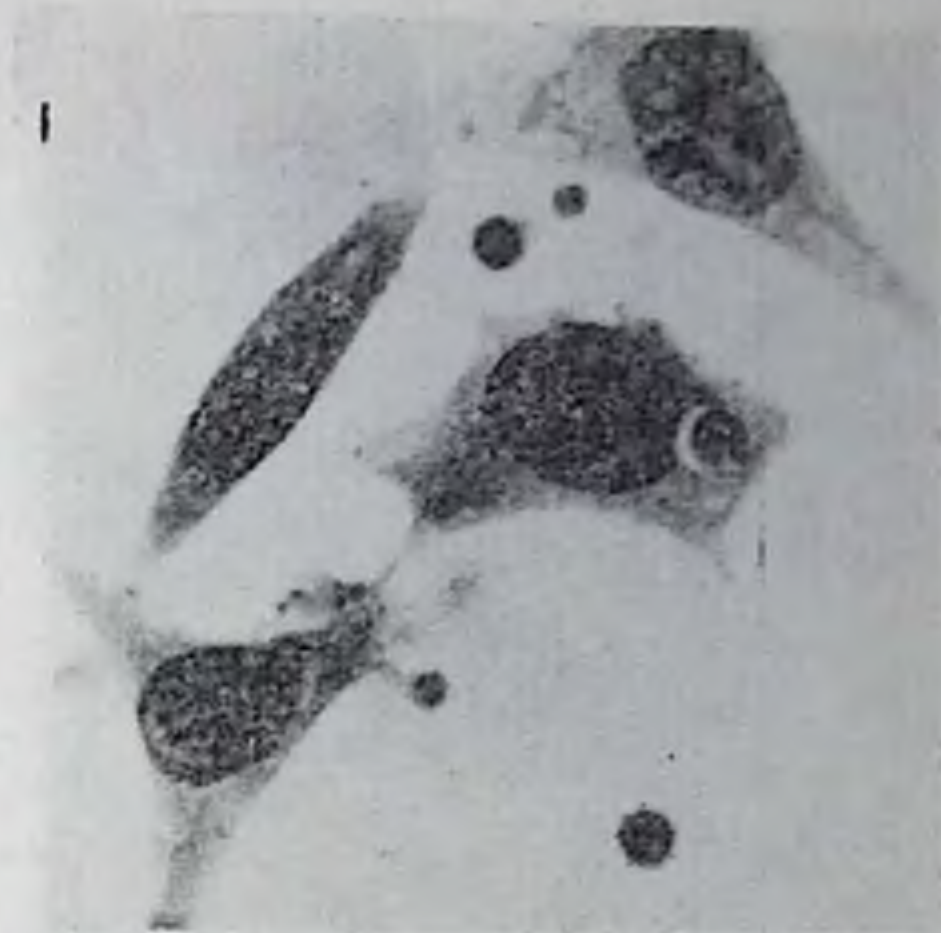
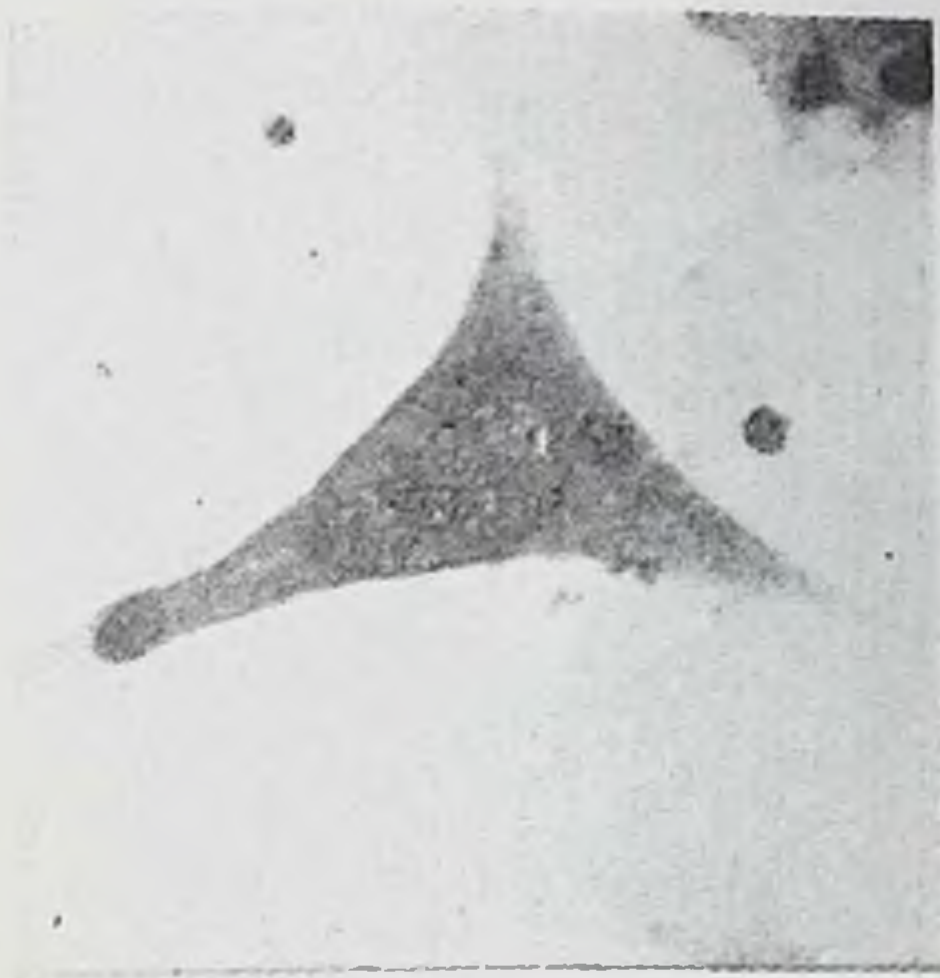


Рис. 5 (вверху справа). Продвижение захваченного лимфоцита по длине протоплазматического отростка L-клетки по направлению к ее ядру

Рис. 6 (вверху слева). Стадия внутриклеточного положения поглощенного лимфоцита. Вокруг лимфоцита образовалась пищеварительная вакуоль — фагосома.

Рис. 7 (внизу справа). Фагоцитарная активность каждого из трех отростков L-клетки. Разнообразные формы вакуолей.

Рис. 8 (внизу слева). Конгруэнтность захваченных лимфоцитов с границами цитоплазмы L-клетки.

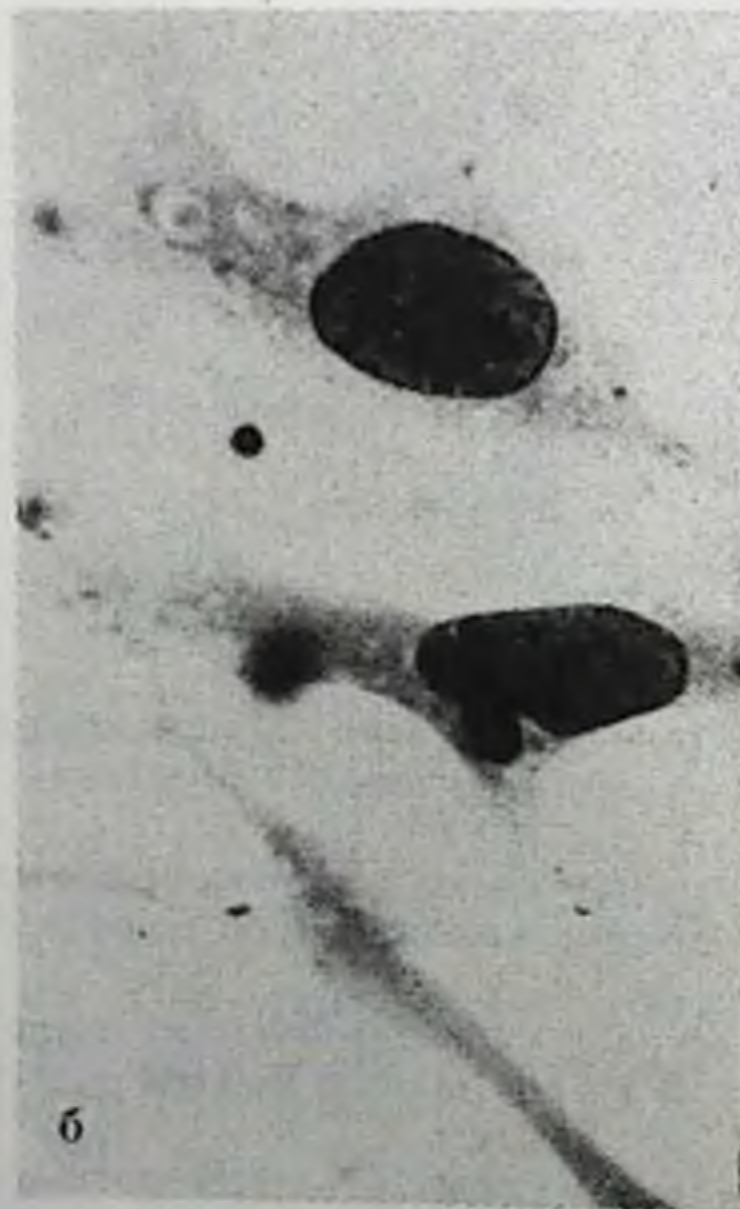
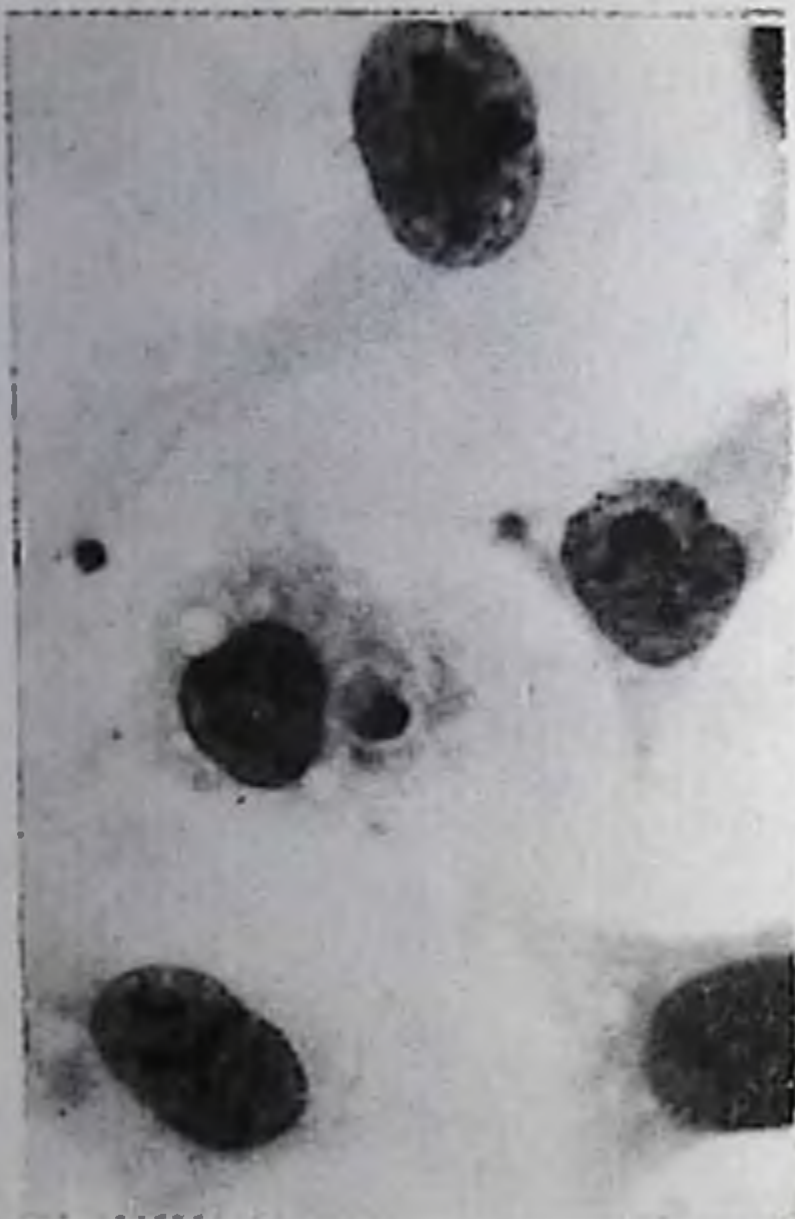


Рис. 9 (вверху слева). Преход к внутриклеточному перевариванию захваченного лимфоцита. Изменение морфологической структуры и ядерно-цитоплазматического отношения лимфоцита. Наряду с вакуолью, содержащей лимфоцит, видны вакуоли без лимфоцитов.

Рис. 10 (вверху справа). Дальнейший этап внутриклеточного переваривания. Вокруг деформированного лимфоцита — большая вакуоль, занимающая значительную часть цитоплазмы L-клетки и оттесняющая ее ядро.

Рис. 11а (внизу слева), 11б (внизу справа). Впячивание ядра L-клетки в результате взаимодействия с фагоцитированным лимфоцитом.

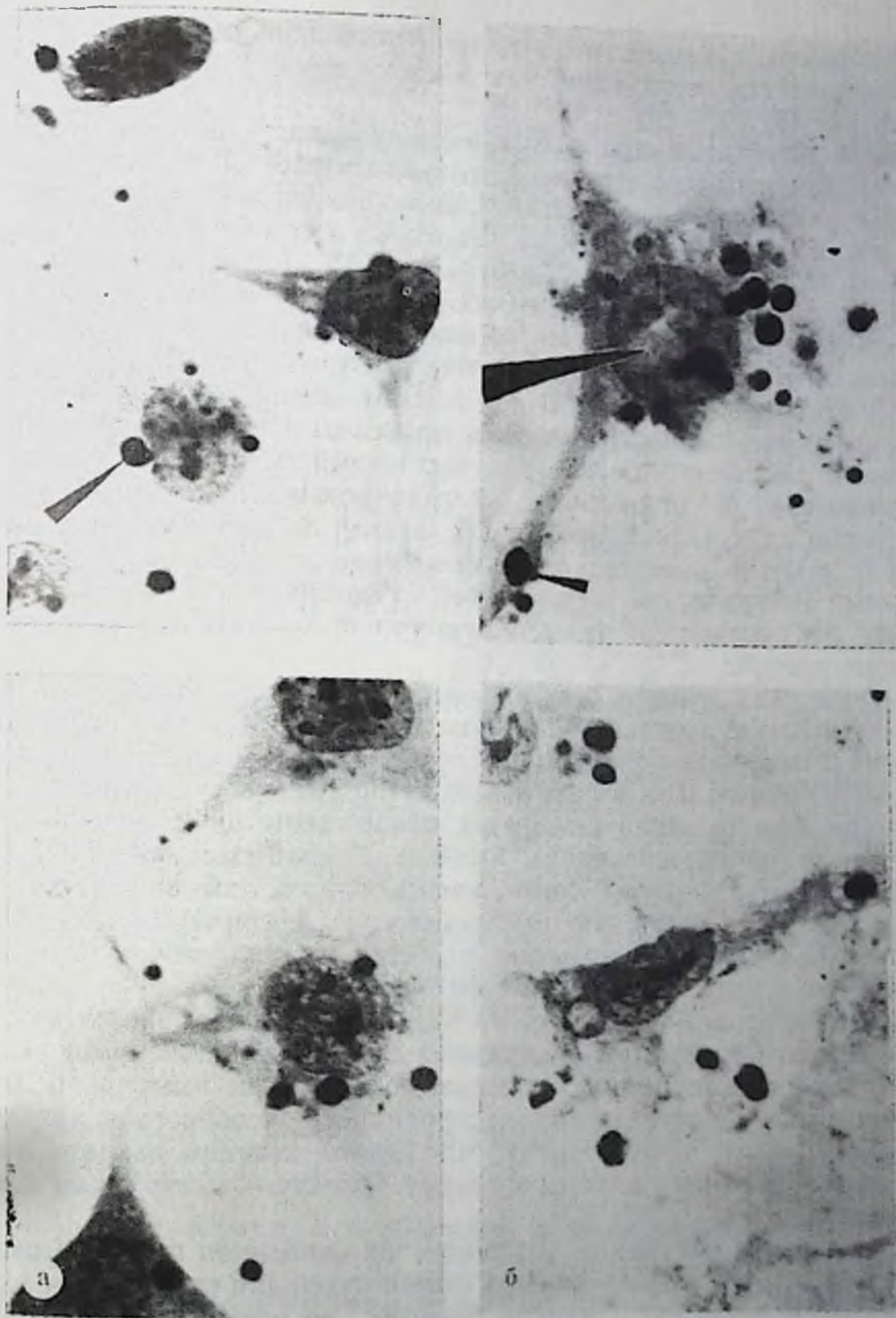


Рис. 12 (верху слева). Контакт лимфоцита с ядром L-клетки.
 Рис. 13 (вверху справа). Различные фазы разрушения лимфоцитов (пикноз ядер, фрагментация, лизис) и начало дезинтеграции клетки-«мишени». Большая стрелка указывает место просветления участка ядра, малая стрелка — на лимфоцит, захваченный отростком L-клетки.
 Рис. 14а (внизу слева), 14б (внизу справа) б. Деструкция лимфоцитов и клеток-«мишеней». Местами цитоплазма клетки-«мишени» как бы разъедена, отторгаются ее участки, в которых видны остатки разрушенных лимфоцитов. Ядро L-клетки «изрешечено» множественными просветлениями. Начало деструкции ядрышек.

Эти факты, с нашей точки зрения, позволяют объяснить в данных условиях опыта деструкцию как клеток-«эффекторов», так и клеток-«мишеней» (5, 9).

После опубликования наших экспериментов (9) о фагоцитозе иммунных лимфоцитов клетками L появились работы об этом феномене. Авторы указывают, что клетки L способны фагоцитировать не только фрагменты фагоцитов, но и «в некоторых случаях лимфоциты могут целиком фагоцитироваться L-клетками» (11). Однако при этом авторы не указывают, имеет ли какое-либо иммунологическое значение фагоцитоз иммунных лимфоцитов. Японские исследователи установили, что при совместном культивировании клеток асцитного штамма спонтанной аденокарциномы молочной железы мышей СЗН с лимфоцитами, взятыми от изологических мышей, происходил фагоцитоз лимфоцитов раковыми клетками, причем количественный подсчет показал, что — по сравнению с отдельным культивированием лимфоцитов — при совместном их культивировании с асцитными клетками количество лимфоцитов заметно уменьшалось; уменьшение лимфоцитов и документированный цитраферной киносъемкой их фагоцитоз взаимосвязаны (12). Авторы не проследили дальнейшую судьбу лимфоцитов и фагоцитирующих клеток.

В свете этих данных результаты работ, поставленных по методике Розенау и Муна, по нашему мнению, могут быть истолкованы в пользу наличия фагоцитоза при взаимодействии иммунных лимфоцитов с клетками-«мишенями». Так в работе (19) автор указывает, что внутри клеток-«мишеней» на серийных срезах обнаружены лимфоциты — от интактных до обнаруживающих признаки явной деструкции. Наряду с этим, не ставится вопрос о том, каким образом лимфоциты оказались внутри клеток и какое это имеет значение. Интересно отметить, что автор в начале статьи связывает удобство иммунологических моделей в культуре с отсутствием в них фагоцитоза.

Таким образом, наши исследования позволяют заключить, что взаимодействие иммунных лимфоцитов с клетками-«мишенями» не ограничивается односторонним активным воздействием иммунного лимфоцита на клетку; клетка-«мишень» проявляет способность к активному лимфофагоцитозу, приводящему, при множественном захвате лимфоцитов, к выраженному цитопатогенному эффекту — деструкции клеток-«мишеней».

Приведенные материалы указывают на сложность процесса взаимодействия клеток и на возможность новых путей для его анализа в дальнейших исследованиях. Знаменательными, по нашему мнению, в этой связи являются данные литературы (4), свидетельствующие о наличии фактора, порождаемого иммунными лимфоцитами и стимулирующего фагоцитоз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А. Д. Патология фагоцитов. Медгиз, М., 1961, 295.
2. Брондз Б. Д. В сб.: Вирусы, рак, иммунитет. М., 1965, 362—375.
3. Брондз Б. Д. — *Усп. совр. биол.*, 1972, 73, 1, 42—58.
4. Гохлернер Г., В. Литвинов. — *Наука и жизнь*, 1972, № 5, 104—110.
5. Капичников М. М., Н. Н. Настоящая, Т. А. Фадеева, Ю. Н. Сухов, И. А. Глинский, И. И. Подоплелов, В. Г. Крюков, Г. М. Бочко, Л. Наков, С. Живков, Т. Еврев, К. Киров, Р. Попиванов. В кн.: Тезисы докладов 2-го Межд. симпозиума по иммунологии размножения, 13—16 сен. 1971, Болгария, Варна, 40.
6. Кендыш Н. Н. — *Усп. совр. биол.*, 1972, 73, 3, 342—364.
7. Красковский Г. В. В кн.: Генетика опухолевого роста, Минск, 1967, 3—88.
8. Петров Р. В. Введение в неинфекционную иммунологию. Изд. «Наука», Новосибирск, 1968, 188 стр.
9. Подоплелов, И. И., М. М. Капичников, Ю. Н. Сухов, Н. Н. Дахина, И. А. Глинский, И. П. Косова, В. Г. Крюков, Б. П. Шадрин. В сб.: Материалы Всес. конф. по общей иммунологии и противовирусному иммунитету, посвящ. 125-летию со дня рожд. И. И. Мечникова, М. 18—20 марта 1970, 1, 34—36.
10. Свет-Молдавский Г. Я., И. Ю. Черняховская. В кн.: Трансплантация органов и тканей. М., 1965, 339—360.
11. Сура С. Н., А. Ф. Быковский, З. Г. Кадагидзе, И. Ю. Черняховская, Г. Я. Свет-Молдавский. — *Бюл. эксперим. биол. мед.*, 1970, 9, 98.
12. Ashikava K., Y. Ishibashi, T. Takaoaka, H. Katsuta. In Tenth Internat. Cancer Congress, Houston, USA, 22—29 May 1970. Abstracts, 191.
13. Govaerts A. — *J. Immunol.*, 1960, 85, 5, 516—523.
14. Horikava M., Y. Doida, T. Sugahara. — *Expt. Cell Res.*, 1963, 32, 2, 404—407.
15. Micklem H. S., J. F. Loutit. Tissue Grafting and Radiation. Acad. Press., 1966.
16. Perlmann P., G. Holm. — *Advances in Immunology*, 1969, 11, 117.
17. Rosenau W., H. D. Moon. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1961, 27, 471.
18. Trowell O. A. — *J. Bioph. a. Bioch. Cytol.*, 1957, 3, 2, 317.
19. Weiss L. — *J. Immunol.*, 1968, 101, 1346.

THE PHENOMENON OF LYMPHOCYTE PHAGOCYTOSIS BY «TARGET» CELLS IN CULTURES

I. A. Glinsky, V. G. Kryukov, I. I. Podoplelov, U. N. Soukhov
I. P. Kossova, M. M. Kapitchnikov

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The interaction between L-cells and lymphocytes of C57BL mice, immunized with L-cells, has been studied in monolayer cultures; L-cells and normal C57BL lymphocytes were used as controls.

The phenomenon of lymphocyte phagocytosis by L-cells was observed in the experimental, as well as in the control cultures. The phagocytic activity was, however, much higher in the experimental cultures.

In cases of multiple lymphocyte phagocytosis by one «target» cell a destruction of the phagocytizing cell is observed, i. e. a cytopathogenic effect, mediated by lymphophagocytosis, takes place.

The reported data indicate that the interaction between immune lymphocytes and «target» cells is not limited only to the active influence of the lymphocyte on the «target» cell; the L-cell has its proper activity, which is expressed in the phenomenon of multiple lymphophagocytosis. ,

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОМЕНА АЛЛОГЕННОГО ТОРМОЖЕНИЯ И СИНГЕННОГО ПРЕДПОЧТЕНИЯ НА МОДЕЛИ ОДНОСЛОЙНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

И. И. ПОДОПЛЕРОВ Н. И. КОЧЕРГИНА, И. П. КОСОВА

Группа иммуногенетики и биологии антигенов НИЛЭИ АМН СССР, Москва

При изучении механизмов трансплантационного и противоопухолевого иммунитета в последние годы все большее внимание привлекают феномены аллогенного торможения и сингенного предпочтения. Эти феномены исследовали на модели *in vivo* и *in vitro* (1, 4, 5, 8, 9, 10). Было показано, что гомогенаты и экстракты тканей мышей сингенного и аллогенного происхождения соответственно могут вызывать стимуляцию или торможение пролиферации клеток как *in vivo*, так и *in vitro* (8, 9, 11). Природа этих феноменов остается еще неясной и нуждается в дальнейшем изучении, в частности, на модели культуры клеток.

Целью настоящей работы являлось изучение действия клеточных и тканевых экстрактов на рост культуры клеток человека (Tg_{33})¹, клеток мыши (линия L), а также клеток первичной культуры эмбриональной ткани мышей линии СЗН.

В первом варианте (1969—1970) опыты ставили с клетками мышей по методике Hellström К. Е. (1964). Культуры клеток L и первичную эмбриональную культуру клеток мышей СЗН засеивали в пробирки по 100 000 клеток в 1—2 мл среды 199 на 10% бычьей сыворотке. На вторые-третьи сутки роста, когда наблюдали образование рыхлого монослоя, сливали среду и добавляли по 2 мл среды 199, содержащей 0,2 мл тканевых экстрактов, приготовленных из тканей эмбрионов сингенных (СЗН) и аллогенных (С57ВL, С57Вг) мышей, а также экстракты тканей селезенки сингенных (СЗН) и аллогенных (С57ВL) мышей. В течение последующих трех суток производили микроскопическое наблюдение за состоянием живых культур, а на третьи сутки после взаимодействия с экстрактами производили подсчет числа живых и

¹) Tg_{33} — линия клеток получена Barski G. в 1961 г. из гистологически нормальной фаллопиевой трубы женщины.

мертвых клеток (используя окраску раствором 1% трипановой сини), определение коэффициента пролиферации, индекса погибших клеток и статистическую достоверность различий данных опыта и контроля.

А. В опытах I варианта исследований было показано, что сингенные экстракты, как эмбриональные, так и селезеночные, сравнительно слабо стимулируют рост культур. Так, увеличение коэффициента пролиферации в опытах с добавлением экстрактов в большинстве случаев достоверно не отличается от данных контроля. В то же время процент мертвых клеток в опытах с экстрактами по сравнению с контролем достоверно снижен.

Б. В то же время аллогенные экстракты (эмбриональные и селезеночные) заметно тормозят рост культуры L-клеток в опытах по сравнению с контролем (т. е. коэффициент пролиферации достоверно снижен в большинстве опытов), но слабо влияют на пролиферацию клеток эмбриональных культур. Наряду с этим к 3-му дню во всех опытах заметно увеличен процент погибших клеток, особенно в культурах клеток эмбриональных тканей. Этим данным в основном соответствуют результаты изучения живых культур и фиксированных окрашенных препаратов, а именно: при действии аллогенного экстракта возрастает вакуолизация протоплазмы и число дегенеративно измененных клеток, а сингенное предпочтение характеризуется наличием типичного хорошего монослоя жизнеспособных клеток фибробластоподобного типа.

Таким образом, феномены аллогенного торможения и сингенного предпочтения четко воспроизводятся на клетках однослойной культуры мышей.

Во втором варианте (1970—1971 г.г.) опыты ставили по несколько измененной в нашей лаборатории методике Хеллстрема (1965). Культуру клеток Tg₃₃ и L засеивали по 50 тыс. в пробирку с 2 мл соответственно среды Игла и 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. Клеточные экстракты получали из клеток культур Tg₃₃, HeLa¹ — K-41, L, а тканевые — из селезенок мышей СЗН и С57BL.

Ткани селезенок разрушали в ручном гомогенизаторе. Затем взвесить клеток и суспензию селезенок в растворе Хенкса 15-кратно замораживали и оттаивали в ацетоне с сухим льдом; центрифугировали при 1000 оборотов в течение 30 минут. В полученных экстрактах определяли белок по Лоури.

На 2-ые сутки роста к клеткам Tg₃₃ добавляли экстракты из клеток Tg₃₃, HeLa-K-41, L; к клеткам L — экстракты из селезенок мышей СЗН и С57BL и экстракты из клеток L, Tg₃₃. Доза белка в добавляемых экстрактах для обеих линий 50γ на 2 мл среды. В контрольных пробирках была проведена лишь смена среды. На 5-ые сутки роста (3-ьи сутки воздействия) производили подсчет живых и мертвых клеток, используя раствор 1% трипановой сини, и вычисляли коэффициент пролиферации. Митотический индекс изучали на окрашенных препаратах. Полученные данные обрабатывали статистически по методу Фишера—Стьюдента.

¹ HeLa — K-41 — клоновая линия получена Н. И. Шарым в 1965 году.

А. В результате исследований действия клеточных экстрактов на культуру Tg₃₃ было показано, что экстракт клеток линии Tg₃₃ стимулировал рост этой же культуры (средний коэффициент пролиферации 14,5), а экстракты из клеток линии HeLa — K-41 и L тормозили рост культуры Tg₃₃ (коэффициент пролиферации 11,2, 10,5).

При статистической обработке данных 8 опытов¹ выявлены достоверные различия в количестве живых клеток при действии экстрактов Tg₃₃; HeLa—K-41, L; при сравнении влияния аллогенного (HeLa—K-41) и ксеногенного (L) экстрактов с аутогенным (Tg₃₃) из 8 опытов в 7 разниа была достоверна; при сравнении действия экстракта HeLa — K-41 с контролем разница достоверна в 5 опытах; для экстракта L — в 6 опытах (табл. 1). Эти данные соответствуют результатам изучения

Т а б л и ц а 1

Статистическая достоверность различий (I-P) в количестве живых клеток при действии на линию Tg₃₃ экстрактов различного происхождения

№ опыта	Экстракт из Tg ₃₃	Экстракт из Tg ₃₃	Экстракт из HeLa-K-41	Экстракт из L
	экстракт из HeLa K-41	экстракт из L	контроль	контроль
1	0,647	0,952	0,637	0,992
2	0,969	0,953	0,687	0,789
3	0,969	1,0	0,227	0,901
4	1,0	1,0	0,997	0,991
5	1,0	1,0	0,991	0,976
6	0,995	0,969	0,976	0,950
7	0,965	0,908	1,0	0,994
8	1,0	1,0	0,986	0,962

митотической активности клеток Tg₃₃. Митотический индекс при действии аутогенного экстракта Tg₃₃ — 61⁰/₀₀, при действии аллогенного экстракта HeLa — K-41 = 27,6⁰/₀₀; при действии ксеногенного экстракта = 22⁰/₀₀, в контроле 51⁰/₀₀.

Б. При добавлении экстрактов из ткани селезенок мышей СЗН и из клеток L (сингенные и аутогенные экстракты) отмечена стимуляция роста клеток линии L (средние коэффициенты пролиферации 7,3; 7,7). Добавление же аллогенного и ксеногенного экстрактов из ткани селезенок мышей С57ВL и из клеток Tg₃₃ тормозило рост исследуемой линии клеток (средние коэффициенты пролиферации 5,1; 6,2). При сравнении действия аутогенного (L) и ксеногенного (Tg₃₃) экстрактов разница в количестве живых клеток достоверна в 7 опытах из 7.

При сравнении результатов действия аллогенного и сингенного экстрактов (тканевые экстракты) разница достоверна в 6 опытах. Сравнение с контролем результатов действия аллогенного, сингенного и ксеногенного экстрактов также выявило достоверное различие эффекта (табл. 2).

¹ Опыт считается достоверным, если I—P=0,950 или больше (2).

Т а б л и ц а 2

Статистическая достоверность различий (I-P) в количестве живых клеток при действии на линию L экстрактов различного происхождения

№ опыта	Экстракт из С ₃ H	Экстракт из L	Экстракт из С57BL	Экстракт из Tg ₃₃	Экстракт из С ₃ H
	экстракт из С57BL	экстракт из Tg ₃₃	контроль	контроль	контроль
1	1,0	1,0	0,996	0,562	0,988
2	0,940	1,0	1,0	1,0	1,0
3	0,998	1,0	0,657	0,856	0,993
4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,965
5	1,0	1,0	1,0	1,0	0,994
6	1,0	1,0	1,0	1,0	0,618
7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Результаты подсчетов митотического индекса подтверждают рост-стимулирующее действие аутогенного и сингенного экстрактов (митотический индекс при добавлении аутогенного экстракта — 37⁰/₀₀, при добавлении сингенного — 35⁰/₀₀, в контроле — 22⁰/₀₀). Аллогенный и ксеногенный экстракты не вызывают уменьшения количества митозов в культуре L клеток (митотический индекс при действии аллогенного экстракта — 24⁰/₀₀, ксеногенного — 24⁰/₀₀.)

Таким образом, в опытах на культуре клеток Tg₃₃ было выявлено, что экстракт из клеток той же линии стимулирует рост этих клеток (аутогенное действие), а экстракты из культур клеток HeLa — K-41 и L тормозят рост культур Tg₃₃ (аллогенное и ксеногенное действие).

На культуре клеток L показано, что экстракты тканей из селезенки мышей С₃H и из клеток той же линии стимулируют рост штамма L (сингенное и аутогенное действие), а экстракты тканей селезенок мышей С₅₇BL и из клеток человека тормозят рост линии клеток L.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочергина Н. И., И. П. Косова. — Бюлл. эксп. биол. мед. 1971, № 3, 86.
2. Модели и методы экспериментальной онкологии. Под ред. А. Д. Тимофеевского, М., 1960, 240.
3. Петров Р. В. Введение в неинфекционную иммунологию. Новосибирск, 1968.
4. Подоплелов И. И., И. П. Косова, Ю. Н. Сухов. В кн.: Трансплантация органов и тканей, Минск, 1969, 27.
5. Подоплелов И. И., И. П. Косова, Ю. Н. Сухов, И. А. Глинский, В. И. Горшков. В кн.: Материалы Всесоюз. конференции по общей иммунологии и противовирусному иммунитету, посвящ. 125-летию со дня рождения И. И. Мечникова, М., 1970, ч. I, с. 87.
6. Шарый Н. И. В кн.: Материалы конференции молодых ученых Института экспериментальной биологии М., 1966, с. 141.
7. B arski G. et al. — *Ann. Inst. Pasteur* 1965, 109, 173.

8. Hellström I., K. E. Hellström. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1966, 129, 724.
9. Hellström K. E., I. Hellström et al. — *Nature* 1964, 204, 661.
10. Holmgren B., I. Merhsant. — *J. Nat. Cancer Inst* 1968, 40, 561.
11. Möller G., E. Möller. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1966, 129, 735.

A STUDY OF THE PHENOMENON OF ALLOGENIC INHIBITION
AND SYNGENIC PREFERENCE ON MODELS OF MONOLAYER
CULTURES OF HUMAN AND ANIMAL CELLS.

I. I. Podoplelov, N. I. Kotchergina, I. P. Kossova

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

S U M M A R Y

The phenomenon of allogenic inhibition and syngenic stimulation has been studied on models of monolayer cultures of human Tg₃₃ cell line and of mouse L cell line. Autologous cell extracts from the same cell line stimulate the growth of the culture; the same effect has been observed with syngenic extracts on the L-cells. Xenogenic cell extracts (i. e. from cell cultures of different species) inhibit the growth of the cultures. The authors believe that these reactions are best explained by the immunogenetic phenomenon of allogenic inhibition and syngenic stimulation.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ H—Y АНТИГЕНА У МЫШЕЙ IN VIVO И IN VITRO

Л. НАКОВ, С. ЖИВКОВ, Т. ЕВРЕВ, К. КИРОВ, Р. ПОПИВАНОВ
Кафедра общей биологии Медицинской Академии, София, Болгария

М. М. КАПИЧНИКОВ, И. И. ПОДОПЛЕЛОВ, Н. Н. НАСТОЯЩАЯ,

И. А. ГЛИНСКИЙ, В. Г. КРЮКОВ, Ю. Н. СУХОВ
НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В изучении механизма развития реакций трансплантационного иммунитета и состояния толерантности к аллотрансплантатам важное значение приобретает анализ не только сильных, но и слабых трансплантационных антигенов. К числу слабых и удобных для исследования трансплантационных антигенов относится H—Y антиген (sex-антиген) у мышей, сцепленный с Y-хромосомой самца. Вопросу изучения H—Y антигена у мышей линий C57BL/J6, BALb/c и др. посвящено большое число работ (4, 6, 8, 10, 11). Однако многие стороны специфической иммунологической реакции отторжения и феномена толерантности к H—Y антигену остаются еще невыясненными.

В задачу настоящего исследования входило изучение на моделях *in vivo* и *in vitro* иммунобиологических свойств слабого H—Y антигена мышей. В опытах использовали мышей линий CC57B₆ и CC57W, у которых этот антиген ранее не был изучен.

I. В опытах *in vivo* с пересадкой кожных лоскутов исследовали иммуногенные и толерогенные свойства H—Y антигена.

Как видно из таблицы 1 (серии III/IV), все трансплантаты, пересаженные от самца к самке, отторглись: у мышей CC57B₆ в среднем через $21 \pm 1,2$ дня; у мышей CC57W — через $19,4 \pm 0,4$ дня. Пересадки во всех других комбинациях пола донора и реципиента закончились стойким приживлением трансплантата.

В следующей серии экспериментов проводили изучение иммуногенной активности H—Y антигена у этих животных путем предварительной пересадки лоскутов кожи или инъекции клеток селезенки сингенных самцов. Через 15 дней после отторжения первичного трансплантата или через 7 дней после введения клеток реципиентам пересаживали лоскуты кожи доноров. У всех подопытных животных наблюдали ускоренную по сравнению с контрольными, несенсибилизированными мышами гибель тест-трансплантата (см. табл. 1, сер. I, II, IV, V).

Таблица 1

Сенсибилизирующая активность H—Y антигена у мышей линии CC57W и CC57Br

№ серии	Реципиент	Донор	Материал для сенсибилизации	Число подопытных животных	Среднее время выживания тест-трансплантата в днях
I	CC57W ♀ ♀	CC57W ♂ ♂	Кожный трансплантат CC57W от ♂♂	13	10,4 ± 0,5
II	"	"	Клетки селезенки от ♂♂ CC57W (20.10 ⁶)	10	12,0 ± 0,4
III	"	"	Необработанные (контроль)	27	19,4 ± 0,4
IV	CC57Br ♀ ♀	CC57Br ♂ ♂	Кожный трансплантат от ♂♂ CC57Br	22	10,9 ± 0,4
V	"	"	Клетки селезенки CC57Br (20.10 ⁶)	9	12,0 ± 0,9
VI	"	"	Необработанные (контроль)	25	21,6 ± 1,2

Изучение H—Y антигена проводили также методом толерантности. Мышам-самкам линии CC57Br внутривенно вводили клетки селезенки сингенных самцов в дозе 225×10^6 клеток. При трансплантации кожных лоскутов самцов, проведенной через 2 недели после обработки, наблюдали стойкое приживание пересаженной ткани приблизительно у половины животных (6 из 13), а у остальных мышей — значительное увеличение времени выживания трансплантатов по сравнению с контролем (44,6 дня и 21,6 дня соответственно).

Таким образом, на мышах линий CC57Br и CC57W удалось воспроизвести не только феномен отторжения трансплантата, связанный с несовместимостью по H—Y антигену, но и получить феномен ускоренного отторжения трансплантата и феномен иммунологической толерантности в условиях предварительной обработки мышей-самок клетками селезенки и кожей самцов тех же линий.

II. В последнее время предложен ряд экспериментальных моделей для изучения реакций трансплантационного иммунитета *in vitro*. В частности широко используется модель взаимодействия в культуре иммунных лимфоцитов и «клеток-мишеней». С помощью этой модели четко выявляется иммунная реакция на сильные трансплантационные антигены H-2 локуса (1, 2, 3, 7, 9).

В настоящей работе мы попытались применить эту методику для изучения слабых трансплантационных антигенов, к числу которых

относится секс-антиген (H—Y антиген). Опыты проводили на однослойных культурах перитонеальных макрофагов самцов линии CC57W, к которым добавляли лимфоциты самок той же линии, сенсibilизированных к H—Y антигену.

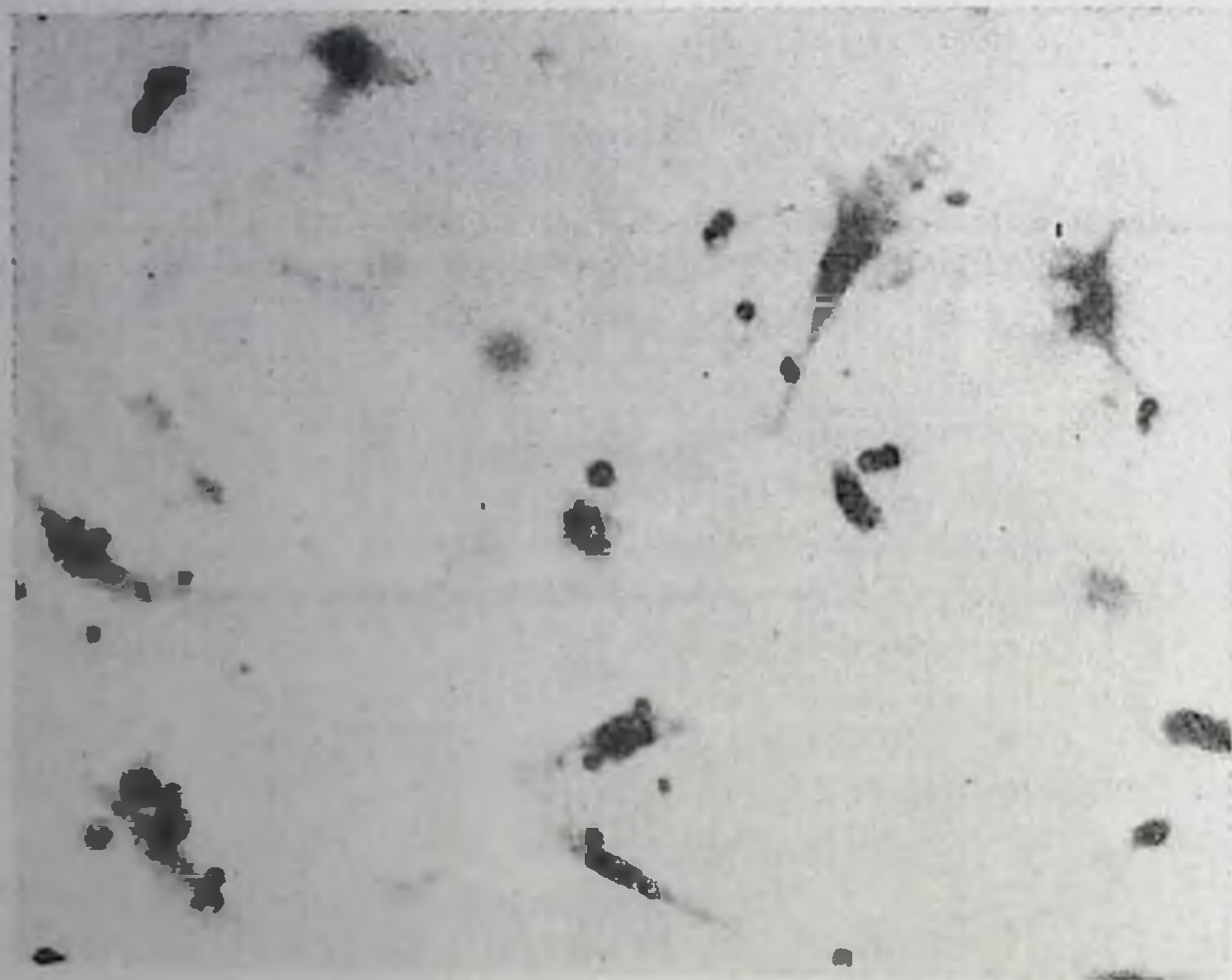


Рис. 1. Контроль. Культура макрофагов мышей-самцов линии CC57W, к которой добавлены неиммунные лимфоциты самок той же линии (24 часа взаимодействия). Фиксация по Буэну, окраска гематоксилином Майера. Часть лимфоцитов находится на поверхности макрофагов: много свободных — между клетками.

Прижизненные наблюдения в фазовом контрасте и изучение препаратов (рис. 1, 2, 3, 4) позволило выявить налипание и разные этапы фагоцитоза, вплоть до полной дезинтеграции ядер лимфоцитов в цитоплазме клеток «мишеней». К 24 часам взаимодействия макрофагов с иммунными лимфоцитами обнаруживаются макрофаги, поглотившие до десяти и больше лимфоцитов. Вокруг фагоцитированных лимфоцитов образуется вакуоль (фагосома). В фагосомах можно видеть все стадии деструкции лимфоцитов, заканчивающиеся их полным распадом. При множественном фагоцитозе в одном и том же макрофаге наблюдали разные стадии внутриклеточного переваривания лимфоцитов, что связано с неодновременным захватом лимфоцитов одним и тем же макрофагом.

При подсчете на вторые сутки количества налипших и свободных лимфоцитов (на 500 полей зрения) оказалось соответственно в опыте 122 : 17, а в контроле — 507 : 151. Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число к тому же сроку достигают соответственно 58% и 0,67, а в контроле — 33% и 0,33. Уменьшение в опыте свободных и налип-

ших лимфоцитов, наряду с увеличением фагоцитарной активности, указывает, что наблюдавшееся уже через 3 часа после начала взаимодействия интенсивное прилипание лимфоцитов к макрофагам заканчивается к 24 часам массовым фагоцитозом.

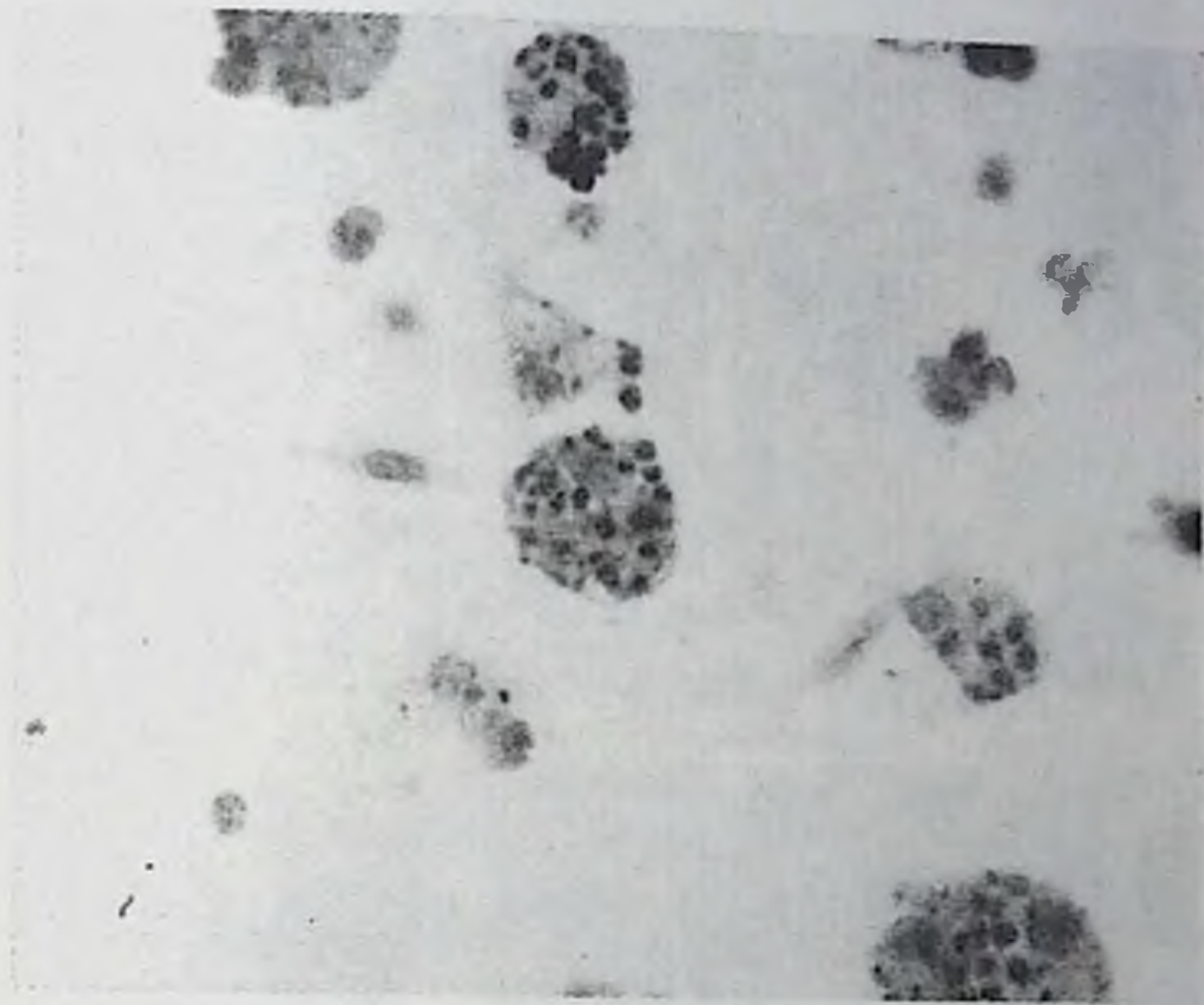


Рис. 2. Опыт. Культура макрофагов мышей самцов линии СС57W, к которой добавлены лимфоциты самок той же линии, иммунные к Н-У-антигену самцов СС57W (24 часа взаимодействия).

Фиксация по Буэну, окраска гематоксилином по Майеру. Увелич. 200X. Почти все лимфоциты находятся внутри макрофагов; меньшая часть — на их поверхности.

В макрофагах, поглотивших несколько лимфоцитов — что более характерно для опыта — как правило, происходит процесс дезинтеграции (цитопатогенный эффект). Ядро начинает окрашиваться слабее, а цитоплазма распадается на отдельные глыбки разной величины и мелкозернистые образования. Эта зернистость особенно хорошо заметна при наблюдении живых культур с применением фазового контраста. Стадии взаимодействия лимфоцитов с макрофагами были прослежены и засняты путем центрифужной микрокиносъемки, причем получены данные, соответствующие результатам анализа фиксированных и окрашенных препаратов.

Таким образом, при изучении иммунобиологических свойств sex-антигена у мышей линии СС57W удалось выявить в опытах *in vitro*, в соответствии с результатами *in vivo*, что сенсибилизированные к Н—У антигену лимфоциты самок, в отличие от нормальных лимфоцитов, обнаружили более выраженное цитопатогенное действие на клетки

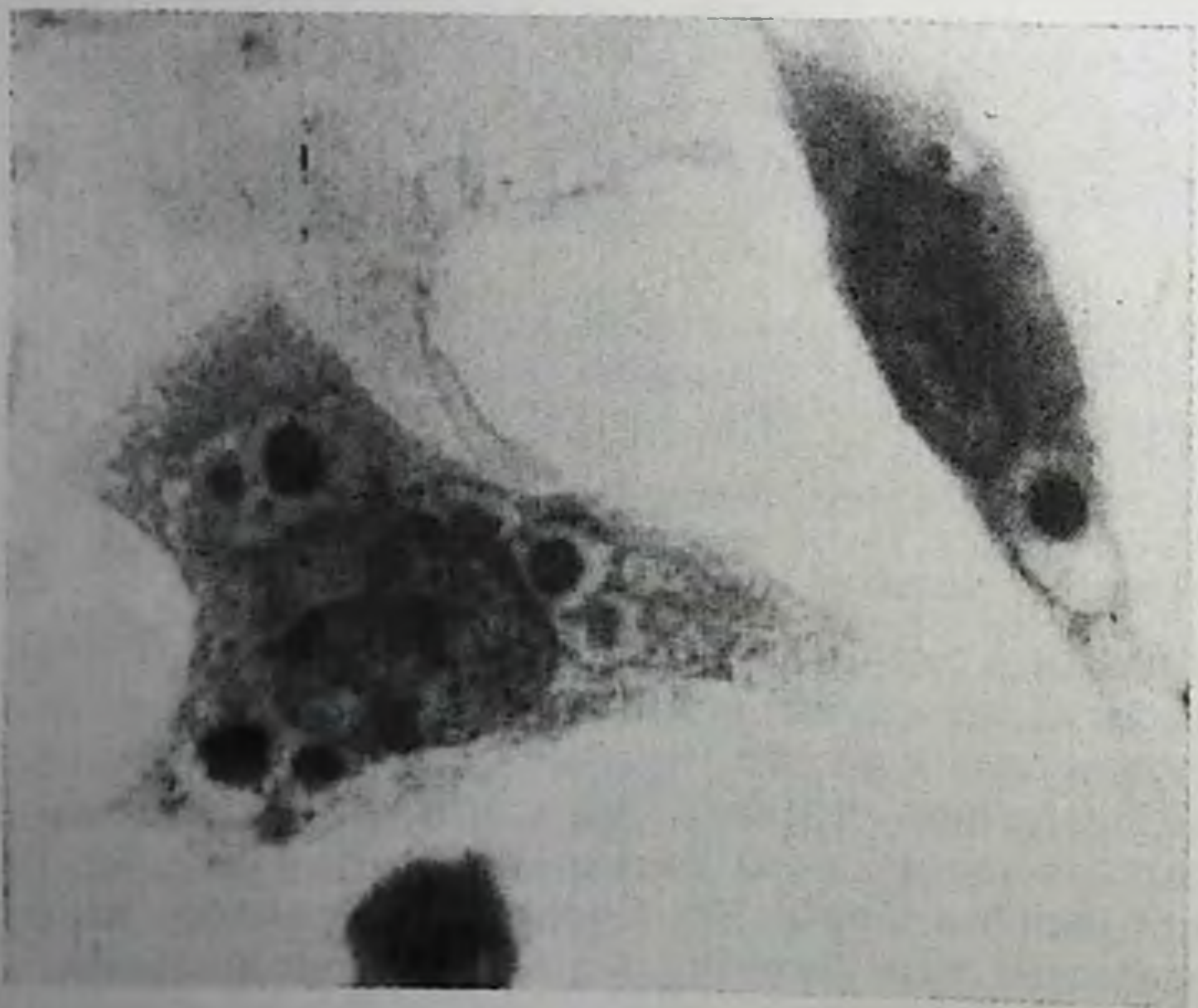
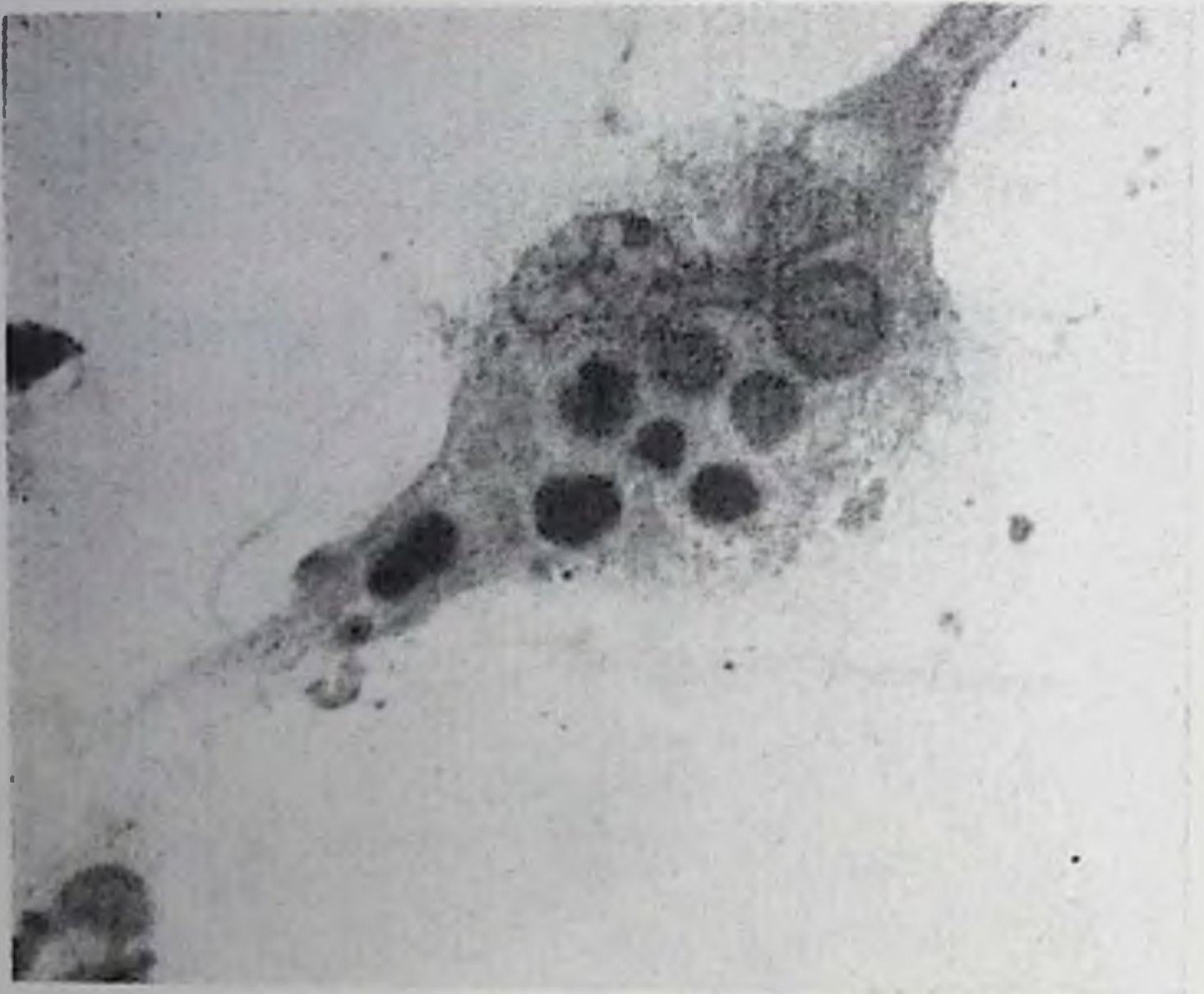


Рис. 3, 4. Опыт. Та же культура при большом увеличении (1000X). Внутри макрофагов видны лимфоциты, находящиеся в фагосомах на разных стадиях переваривания. Цитоплазма макрофага — в состоянии деструкции (цитопатогенный эффект).

«мишени самцов». Это делает возможным изучать в культуре на модели межклеточных взаимодействий иммунологические реакции не только на сильные, но и на слабые трансплантационные антигены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брондз Б. Д. В сб.: Вирусы, рак, иммунитет. М., 1965, 352—378.
2. Подоплелов И. И., М. М. Капичников, Ю. П. Сухов, Н. И. Дахина, И. А. Глинский, И. П. Косова, В. Г. Крюков, Б. П. Шадрин. В кн.: Материалы Всесоюзной конференции по общей иммунологии и противовирусному иммунитету, посвященная 125-летию со дня рождения И. И. Мечникова. М., 1970, I, 34—36.
3. Свет-Молдавский Г. Я., И. Ю. Черняховская, С. Н. Сура, З. Г. Кадагидзе. В сб.: Культура тканей в онкологии. М., 1968, 297—304.
4. Сорокина Н. Н., Т. А. Фадеева. В кн.: Материалы конференции молодых ученых. М., 1966, 117—119.
5. Сура С. Н., Г. Я. Свет-Молдавский, Е. В. Фукс. — *Бюлл. экпер. биол. и мед.*, 1967, 11.
6. Billingham R. E., W. K. Silvers, D. B. Wilson. — *Proc. Roy. Soc.*, 1965, 163, No. 990, 61—89.
7. Eichwald R., Silmsen. — *Transplant. Bull.*, 1955, 2, 148—149.
8. Eichwald R., B. Werzel. — *Transplantation*, 1965, 3, 4, 583—585.
9. Mariani T., C. Martinez, R. A. Good. — *Int. Arch. Allergy*, 1960, 16, 4, 216—232.
10. Rosenau W., H. D. Moon. — *Labor. Invest.*, 1961, 10, 6, 1909—1916.
11. Wilson D. B. — *J. Cell Comp. Physiol.*, 1963, 62, 273—286.

AN *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDY OF THE IMMUNOBIOLOGIC PROPERTIES OF MOUSE H-Y ANTIGEN

L. Nakov, S. Zhiukov, S. Evrev, K. Kirou, R. Popivanov,
M. M. Kapitchnikov, I. I. Podoplelov, N. N. Nastoyashchaja,
I. A. Glinsky, V. G. Kryukov, U. N. Soukhov

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria, and
Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical
Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

Antigenic differences at the H-Y-locus were detected in the CC57Br and CC57W inbred mouse lines which have not been examined previously. Skin transplantation from male to female animals (as well as preliminary introduction of male spleen cells into the female) induces a state of sensitization to H-Y-antigen, expressed by the rejection of the next and the following test-transplants. The repeated injection of higher doses of male mouse spleen cells into female mice of the same adequate strain induces in the females a steady state of tolerance to consecutive skin transplants from male animals.

In experiments with monolayer cultures from cells of CC57W line male animals the addition of lymphocytes of female animals of the same line preliminary immunized to male spleen antigens of a cytopathogenic effect has been observed. The phagocytosis of immune lymphocytes by the target cells was much higher than that of normal lymphocytes. A correlation between the intensity of target-cell cytopathogenic effect and the quantity of phagocytized immune lymphocytes has been established.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ-«МИШЕНЯМИ» И ЛИМФОЦИТАМИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫМИ К АНТИГЕНАМ H-2^k ЛОКУСА И МЕЧЕНЫМИ ³H-ТИМИДИНОМ

КАПИЧНИКОВ М. М., ШАДРИН Б. П., ПОДОПЛЕЛОВ И. И., ДАХИНА Н. Н., СУХОВ Ю. Н., ГЛИНСКИЙ И. А., БУЛАВА Г. В., КОСОВА И. П.

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва
НИИ скорой помощи им Склифосовского, Москва

Ведущая роль иммунных лимфоцитов в процессах отторжения алло-трансплантатов теперь уже не вызывает сомнений. Особенно большое значение в доказательстве этого факта имело использование моделей межклеточных взаимодействий *in vitro*. Однако, многие стороны механизма взаимодействия иммунных лимфоцитов с клетками-«мишенями» остаются еще неясными.

Для анализа этих механизмов наиболее широкое распространение получила методика Розенау и Мун (6). Количественное изучение цитопатогенного действия иммунных лимфоцитов на клетки-«мишени» (1, 7) показало, что определенную роль в гибели клеток-«мишеней» имеет на первом этапе наличие контакта поверхностных мембран взаимодействующих клеток.

В то же время появились данные (4), косвенно свидетельствующие о возможном переходе нуклеопротеидов из иммунных лимфоцитов в клетки-«мишени» при их взаимодействии.

В настоящем исследовании была поставлена задача изучения цитопатогенного эффекта и возможности непосредственного перехода меченых нуклеопротеидов из иммунных лимфоцитов в клетки-«мишени».

Эксперименты были проведены по модифицированной методике Розенау и Муна с использованием линии L-клеток, полученных из фибробластов мышей СЗН. В монослойную культуру на первые или третьи сутки после посева (100 000 клеток в 2 мл среды 199 с 20% бычьей сыворотки) добавляли по 5 млн. клеток (на пробирку), полученных из лимфоузлов мышей С57BL/6J, сенсibilизированных к антигенам локуса H-2 мышей СЗН. Контролем служили неспецифически сенсibilизированные клетки лимфоузлов и нормальные лимфоциты мышей С57BL и СЗН. В ряде опытов специфически (анти-СЗН) и неспе-

цифически (анти-B10D2) сенсibilизированные лимфоидные клетки предварительно были мечены H^{-3} тимидином (5).

В экспериментах первого варианта использовали иммунные лимфоциты, меченные 3H тимидином. Иммунные лимфоциты получали из подмышечных лимфоузлов от доноров мышей линии C57BL/6J, самцов, весом 20 г, которым в межлопаточную область трансплантировали полнослойные лоскуты кожи ($1 \times 1 \text{ см}^2$) от мышей-самцов линии СЗН, а через 40 дней их иммунизировали повторно подкожным введением в область лопаток 1 млн. клеток селезенки мышей СЗН. Мыши C57BL/6J контрольной группы были иммунизированы по такой же схеме антигенным материалом, взятым от мышей-самцов линии B10D2.

Подопытным животным обеих групп на 39, 40 и 41 день после первичной иммунизации вводили под кожу 3H -тимидин в суммарной дозе 1,5 микрокюри/г.

На третий день после повторной иммунизации у мышей брали регионарные (подмышечные) лимфоузлы и готовили из них взвесь лимфоидных клеток, которые по 5 млн. добавляли в пробирки.

Во втором варианте опытов использовали немеченые лимфоциты, а 3H -тимидин добавляли в культуральную среду в дозе 1 микрокюри/мл за два часа до фиксации.

Препараты фиксировали по Буэну и окрашивали гематоксилином через 4, 18 и 43 часа после добавления лимфоцитов; для радиоавтографии применяли эмульсию типа «р» НИКФИ; подсчет живых и мертвых L-клеток в опытах проводили через 72 часа.

Статистическую обработку проводили по критерию согласия (χ^2), с определением p .

Через 4 часа прижизненно и на препаратах как опытного, так и контрольного вариантов эксперимента можно было наблюдать прилипание лимфоцитов к округленным L-клеткам. К 18 часам многие L-клетки приобрели вытянутую, отростчатую форму. Количество прикрепившихся к ним лимфоцитов со времени возрастало, а также увеличивалось количество разрушенных и дегенеративно измененных L-клеток. Выше описанные изменения были наиболее выражены в опытных культурах, в которых добавляли специфически сенсibilизированные лимфоидные клетки. В препаратах можно было наблюдать «анастомозы» (мостики), образовавшиеся между лимфоцитами и L-клетками, которые оказались по данным киносъемки (3) отростками клеток «мишеней». Подсчеты обнаружили, что в опытных культурах число мертвых L-клеток (в 12 опытах) составляло 43%, а в контрольных — 23%, что свидетельствовало о более выраженном цитотоксическом эффекте специфически сенсibilизированных лимфоидных клеток. При радиоавтографическом исследовании, результаты которого приведены в таблицах 1 и 2, были обнаружены меченые лимфоциты и L-клетки, причем метка у последних локализовалась как в ядре, так и в цитоплазме. Среди меченых L-клеток можно было встретить как делящиеся, так и дегенеративно измененные и погибшие клетки. Часть анастомозов, которые образовывались между лимфоидными клетками и фибробластами, также были мечеными. Количество меченых фибробластов к 18 часам нарастало, а к 43 часам — уменьшалось.

Т а б л и ц а 1

Показатели включения метки (в %) в L-клетки после совместной инкубации их с мечеными ^3H -тимидином лимфоцитами

Время учета результата	Опыт	Контроль	P
	специфически sensibilizirovannye лимфоциты (анти-СЗН)	неспецифически sensibilizirovannye лимфоциты (анти-ВЮД2)	
4 часа	28,75	7,65	<0,01
18 часов	39,91	13,81	<0,01
43 часа	16,35	11,42	<0,01

Т а б л и ц а 2

Показатели включения ^3H -тимидина в L-клетки (в %) из культуральной среды

Время учета результата	Опыт	Контроль			P
	специфически (анти-СЗН) sensibilizirovannye лимфоциты	I	II	III	
		неспецифически (анти-ВЮД2) sensibilizirovannye лимфоциты	несensibilizirovannye лимфоциты C57BL/6J	без лимфоцитов	
4 часа	35,02	38,05	56,00	65,48	<0,1
18 часов	52,92	55,64	66,28	53,80	<0,1
43 часа	33,13	43,75	58,72	38,80	<0,1

Наличие в культуре меченых L-клеток может свидетельствовать о переходе в них ^3H тимидиновой метки ДНК из меченых иммунных лимфоцитов. Возможность этого перехода подтверждается также наличием меченых «анастомозов», образовавшихся между мечеными лимфоцитами и фибробластами. Сопоставление данных количественного и радиоавтографического исследований может говорить о наличии корреляции между процессами передачи ^3H -тимидиновой метки ДНК от лимфоцитов к клеткам-«мишеням» и цитотоксическим действием иммунных лимфоцитов. Об этом свидетельствуют данные (см. табл. 2) об уменьшении утилизации ^3H -тимидина L-клетками непосредственно из среды в присутствии иммунных лимфоцитов.

Таким образом, специфически sensibilizirovannye лимфоциты оказывают более выраженный цитотоксический эффект на культуру клеток-«мишеней», чем неспецифически sensibilizirovannye и нормальные аллогенные и сингенные лимфоциты.

Как показали наши исследования (3), одним из механизмов перехода меченых нуклеопротеидов может явиться фагоцитоз лимфоцитов

L-клетками, наблюдаемый особенно четко при киносъемке, а также на морфологических препаратах, исследуемых при больших увеличениях; при этом активность фагоцитоза в опытных культурах была более выражена, чем в контроле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брондз Б. Д. В сб.: Вирусы, рак и иммунитет. М., 1965, 362—375.
2. Подоплелов И. И., М. М. Капичников, Н. Н. Дахина, Ю. Н. Сухов, И. П. Косова, Б. П. Шадрин. В сб.: Трансплантация органов и тканей. Минск, 1969, 28—30.
3. Подоплелов И. И., М. М. Капичников, Ю. Н. Сухов, Н. Н. Дахина, И. А. Глинский, И. П. Косова, Б. Г. Крюков, Б. П. Шадрин. В кн.: Материалы Всесоюзной конференции по общей иммунологии и противовирусному иммунитету. М., 1970, I, 86—87.
4. Свет-Молдавский Г. Я., И. Ю. Черняховская. В сб.: Трансплантация органов и тканей. Минск, 1966, М, 359.
5. Шадрин Б. П., Н. Н. Дахина, Ю. Н. Сухов, Г. В. Булава, М. М. Капичников, И. П. Косова, И. А. Глинский, И. И. Подоплелов. В кн.: Материалы Всесоюзной конференции по общей иммунологии и противовирусному иммунитету. 1970, М., I, 102—103.
6. Roseau W., H. D. Maop. — *J. Lab. Invest.*, 1961, 106, 1909—1916.
7. Wilson D. B. — *J. Cell Comp. Physiol.*, 1963, 62, 273—286.

A STUDY OF THE INTERRELATIONSHIP BETWEEN TARGET-CELLS AND LYMPHOCYTES SPECIFICALLY SENSITIZED TO H-2^k LOCUS ANTIGENS AND LABELED WITH ³H-THYMIDIN

M. M. Kapitchnikov, B. P. Shadrin, I. I. Podoplelov, N. N. Dakhina, U. N. Sukhov, I. A. Glinsky, T. A. Bulava, I. P. Kossova

Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences and Sklifosofski Research Institute of Emergency Medicine, Moscow, USSR

SUMMARY

In studying the interrelationship between L-cells («target») and C57BL/6J immune lymphocytes sensitized to tissue antigens from C3H mice, the authors established an intensive cytopathogenic effect of the specifically immune lymphocytes, in contrast to the effect of nonspecifically immune (to BIOD2 mice tissue antigens) lymphocytes and of the intact allogenic and syngenic lymphocytes.

Further, it was demonstrated, that the uptake of ³H-thymidin by the target cells was achieved at the expense of the immune lymphocytes and not of the culture medium. The authors believe, that the uptake of ³H-thymidin by the L-cells can be best explained with the phenomenon of lymphocyto-phagocytosis, i. e. phagocytosis of the ³H-thymidin labelled lymphocytes by the target cells.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИММУННЫХ ЛИМФОЦИТОВ И КЛЕТОК-«МИШЕНЕЙ» В КУЛЬТУРЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦЕЙТРАФЕРНОЙ МИКРОКИНОСЪЕМКИ

В. Г. КРЮКОВ, И. А. ГЛИНСКИЙ, И. И. ПОДОПЛЕЛОВ, Ю. Н. СУХОВ, И. П. КОСОВА

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Одним из важных рычагов процесса в развитии экспериментальной биологии, бесспорно, является широкое использование возможностей, создаваемых научно-технической революцией в этой области. Сюда с полным правом можно отнести современную технику прижизненной микроскопии и ее фото- и кинодокументацию.

Кинематография уже давно заслужила славу чрезвычайно ценного для естествознания метода, который помогает наблюдать многие явления, протекающие скрытно, и делает их доступными тщательному наблюдению и изучению (4).

Преодолевающий неконтрастность микрообъекта фазовоконтрастный микроскоп в сочетании с киносъёмочной камерой, которой автоматически управляет «машина времени» — цейтрафер, представляет собой мощное орудие познания живой клетки. Кинофильм, снятый при помощи цейтрафера, как бы сжимает, сокращает для наблюдателя в произвольное количество раз время протекания медленных процессов, таких, как: взаимодействие клеток, реакции клетки на различные факторы внешней среды, иммуноадгезия, фагоцитоз и др. (3, 6).

В иммунологии применение цейтраферной микросъёмки стало особенно актуальным в связи с интенсивным развитием учения о клеточном иммунитете. Согласно современным данным в основе клеточного иммунитета лежит реакция взаимодействия специфически sensibilizированных лимфоцитов с клетками-мишенями. Фильмы, посвященные этому взаимодействию, обнаружили накопление лимфоцитов вокруг клеток-«мишеней», вслед за которым наступал цитопатогенный эффект — гибель клетки. Однако механизм этого взаимодействия остался неясным (8, 9, 10).

Нами было показано, что в развитии цитопатогенного эффекта при взаимодействии иммунных лимфоцитов с клетками-«мишенями» участвует феномен фагоцитоза лимфоцитов (5), который до этого при кино-



Рис. 1 (а, б, в и г). Активация выростов эктоплазмы L-клетки, предшествующая фагоцитозу.

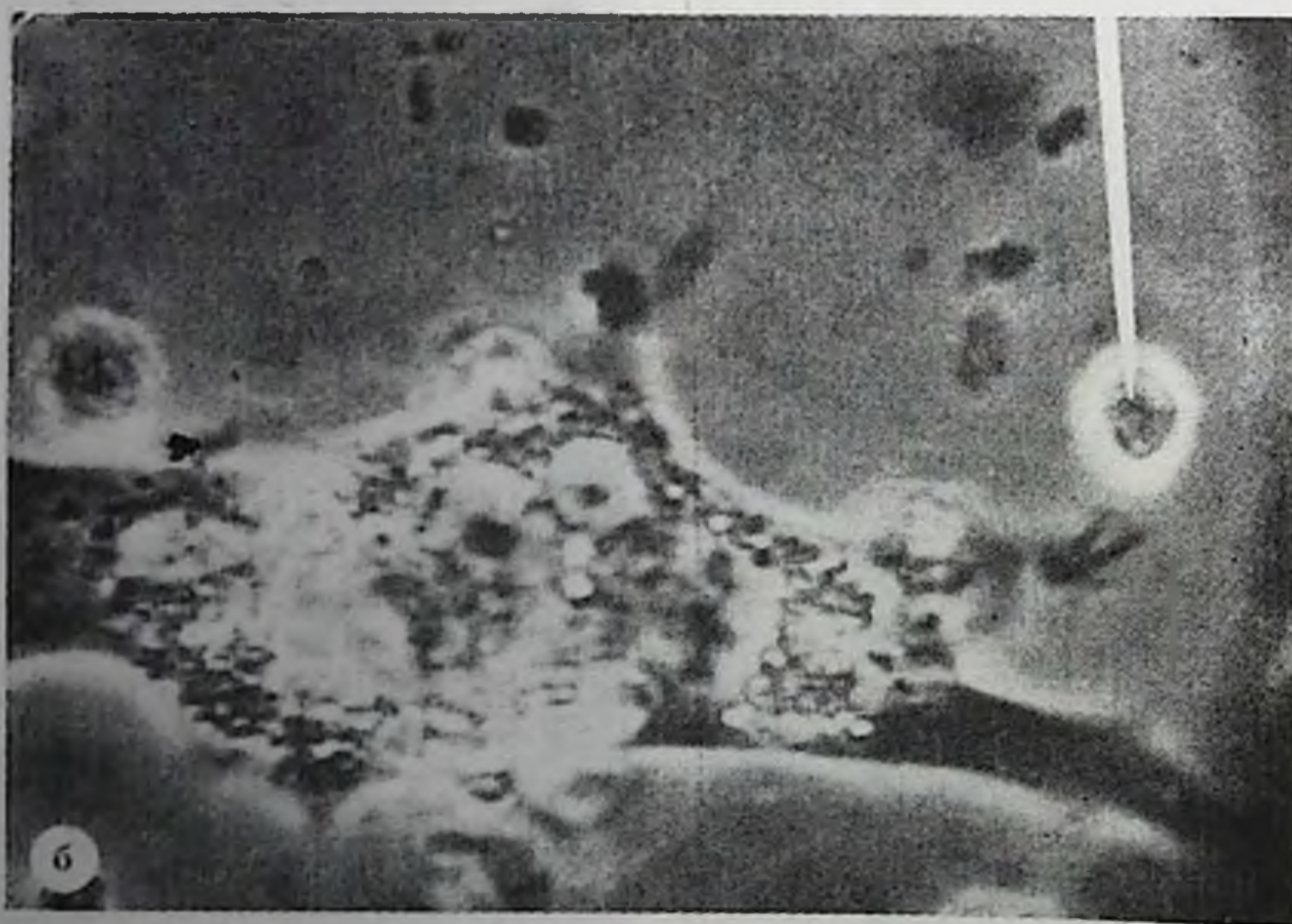
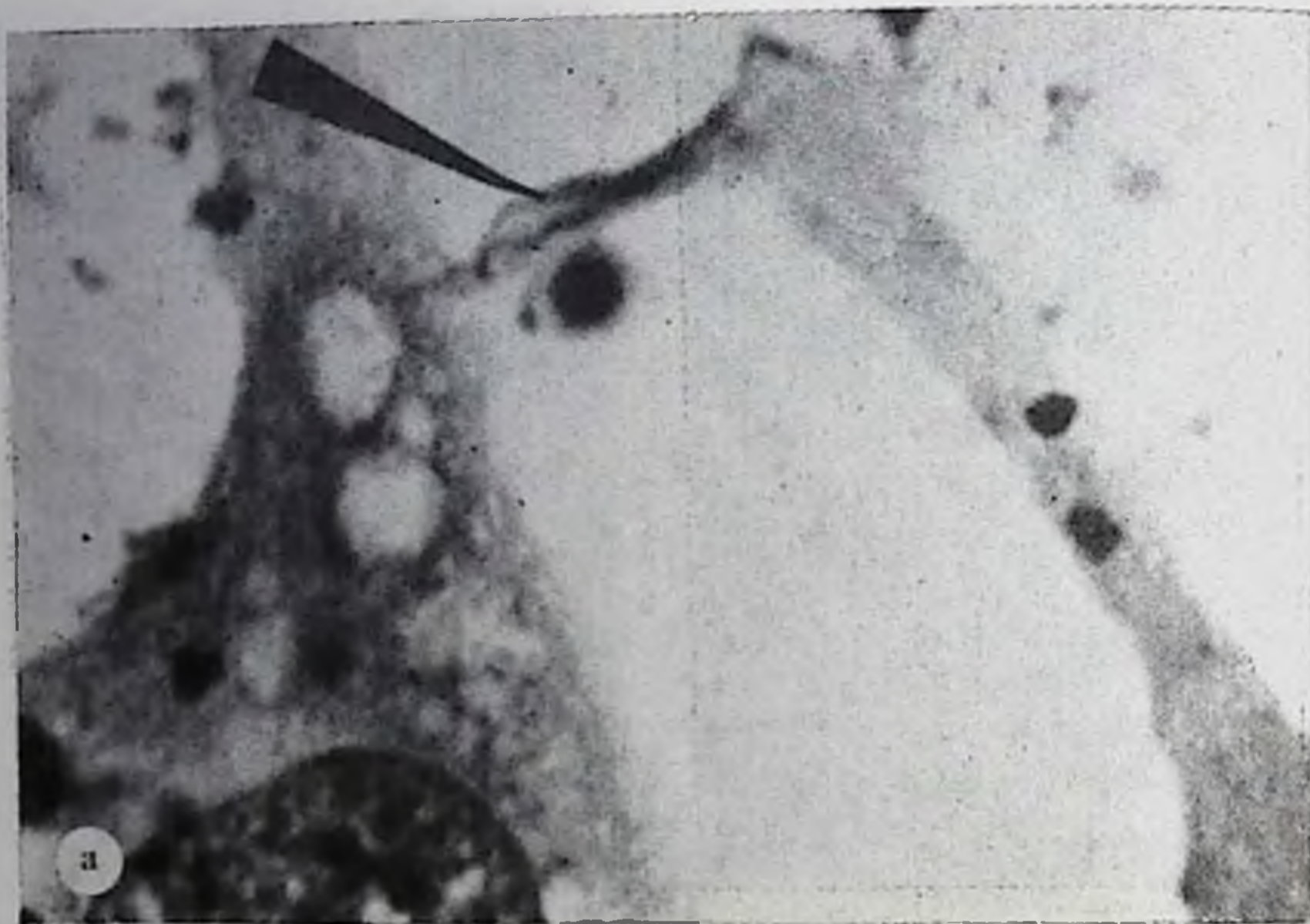
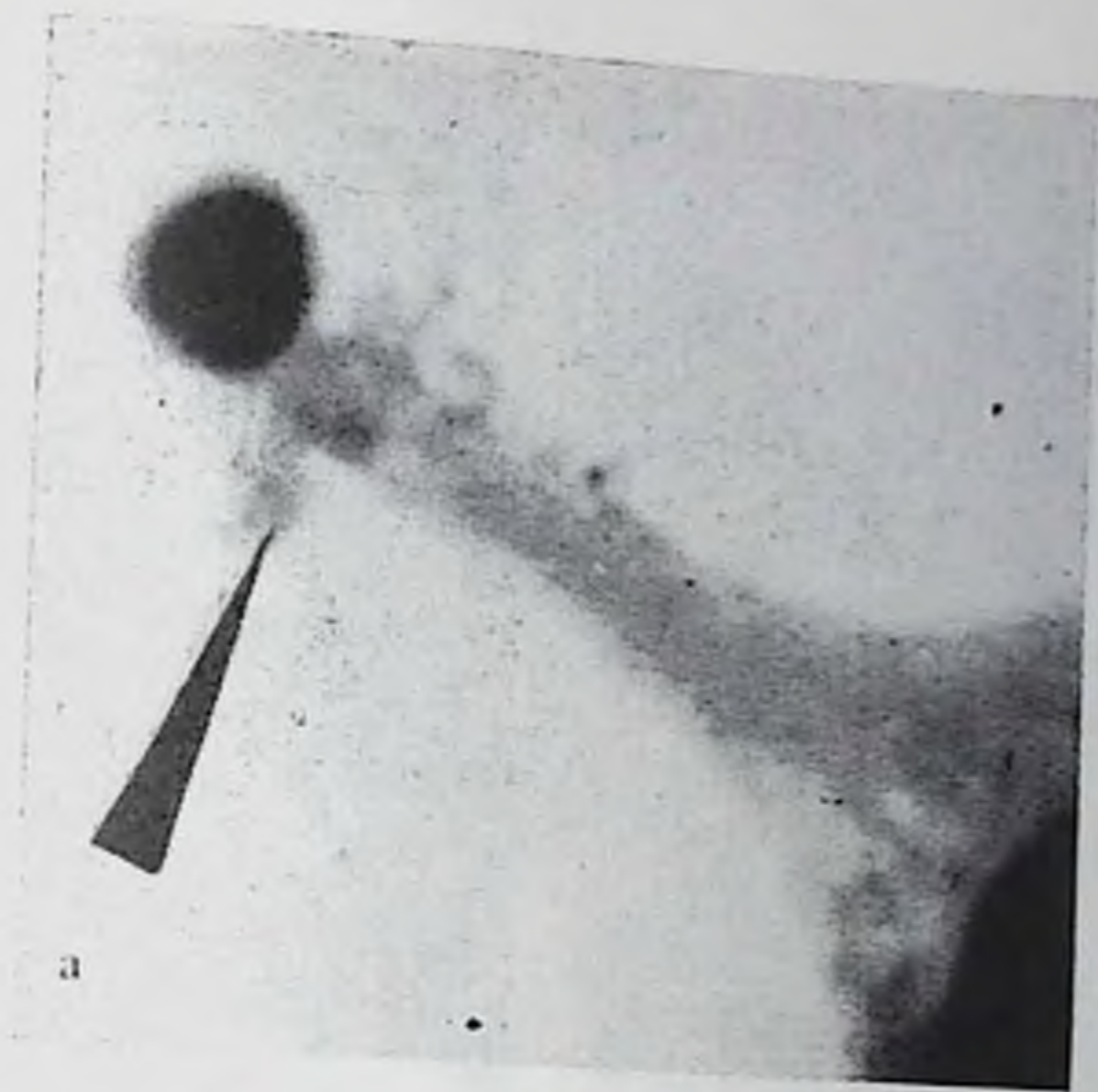
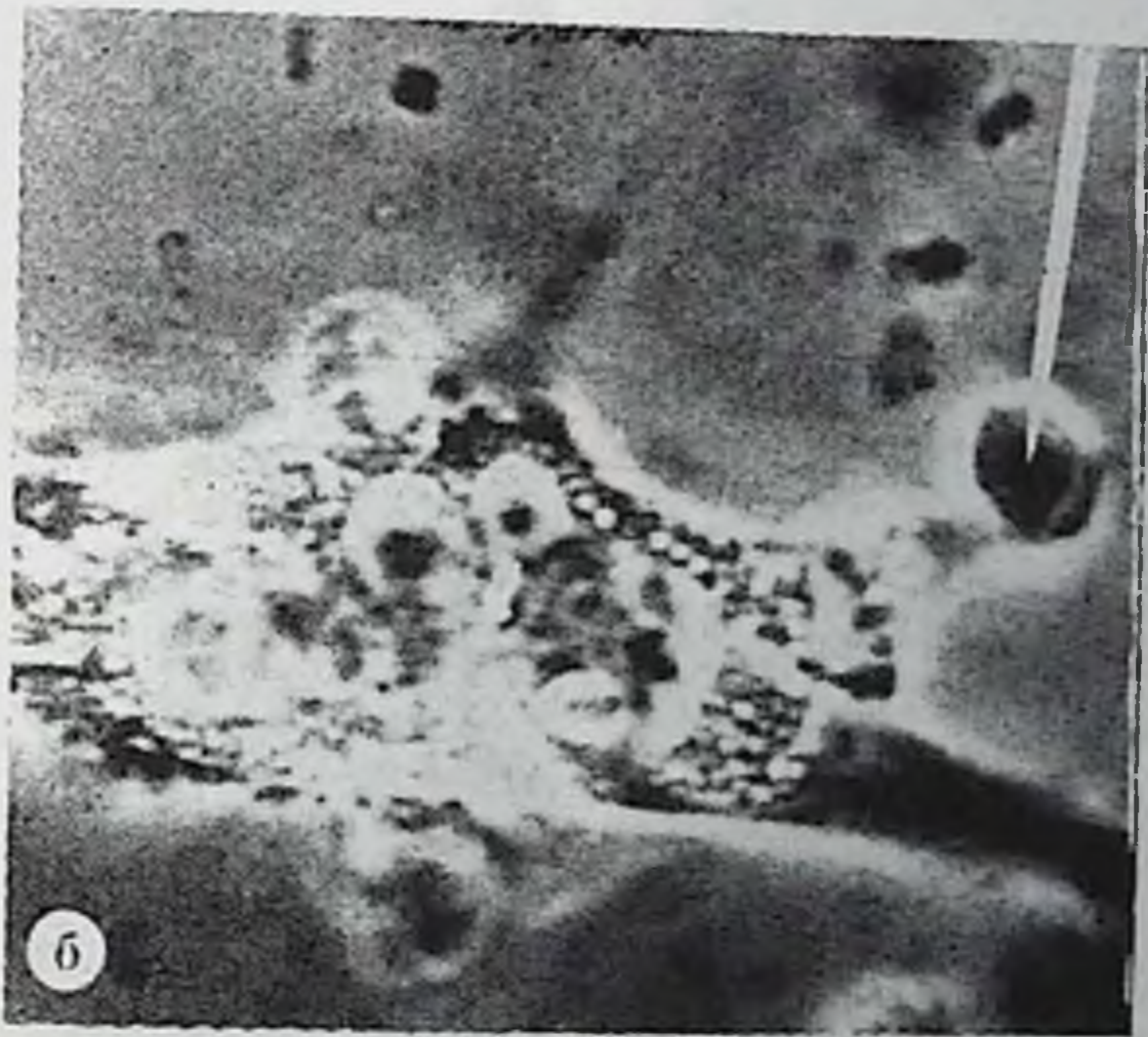


Рис. 2 (а и б). Стадия сближения эктоплазматического выроста с лимфоцитом.



а



б

Рис. 3 (а и б). Стадия аттракции. Прилипание эктоплазматического выроста и последующий охват лимфоцита

На рис. 2б, 3б, 4б, 5б, 6б даны кинокадры последовательных этапов фагоцитоза одного лимфоцита клеткой L на третьи сутки после добавления иммунных лимфоцитов к культуре L-клеток. На тех же рисунках (1а, 3а, 4а, 5а, 6а, б) сопоставляются соответствующие им моменты на фиксированных и окрашенных препаратах. Иммунные лимфоциты взяты от мышей линии С57В1; клетки «мишени» — L-клетки. Препараты фиксированы по Буэнеу, окрашены гематоксилином Майера. Увеличение на кинокадрах: рис. 1а — 1300х, на остальных кинокадрах — 1600х. Увеличение микрофотограмм — 2000х. Стрелками отмечены крупные и мелкие эктоплазматические выросты. С помощью белого указателя на кинокадрах отмечен фагоцитируемый лимфоцит. Соответствующие картины кинокадров и микрофотографий с препаратов обозначены общей цифрой и отличаются буквами.



Рис. (4 *a* и *б*). Последующее продвижение фагоцитированного лимфоцита к центру L-клетки. Образование фагосомы вокруг лимфоцита (стадия внутриклеточного положения).

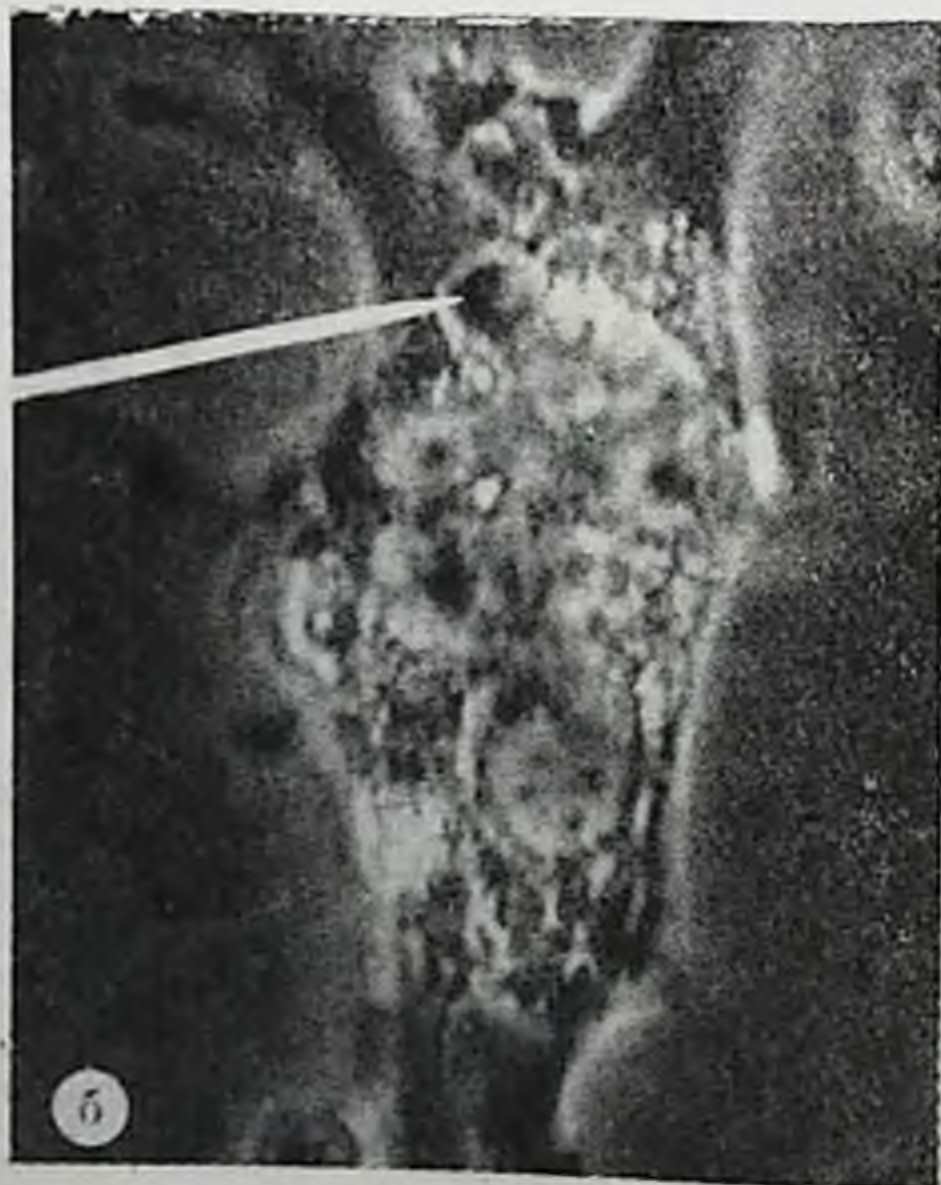


Рис. 5 (*a* и *б*). Сбразование фагосом вокруг лимфоцита (стадия внутриклеточного положения).

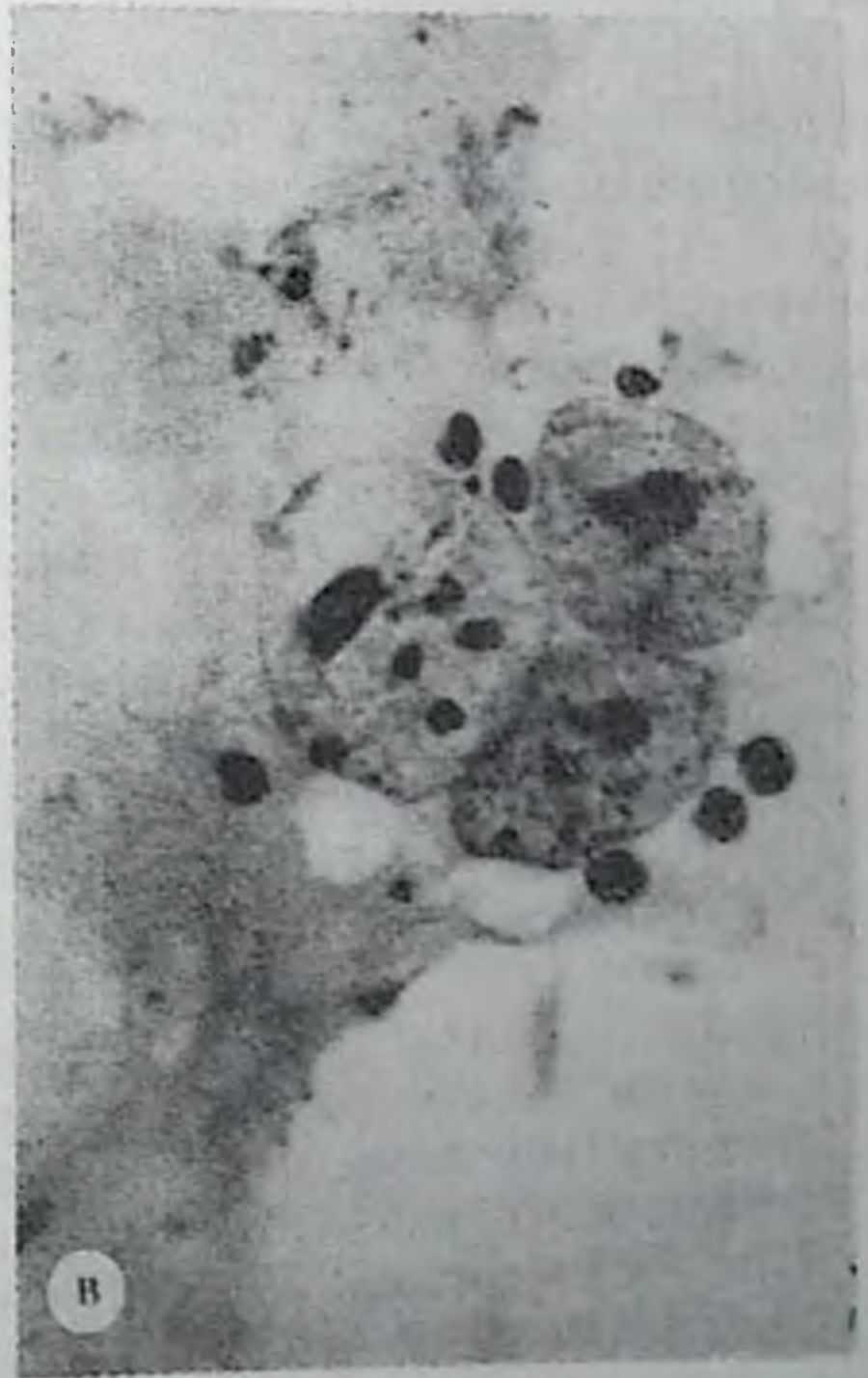
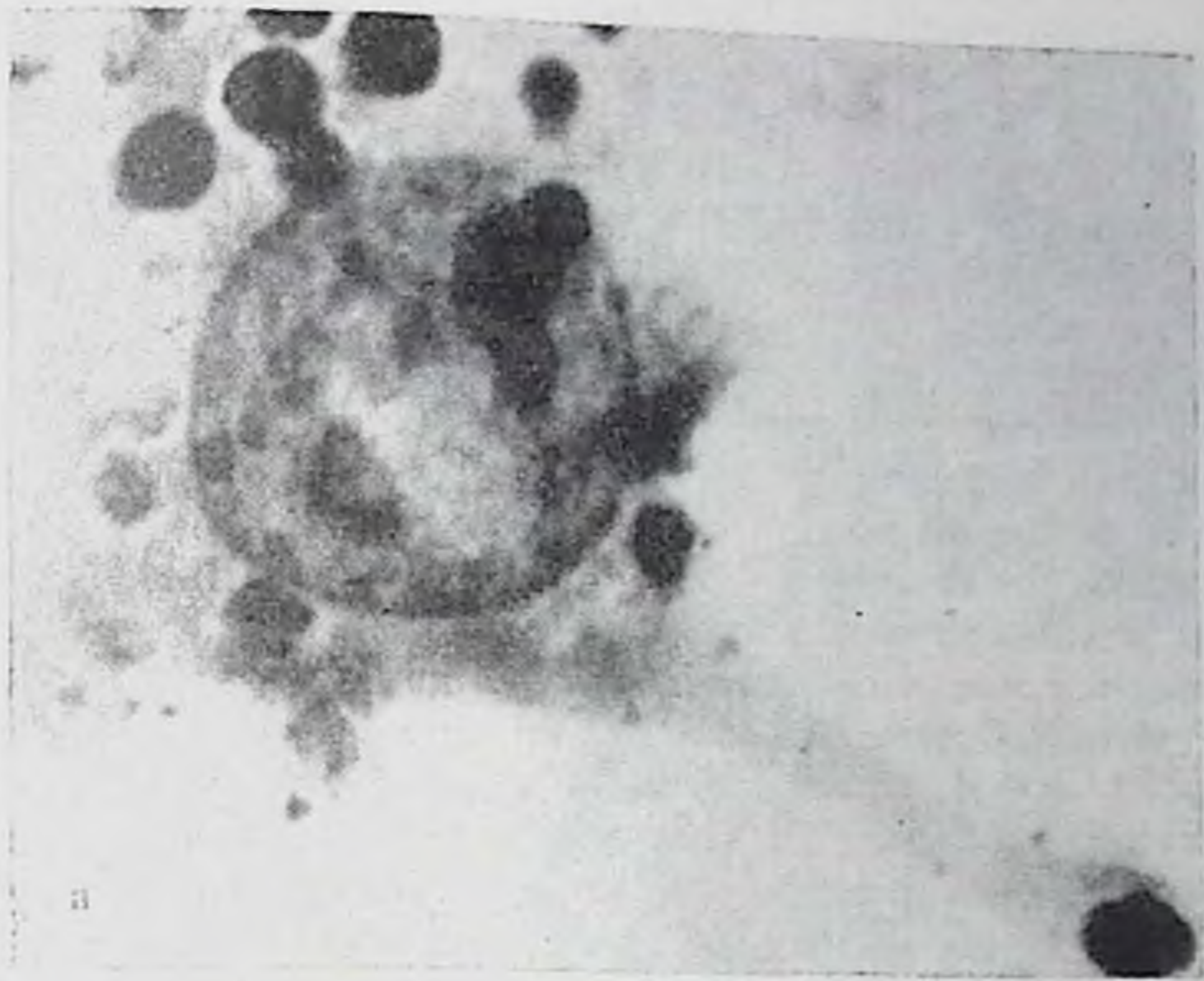


Рис. 6. Этапы деструкции фагоцитированного лимфоцита. Начало деструкции L-клетки.

съемках опытов, поставленных в условиях культуры клеток по методике Розенау и Муна, не был обнаружен.

Поэтому представляло интерес дальнейшее более углубленное изучение взаимодействия клеток-«мишеней» с иммунными лимфоцитами при помощи микрокиносъемки, с последующим детальным покадровым анализом.

К монослойной культуре клеток линии L добавляли иммунные лимфоциты, взятые от мышей линии C57BL. Процесс межклеточного взаимодействия снимали через обращенный микроскоп с фазово-контрастным устройством на 35 мм киноплёнке при помощи кинокамеры, сопряженной с цейтрафером. Общее увеличение — 1600 раз. Под наблюдением и киносъемкой находилась одна клетка в течение 3 суток. Параллельно изготовляли постоянные препараты: фиксация по Буэну, окраска гематоксилином Майера.

Клетка L — объект киносъемки — в первые же часы после добавления иммунных лимфоцитов находилась в контакте с ними. Большое количество лимфоцитов скользило по ее поверхности, а часть — прилипало к ней. В конце вторых суток L-клетка в опытной культуре последовательно фагоцитировала несколько лимфоцитов. Покадровый анализ кинодокументации позволил отметить интересные подробности этого феномена (рис. 1—6): захвату лимфоцитов клеткой-«мишенью» предшествует интенсивное образование ею выростов эктоплазмы (I), появляющихся и исчезающих на теле клетки и на ее отростках. Такие выросты активно меняют свою форму, принимая вид «парусов», «мембран», «пальцев», «ковша» и т. д. (рис. 1a). Вначале эктоплазматический вырост как бы обследует окружающую среду, «ощупывает» лимфоцит, обволакивает его, затем продвигает заглоченный лимфоцит по направлению к центральной части клетки (рис. 2b, 3b, 4b, 5b). При этом вокруг лимфоцита образуется вакуоль-фагосома. При заглатывании нескольких лимфоцитов в фагосомах заметны разные стадии деструкции лимфоцитов: распад цитоплазмы, уменьшение оптической плотности ядра, изменение его конфигурации и распад на фрагменты. В то же время в цитоплазме L-клетки образуется грубая зернистость, которая является начальной стадией деструкции клетки-«мишени» (рис. 5b, 6b). Деструктивные процессы, происходящие в клетке-«мишени» в результате заглатывания большого количества лимфоцитов, были при киносъемке менее выражены, чем на препаратах, где, в силу массовости материала, можно было проследить дальнейшую судьбу лимфоцитов и фагоцитировавших их клеток-«мишеней» и использовать количественные подсчеты.

При исследовании кинодокументации контроля, при котором к L-клеткам были добавлены неиммунные лимфоциты, феномен фагоцитоза со стороны L-клетки — объекта киносъемки — не был обнаружен, что соответствует меньшей фагоцитарной активности, выявленной в контроле на фиксированных препаратах. Однако контактирование лимфоцитов с клетками L было достаточно выражено и в контроле.

При сопоставлении соответствующих стадий фагоцитоза, выявленных последовательно микрокиносъемкой, с такими же картинами на

препаратах (см. рис. 1—6) была полностью подтверждена высокая степень достоверности феномена лимфофагоцитоза на препаратах, а также возможность выявления на них последовательности этого процесса.

Говоря о реальности лабильных эктоплазматических выростов, обнаруживаемых прижизненно и особенно активных у фагоцитирующих клеток (1), В. Г. Елисеев утверждает: «На фиксированных и окрашенных препаратах мы никогда не получаем данных структур» (2). В то же время именно в этих условиях (при использованном нами методе фиксации и окраски) в монослойных культурах клеток они были документированы чрезвычайно отчетливо. Это означает, что сравнительный анализ фиксированных препаратов и кадров микрокиносъемки может помочь более полному раскрытию объема информации, содержащейся как в тех, так и в других.

Полученные данные, также как и наши наблюдения взаимодействия сперматозондов с соматическими клетками (7), указывают на большое значение цейтраферной микрокиносъемки в комплексном изучении интимных сторон иммунологических процессов. Без сомнения, значительное место в таких исследованиях принадлежит тщательному покадровому анализу микрокинодокументации и сравнению с фиксированными препаратами.

После опубликования наших данных (5) в литературе появились краткие указания о выявлении с помощью цейтраферной киносъемки фагоцитоза сенсibilизированных лимфоцитов раковыми клетками в условиях культуры (11). Эта работа также говорит о том, что клетка-«мишень» не является только объектом «агрессии».

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Я., З. И. Крюкова. — *Изв. АН СССР. сер. биол.*, 1950, № 2, 68—90.
2. Елисеев В. Г. В кн.: Труды Омского мед. ин-та, № 17. Сб. науч. работ кафедры гистологии, вып. 2, Омское обл. Гос. изд. Омск, 1950, 19—50.
3. Кравченко А. Т., В. Н. Милютин, О. С. Гудима. Микрокиносъемка в биологии. Медгиз, 1963. 153—175.
4. Опарин А. И. В сб.: Наука и кино. М., Госкиноиздат, 1950, 23.
5. Подоплелов И. И., М. М. Капичников, Ю. Н. Сухов, Н. Н. Дахина, И. А. Глинский, И. П. Косова, В. Г. Крюков, Б. П. Шадрин. В кн.: Материалы Всесоюзной конферен. по обшей иммунологии и противовирусному иммунитету, посвященная 125-летию со дня рождения И. И. Мечникова, состоявш. 18—20 марта. М., 1970, 68—69.
6. Поликар В. А., М. Бесси. Элементы патологии клетки. Пер. с фран. А. М. Карпаса. М., «Мир», 1970, 348 с.
7. Попиванов Р. П., С. М. Живков, Л. С. Наков, Г. П. Трибулев, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, В. Г. Крюков. *ДАН СССР*, 1968, 181, 4, 987—988.
8. Able M., J. See, W. Rosenau. — *Amer. J. Pathol.*, 60, 1970, 3, 421—434.
9. Ax W., H. Malchow, J. Zeiss, H. Fischer. — *Expt. Cell. Res.*, 53, 1968, 1, 108—111.
10. Baker P., R. S. Weiser, J. Jutila, C. A. Evans, R. J. Blandau. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 101, 1962, 1, 46—62.

11. Katsuta H., T. Takaoka, G. Ishibashi, K. Ashikava. In: Tissue Culture Studies in Japan. The annual bibliography. The 30th Meeting of the Japanese Tissue Culture Association (held on December 3 and 4, 1970). Tokio, 1971.

STUDIES ON THE INTERRELATIONSHIP BETWEEN IMMUNE LYMPHOCYTES AND TARGET CELLS IN CULTURES BY MEANS OF TIME-LAPS MICROKINEMATOGRAPHY

V. G. Kryukov, I. A. Glinsky, I. I. Podoplelov, U. N. Soukhov, I. P. Kossova

Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The interrelationship between L-cells, used as target cells and lymphocytes from mouse strain C57BL (immune to strong H-2^k-locus antigens) has been studied on monolayer cell cultures with the help of time-laps microcinematography for 3 days. The analysis of the cinefilm along with the simultaneous study of the fixed and stained cover-slip preparations disclosed the similarity of the pictures, obtained by both methods. In this way new evidences have been adduced, confirming the participation of the phenomenon of immune phagocytosis of lymphocytes by target cells in the development of the cytopathogenic effect. The cinematographic study of the control cultures revealed that the interrelationship between the L-cells and the lymphocytes is expressed in a lesser degree, than in the experiment. At the same time the phenomenon of phagocytosis could not be demonstrated.

The obtained data confirm the importance of the time-laps microcinematography as a method in the study of the specific details of cellular interrelationship.

РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО
И ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ИММУНИТЕТА

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ГИДРОКОРТИЗОНА НА МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛИ БРОУНА—ПИРС

МАЙСКИЙ И. Н., Г. П., АЙРАПЕТЬЯН, Т. А. ПОКРОВСКАЯ

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В настоящее время существует значительное число работ, посвященных изучению действия кортикостероидных гормонов на рост и метастазирование злокачественных новообразований у экспериментальных животных, однако их результаты довольно противоречивы. В ряде сообщений указывается на усиление прививаемости опухолевых трансплантатов (5, 3) и распространение метастазов (11, 4, 12, 2) при обработке животных гидрокортизоном, по данным других авторов, этот препарат не влиял на частоту, время появления опухолей и их метастазов (7, 6).

Известно, что гидрокортизон значительно снижает число лимфоцитов и эозинофилов крови, тормозит синтез ДНК в клетках лимфоидных органов (1, 9, 8), вызывая иммунодепрессивное состояние организма. Однако, Стивенс и Даугерти (1967) подчеркивают значение длительности введения гормона для проявления его подавляющего действия на синтез нуклеиновых кислот, так как при многократном введении гидрокортизона не обнаруживалось достоверных изменений в содержании ДНК в лимфоидных органах мышей.

Целью настоящей работы являлось выяснение действия различных доз гидрокортизона, применяемых по одной схеме, на метастазирование опухоли Броуна—Пирс у кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты поставлены на 28 половозрелых кроликах-самцах породы шиншилла, весом 3,2—3,4 кг. Было проведено две серии экспериментов. В первой серии гидрокортизон-ацетат фирмы «Рихтер» вводили на протяжении 7 дней внутримышечно, суммарная доза составила 55 мг на кг веса животного. Во второй серии опытов доза гидрокортизона, введенного по той же схеме, была увеличена, и каждый кролик получил по 110 мг на кг своего веса.

Контрольным группам животных в аналогичных условиях инъецировался физиологический раствор в количествах, соответствующих объемам гидрокортизона в опыте. На следующий день после окончания обработки гидрокортизоном животным опытной и контрольной групп вводили внутритестикулярно по 1 мл 40% взвеси клеток опухоли Броуна—Пирс. Через 18 дней после прививки опухоли кролики всех групп одновременно забивались и проводилось сравнительное сопоставление степени поражения органов метастазами в опытных и контрольных группах. Подсчет метастазов производили следующим методом: вначале учитывали количество метастазов на поверхности органа, а затем его разрезали последовательно на кусочки в 0,5 см толщиной и вели подсчет в каждом срезе. В тех случаях, когда в органе имелось большое число метастазов, их подсчет осуществляли на единицу веса иссеченного кусочка, а затем пересчитывали на вес органа в целом. Конгломераты метастазов во всех случаях условно принимались за 100 единиц. Все цифровые данные подвергались статистической обработке по Фишер—Стьюденту. Достоверность различия была не более 0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

Оценка степени метастазирования в каждой группе производилась по таким показателям: среднему числу пораженных органов, приходящемуся на одного кролика, среднему числу метастазов на один пораженный орган и среднему числу метастазов в расчете на одного кролика.

Полученные данные обобщены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели метастазирования опухоли Броуна—Пирс при воздействии гидрокортизона

Серия опытов	Группы кроликов	Доза гидрокортизона	Количество животных	Среднее число пораженных органов на 1 кролика	Среднее число метастазов на пораженный орган	Среднее число метастазов на 1 кролика
Первая	Обработаны гидрокортизоном	55 мг/кг	8	5,8	2640,4	3063,8
	Без гидрокортизона	—	8	5,0	984,6	1141,1
Вторая	Обработаны гидрокортизоном	110 мг/кг	7	6,3	9279,3	10392,5
	Без гидрокортизона	—	7	6,1	971,8	951,3

При сравнении результатов экспериментов первой серии, где доза гидрокортизона в опытной группе составила 55 мг/кг, можно видеть, что локализация метастазов по органам была, примерно, одинаковой, как в опытной, так и в контрольной группах. Различие между средним числом пораженных органов на одного кролика в группе, обработанной гидрокортизоном (5, 8), и этим показателем в контрольной группе (5,0) не является статистически достоверным ($P=0,342$).

Аналогичные результаты получены во второй серии опытов, где доза гидрокортизона была увеличена до 110 мг на кг веса кролика. Среднее число пораженных органов, приходящееся на одного кролика, не имело статистически достоверного различия в опытной и контрольной группах (соответственно 6,3 и 6,1).

Свершено другие данные были получены при анализе интенсивности метастазирования в отдельные органы.

В первой серии экспериментов, в группе, обработанной гидрокортизоном (в дозе 55 мг), среднее число метастазов на один пораженный орган составило 2640,4 в то время как в контроле оно равнялось лишь 984,6. Примерно о таком же усилении метастазирования при обработке гидрокортизоном можно было судить по другому показателю — среднему числу метастазов, приходящихся на одного кролика в группе: 3063,8 — в опытной группе и 1141,1 — в контроле.

Особенно четкое влияние действия гидрокортизона на метастазирование проявилось во второй серии экспериментов, когда доза гидрокортизона была увеличена вдвое (110 мг). Степень пораженности органов метастазами в данных опытах повысилась в 65 раз по сравнению с контролем. Это следует из того, что в группе кроликов, обработанных гидрокортизоном, среднее число метастазов на один орган составило 9279,3 и среднее число метастазов, приходящихся на одного кролика — 10 392,5. В контрольной группе эти цифры были соответственно равны 971,8 и 951,3.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов показана прямая зависимость между интенсивностью метастазирования и дозой гидрокортизона, так как длительность и способ его введения были одинаковыми в обеих сериях опытов. Можно допустить, что иммунодепрессивное действие гидрокортизона на организм, обуславливающее, в частности, стимуляцию роста и метастазирования злокачественных опухолей, наблюдается в тех случаях, когда обработка животных проводится не длительно и большими дозами гормона. Очевидно, при многократных воздействиях возникают популяции иммунокомпетентных клеток, способные инактивировать гидрокортизон и ослабить его иммунодепрессивное действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зак К. П., В. С. Шляховенко, В. А. Шляховенко. — *Цитология*, XI, 1969, № 11, 1434.
2. Ильин М. И. В. кн.: Тез. докл. на конф. молодых ученых, АМН СССР. М., 1970, 9—11.

3. Ломакин М. С., Ю. С. Кривошеин. — *Неоплазма*, 1965, 12, 5, 495.
4. Baserga R., P. Shubik. — *Science*, 1954, 155, 121, 100.
5. Gasic G., J. Gasic. — *Brit. J. Cancer*, 1957, 11, 88.
6. Fisher E., B. Fisher. — *Cancer Res.*, 1960, 20, 492.
7. Kaliss N., R. Borges, E. Day. — *Cancer Res.*, 1954, 14, 210.
8. Makman M., S. Nakagawa, A. White. — In: *Recent progr. hormone res.*, 1967, 23, 195.
9. Nakagawa S., A. White. — *Endocrinology*, 1967, 81, 861.
10. Stevens W., J. Dougherty. — *Proc. Soc. Exp. biol. med.*, 1967, 124, 542.
11. Wood J. et al. — *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, 1956, 2, 157.
12. Zimel H., A. Macrineanu. — *Neoplasma*, 1970, No. 4, 349.

THE INFLUENCE OF HYDROCORTISONE DOSAGE ON THE METASTASIZING RATE OF THE BROWN—PEARCE TUMOR

I. N. Maisky, G. P. Ayrapetyan, T. A. Pokrovskaya

Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The authors studied the influence of different doses of hydrocortisone (55mg/kg and 110mg/kg) on the metastasizing rate of the Brown—Pearce tumor in rabbits. The two fold raise of the hydrocortisone dose increases 65 times the metastasizing rate of the tumor. The interrelationship between the metastasizing rate and the immunosuppressive power of hydrocortisone is discussed.

О НАЛИЧИИ АНТИТЕЛ К КЛЕТКАМ HeLa В СЫВОРОТКАХ БОЛЬНЫХ РАКОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Т. ПОКРОВСКАЯ, Л. МАРХОЛЕВ, Б. БОТЕВ, СТ. ЖИВКОВ, ЗЛ. ДУДУНКОВ,
Х. ШИВАЧЕВ, Б. ВАСИЛЕВ, И. РУМЕНОВ

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва; Кафедра общей биологии
Медицинской академии, София, Болгария

За последние годы накопилось довольно много данных о наличии специфических для опухолей антигенов (СОА) в злокачественных новообразованиях (2, 11—13, 17, 22). В ряде работ сообщается о сходном белковом составе и об общих специфических антигенах в некоторых злокачественных опухолях человека (3, 4, 9, 10, 18—20). На основании вышесказанного можно предположить, что в крови людей, больных раком, могут появиться антитела, реагирующие с клетками различного типа опухолей.

Это в какой-то мере подтверждается в работах, где обнаружено ингибирующее действие сыворотки раковых больных на рост клеток HeLa (19) и цитотоксический эффект иммунной сыворотки, полученной иммунизацией кроликов смесью различных эпителиальных опухолей человека на клетки линии HeLa и Detroit (5, 6). Однако, исследования других авторов не подтвердили эти данные (7, 8, 15, 16).

Учитывая все вышензложенное, представляло определенный интерес изучить сыворотки больных, используя в качестве тест-антигена стандартные опухолевые клетки, культивируемые *in vitro*. Для анализа антител в сыворотках больных решено было использовать сравнительно новую и чувствительную методику иммуноприлипания. Путем повторных обследований сыворотки у части больных через 12—20 дней после операции, мы пытались установить также, отражается ли удаление опухоли на иммунной реакции организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сыворотку у больных раком брали после госпитализации и выяснения диагноза непосредственно до начала лечения. У определенной части больных кровь для исследования брали повторно через 12—20

дней после оперативного удаления опухоли. После декомплементации (содержание в водяной бане при 56°C в течение 20 минут) сыворотку сохраняли в ампулах при температуре -25°C . Для большей достоверности при сравнении результатов сыворотку одного и того же лица исследовали одновременно.

С целью определения специфичности реакции, наряду с сывороткой больных раком, использовали также сыворотки больных неопухольными гинекологическими заболеваниями и сыворотки клинически здоровых людей.

Сыворотку исследовали на наличие антител к клеткам раковых линий HeLa, KB, HEP-2 и Detroit, культивируемых *in vitro*. За 2 дня до опыта клеточные культуры помещали в пробирки с питательной средой MEM-0311 с добавлением 20% телячьей сыворотки. Суспензия содержала 20 000—30 000 клеток/мл.

Эритроциты для опыта брали всегда у одного и того же здорового лица с группой крови 0, Rh+ и сохраняли при 4°C в модифицированном растворе Alsever.

В качестве *комплемента* использовали сыворотку крови морских свинок, которую брали у 7—8 животных путем интракардиальной пункции и сохраняли не более 1-го месяца в ампулах при температуре -25°C . Наличие антител определяли по методу иммуноприлипания (14).

Методика постановки реакции. В пробирки с двухсуточными клеточными культурами, предварительно отмытыми 4-кратно физиологическим раствором и однократно сахарозо-желатиновым вероналовым буферным раствором (SGVB* при pH —7,6), добавляли по 1 мл испытуемой сыворотки, соответственно разведенной в SGVB. Разведение сыворотки начинали обычно с 1 : 10 с последующим двухкратным увеличением до соотношения 1 : 5120—1 : 20480 (всего 10—12 пробирок). После 30-минутного содержания при комнатной температуре в каждую пробирку добавляли по 1 мл сыворотки морской свинки (комплемент), разведенной SGVB в соотношении 1 : 100 и по 1 мл 0,5% взвеси трехкратно отмытых человеческих (0, Rh+) эритроцитов. После этого пробирки инкубировали при 37°C в течение 1,5 часов и учитывали результаты. Для удаления случайно прилипших к клеткам культуры эритроцитов перед учетом реакции жидкость из пробирок сливали, клетки несколько раз тщательно промывали забуференным физиологическим раствором (PBS). Наличие налипших на клетках эритроцитов (розеток) определяли под микроскопом. Реакцию считали положительной, если на клетке обнаруживали более 3-х эритроцитов. Силу реакции определяли в зависимости от количества розеток и числа налипших эритроцитов.

В качестве контроля использовали пробирки, которые содержали (при сохранении общего объема): 1) клетки+эритроциты без сыворотки и комплемента; 2) клетки+эритроциты+сыворотка без комплемента; 3) клетки+эритроциты+комплемент без сыворотки.

* Sucrose-Gelatin-Veronal Buffer-Saline.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общие результаты исследований представлены в таблице 1. Как показали эксперименты, из 187 обследованных сывороток раковых больных 131 (70%) дала четко выраженную положительную реакцию с

Т а б л и ц а 1

Число проб сывороток с положительной, сомнительной или отрицательной реакцией к опухолевым клеткам линий HeLa, KB, HEP-2 и Detroit

Сыворотки больных	Реакции на штаммы									
	HeLa			KB			HEP2		Detroit	
	поло- жит.	сомн.	отр.	поло- жит.	сомн.	отр.	поло- жит.	отр.	поло- жит.	отр.
Раком желудка	22	7	5	1	1	11	0	33	0	32
ректума и сигмы	25	5	4	0	0	6	0	32	0	32
легких	8	0	0	0	0	2	0	14	0	14
шейки матки	20	3	4	0	0	13	0	14	0	14
тела матки	2	2	3	0	0	4	0	24	0	24
молочной железы	19	5	6	0	0	13	0	7	0	7
яичника	13	1	1	0	0	7	0	0	0	0
другой локализации	11	1	3	0	0	9	0	0	0	0
Саркома	2	1	4	0	0	3	0	0	0	0
Меланома	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Всего %	131	25	31	1	1	69	0	110	0	110
%	70	13,4	16,6							
Геморрагическая метропатия	0	0	2	0	0	2	0	2	0	2
Миома матки	1	2	4	0	0	7	0	7	0	7
Метроррагия	0	0	2	0	0	2	0	2	0	2
Хронический аднексит	0	0	17	0	0	17	0	17	0	17
Перинеальная гнойная фистула	0	0	2	0	0	2	0	2	0	2
Овариальная киста	0	0	5	0	0	5	0	5	0	5
Опущение влагалища	0	0	3	0	0	3	0	3	0	3
Выпадение матки	0	0	2	0	0	2	0	2	0	2
Параметрит	0	0	2	0	0	2	0	2	0	2
Другие	0	0	8	0	0	8	0	8	0	8
Всего	1	2	47	0	0	50	0	50	0	50
Здоровые лица	1	1	32	0	0	34	0	30	0	30

клетками линии HeLa. Специфичность положительной реакции в отношении клеток HeLa была подтверждена в опытах, где все 50 проб сывороток лиц с нераковыми (гинекологическими) заболеваниями, а также 32 сыворотки из 34 клинически здоровых людей дали отрицательные результаты не только с клетками линии HeLa, но и со всеми другими клеточными штаммами.

Получение отрицательных результатов в 31 (16,6%) и сомнительных в 25 (13,4%) пробах сывороток больных раком в реакции с клетками HeLa можно объяснить снижением титра опухолевых антител до минимума в связи с прогрессивным развитием болезни и общим снижением иммунологической реактивности больного.

Заслуживает внимания также тот факт, что большая часть сывороток (110), положительно реагирующих с клетками HeLa, всегда давала отрицательную реакцию с клетками штаммов KB, HEP-2 и Detroit, которые также имеют раковое происхождение. Исключение составляла одна сыворотка, которая положительно реагировала с клетками KB.

Если предположить, что положительная реакция между сыворотками раковых больных и клетками штамма HeLa является опухолевоспецифической, то трудно объяснить, почему эти сыворотки не реагируют с клетками других раковых штаммов (KB, HEP-2 и Detroit).

Может быть, это связано с локализацией опухолевоспецифических антигенов не на поверхности, а внутри клетки, что не позволяет выявить их с помощью метода иммуноприлипания. Это подтверждается, в частности, данными других опытов (21), в которых обнаружены перекрестные иммунные реакции сывороток с антигенами, содержащимися в флюорокарбонных экстрактах клеток HEP-2 и антигенами злокачественных новообразований яичников у женщин. Нельзя также исключить и возможности отсутствия антигенного сходства между поверхностными антигенами изученных линий опухолевых клеток.

Интересно было изучить также, отражается ли удаление опухоли на активности сывороток раковых больных в реакции с клетками линии HeLa. С этой целью были исследованы сыворотки 75 больных, взятые через 15—20 дней после оперативного удаления опухоли. Результаты опытов даны в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Число исследованных после удаления опухолей сывороток с положительной, сомнительной или отрицательной реакцией на клетки HeLa

Сыворотки больных	Полож.	Сомн.	Отриц.
Раком			
желудка	7	0	3
кишок	15	3	1
молочной железы	9	1	5
щитовидной железы	5	0	1
околоушной железы	2	0	0
легкого	1	0	0
шейки матки	10	2	0
тела матки	1	1	0
яичника	6	1	0
Саркомой	1	0	0
Всего	57	8	10

Из таблицы видно, что из 75 сывороток, взятых после удаления опухоли, 57 (76%) дают положительную реакцию с клетками HeLa, 8 — сомнительную и 10 — отрицательную реакцию.

По сравнению с результатами, полученными при анализе сывороток раковых больных до операции (таблица 1), обнаружено незначительное (на 6%) увеличение относительного числа сывороток, положительно реагирующих с клетками HeLa.

Это увеличение было связано с появлением антител в сыворотках ряда больных после удаления опухолей, по сравнению с отрицательной реакцией этих же сывороток до операции (таблица 3).

Т а б л и ц а 3

Число сывороток после изменения силы иммунной реакции после удаления опухоли

Сыворотки больных	После удаления опухоли			Позитивированные сыворотки	
	усиление	без изменения	ослабление	до операции	после операции
Раком					
желудка	4	4	2		
кишок	12	3	4	—	+
молочной железы	8	5	2	±	++ + —
щитовидной железы	1	2	3	±	++
околоушной железы	2	0	0	—	+
легкого	0	1	0	±	++
шейки матки	8	3	1	—	+
тела матки	1	1	0	±	+
яичника	5	1	1		
Саркомой	1	0	0	—	+ ±
Всего	42	20	13		

Из таблицы видно, что из 75 двукратно обследованных больных в сыворотках 41 при повторном исследовании (после операции) обнаружено усиление серологической активности, у 20 больных — титры сывороток оставались без изменения и у 13 — оказались ниже. При этом в группе сывороток, где отмечено повышение титра антител у 12 больных, сыворотки которых давали отрицательную или сомнительную реакцию до операции, выявлено наличие антител при повторном обследовании.

Таким образом, не всегда изменения частоты и силы иммунной реакции после удаления опухоли являются однозначными, что, очевидно, обусловлено индивидуальными особенностями больных (иммунологическая реактивность, стадия развития заболевания и др.). Однако,

на основании полученных результатов можно сказать, что удаление опухоли сопровождается тенденцией к повышению иммунной реакции организма.

Изменения частоты и силы положительной реакции у раковых больных после удаления опухоли можно объяснить тем, что развитие опухоли не только снижает иммунологическую реактивность организма (1), но что и сама опухоль может адсорбировать гуморальные антитела. Не исключено, что удаление опухоли в какой-то мере снимает это ингибирующее действие и антитела начинают появляться в сыворотке раковых больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ботев Б., И. Н. Майский, Л. Мархолов, Г. П. Айрапетьян, Т. А. Покровская. В. кн.: Проблемы современной иммунологии, АМН СССР, М., Медицина, 1972, 158.
2. Abelev G. I. — *Cancer Res.*, 1968, 28, 1334.
3. Angeletti P., V. Sultzoff and B. Moore. — *Cancer Res.*, 1960, 20, 1229.
4. Angeletti P., B. Moore, S. Solaric and V. Sultzoff. — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1960, 103, 329.
5. Björklund B., G. Graham and R. Graham. — *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1957, 10, 56.
6. Björklund B., G. Lundblad, and V. Björklund. — *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1958, 12, 241.
7. Blakemore W., McKenna. — *J. Surgery*, 1962, 52, N° 1, 213.
8. Blakemore W., McKenna. — *J. Surgery*, 1964, 56, N° 4, 628.
9. Bowen G., J. Angermann, C. McBride, M. Miller, E. Hersh, D. Dmochovski. In: *Proc. Amer. Assoc. for Cancer Res.*, 1971, Abstr. N° 385, 85, Illinois.
10. Davis J. and H. Bush. — *Cancer Res.*, 1960, 20, 1208.
11. Doré J. F., R. Motta, L. Marholev, I. Hrsak — Collas de la Noue, G. Seman Fode Vassal and G. Mathé. — *Lancet*, 1967, 30, 1396.
12. Doré J. F., L. Marholev, E. Ajouria, M. Doré, M. Paintgrand, G. de Thé and G. Mathé. В сб.: *I Нац. Конгрес по Онкология*, 1969, № 315, 183.
13. Elber F., D. Morton. — *Nature*, 1970, 225, 1137.
14. Fulton F. — *Nature*, 1965, 207, 1214.
15. Goldsten G. and Q. Myrvik. — *J. Immunology*, 1958, 80, 100.
16. Goldstein G. and R. Hiromoto. — *J. Natl. Cancer Inst.*, 1961, 27, 487.
17. Klein G., Clifford P., E. Klein, J. Sternswärd. — *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 1966, 55, 1628.
18. Kossiakov P., B. Koresteljova, — *Acta Un. Int. Cancr.*, 1963, 19, 108.
19. Makari G. — *J. Amer. Geriatr. Soc.*, 1960, 8, 4.
20. Priori E., G. Seman, L. Dmochovski, H. Galliger and D. Anderson — In: *Proc. Amer. Soc. for Cancer Res.*, 1971, N° 378, 95.
21. Taylor A., A. Gilden and F. Brandon. — *Virology*, 1959, 7, 348.
22. Yoshida T., K. Imai. — *Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.*, 1970, XV, N° 1, 61.

ON THE PRESENCE OF ANTI-HeLa ANTIBODIES IN THE SERUM OF CANCER PATIENTS

T. A. Pokrovskaya, L. Markholev, B. Botev, S. Zhiokov, Z. Doudounkov, H. Shivachev, V. Vassilev, I. Roumenov

Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR and Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria

SUMMARY

The sera of 187 cancer patients have been tested before the operation, by the immune-adherence technique. Anti-HeLa antibodies have been detected in the sera of 131 patients (70%). In 110 of the same sera, taken at random no antibodies against KB, HEP 2 and Detroit tumour cell were detected.

The same tests were repeated with the sera of 75 cancer patients 15—20 days after removal of the tumour. Anti-HeLa antibodies were detected in 57 patients (76%). An increase in the incidence and in the intensity of the positive immune reaction was obvious.

Sera of healthy persons as well as of patients with nonmalignant gynecologic diseases were tested as controls. Only 2 out of 74 sera showed the presence of antibodies against the four tumour cell lines used in the experiment.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГУМОРАЛЬНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ В ТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ИММУНИТЕТЕ МЕТОДОМ ДИФФУЗИОННЫХ КАМЕР IN VIVO

И. ГЕОРГИЕВ, Н. Н. ДАХИНА, М. М. КАПИЧНИКОВ

Кафедра гистологии Высшего медицинского института, Пловдив, Болгария
и НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В настоящее время не вызывает сомнения ведущая роль клеточных факторов иммунитета в процессе отторжения гомотрансплантатов. Значение антител все еще остается невыясненным, а данные литературы противоречивы (3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Кроме того, неясен сам механизм действия иммунокомпетентных клеток на трансплантат (7, 9, 11). Для решения указанных вопросов рядом исследователей использовался метод диффузионных камер (1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15). Однако авторы изучали роль гуморальных факторов и иммунокомпетентных клеток без иммунологического анализа на наличие у реципиента антител.

В связи с этим в настоящей работе поставлена задача провести сравнительное изучение роли антител и иммунокомпетентных клеток в деструкции гомотрансплантатов методом диффузионных камер, предложенным Йордановым И. и Георгиевым И. (8).

Опыты проведены на 11 кроликах (8, 9 дне) после первичной и на 30 реципиентах (4, 6, 7 дне) после повторной пересадки кожи. 25 опытным и 8 контрольным (B_1-) крысам породы Вистар камеры вводили внутрибрюшинно на 4, 7, 10, 11 дне после повторной пересадки кожи от (B_1+) крыс. У кроликов и крыс исследовали сыворотку и внутрибрюшинную жидкость на наличие гемагглютининов и лимфоцитотоксинов. Влияние антител и иммунокомпетентных лимфоидных клеток изучали на имплантатах наиболее чувствительных тканей лимфатического узла и почки доноров. Каждому подопытному и контрольному животному помещали 4 варианта камер. Первая содержала кусочек лимфатического узла донора. Во вторую помещали имплантат почки донора. В третью камеру к кусочку почки донора добавляли имплантат контрольного лимфатического узла от несенсибилизированных животных. В четвертую — к имплантату почки добавляли иммунокомпетентные клетки из лимфатического узла реципиента.

Описанная схема опытов давала возможность изучить раздельное и совместное влияние антител и сенсibilизированных лимфоидных клеток на ткани доноров.

Для оценки действия гуморальных и клеточных факторов реципиента на ткани доноров проводили сравнительное исследование мор-



Рис. 1. Имплантат лимфатического узла донора
а) мембраны, б) фрагмент узла, в) реактивная ткань. Увел. 20×10х (1-ая камера).

фологической структуры имплантатов донорских тканей после 5—7-дневного пребывания их в диффузионных камерах у подопытных (реципиентов) и контрольных животных.

Лимфатический узел доноров после пребывания в камерах сохранял присущие ему структуры. Отмечался рост фибробластов, были сохранены лимфоциты. Наблюдались митозы в ретикулярных клетках. Такая картина была и в имплантатах, помещенных реципиентам, у которых выявлялись антитела в сыворотке и во внутрибрюшной жидкости (рис. 1).

В имплантатах почки, помещенных в организм подопытных животных, после повторной пересадки кожи при наличии антител наблюдался лучший рост и приживание имплантата, чем у реципиентов без антител, с низким титром их, или в камерах у контрольных животных (рис. 2). Отмечалось более интенсивное разрастание эпителиальных клеток в канальцах и начало эпителизации кусочка почки. Это различие дало основание говорить о некотором стимулирующем влиянии гуморальных антител на имплантаты донорских тканей.

В опытах на крысах, различающихся по В фактору, после повторной гомотрансплантации кожи почти у всех реципиентов выявлялись гемагглютинины в титрах от 1 : 16 до 1 : 256. У крыс наблюдался более интенсивный рост в имплантатах почки доноров, чем у кроликов. Отмечалось сохранение клеток канальцев по поверхности кусочка, разрастание новых эпителиальных тяжей из канальцев, которые располагались по внутренним поверхностям мембран, образуя «ложные»

эпителиальные кисты. Сохранились эндотелиальные клетки клубочков, гладкомышечные клетки артериол. В фибробластах и эпителиальных клетках были видны митозы.

В третьем варианте камер, при добавлении клеток из узла несенсибилизированных контрольных животных, наблюдалось сохранение



Рис. 2. Имплантат почки донора

а) мембраны, б) фрагмент почки, в) реактивная ткань. Увел. $20 \times 10 \times$ (2-ая камера).

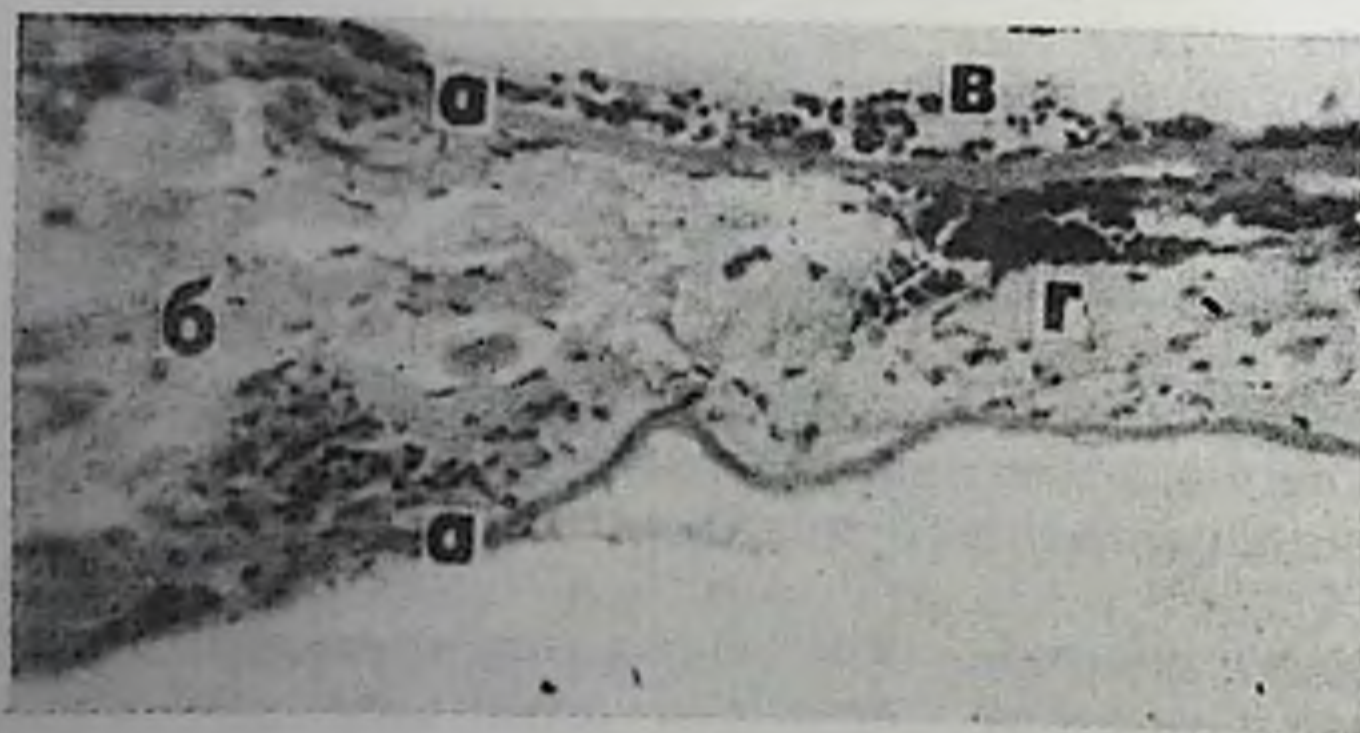


Рис. 3. Имплантат почки с добавленным узлом реципиента

а) мембраны, б) фрагмент почки, в) реактивная ткань, г) часть узла. Увел. $20 \times 10 \times$ (4-ая камера).

эндотелиальных клеток клубочков и канальцев, но без сильного разрастания по поверхности мембран и кусочка. Рост был менее выражен, чем во второй камере.

В четвертой камере, содержащей имплантат почки донора и иммунокомпетентные клетки регионарного лимфатического узла реципиента, во всех сериях опытов наблюдали полную деструкцию всех тканевых элементов почки донора и добавленного лимфоузла в организме реципиента и у контрольных животных (рис. 3).

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Гуморальные факторы реципиента не оказывают цитотоксического действия на имплантаты тканей почки и лимфатического узла донора, даже при выявлении у реципиента цитотоксических антител в титре 1 : 10, 1 : 40. Напротив, в ряде случаев у кроликов и крыс при выявлении гемагглютининов и цитотоксинов в более высоких титрах наблюдалась стимуляция роста имплантатов почечной ткани доноров.

2. Иммунокомпетентные клетки, выделенные из регионарных лимфатических узлов реципиентов после гомотрансплантации кожи, вызывали полную деструкцию имплантата почки доноров в организме подопытных и контрольных животных. Их активность проявлялась при непосредственном контакте с тканями донора.

3. Несенсибилизированные лимфоидные клетки из узлов доноров и контрольных животных не вызывали гибели имплантатов почки доноров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Algire G. H., F. I. Legallais. — *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1949, 10, 225.
2. Algire G. H., M. L. Borders. — *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1958, 20, 6, 1187.
3. Amos D. B., J. D. Wakefield. — *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1958, 21, 4, 657.
4. Billingham R. E., W. K. Silver a. al. — *Lancet*, 1962, 1, 5120.
5. Capalbo E. E., F. Celada, T. Makinodan. — *Fed. Proc.* 1962, 21, 241.
6. Daruy I. M., D. J. Percy, R. A. Good. — *J. Immunol.*, 1970, 104, 6, 1523.
7. Granger G. A., S. L. Shacks, F. W. Williams, W. P. Kolb — *Nature*, 1969, 221, 5186, 1155.
8. Jordanov J., J. Georgiev — *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 1955, 8, 441.
9. Klein W. J. — *J. Exp. Med.*, 1971, 134, 5, 1238.
10. Kretschmer R. R., R. Perez-Tamayo. — *J. Exp. Med.*, 1962, 116, 1879.
11. Lubaroff D. M., W. R. Silvers. — *J. Immunol.*, 1971, 106, 4, 1122.
12. Najarian I. S., I. D. Feldman. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 99, 3, 470.
13. Najarian I. S., I. D. Feldman. — *J. Exp. Med.*, 1962, 115, 1083.
14. Najarian I. S., R. L. Piper. — *Surgery*, 1967, 62, 1, 213.
15. Woodruff M. F. A. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, 64, 5, 1014.

COMPARATIVE STUDIES ON THE ROLE OF HUMORAL AND CELLULAR FACTORS IN TRANSPLANTATION IMMUNITY USING THE DIFFUSION CHAMBER METHOD

I. Georgyev, N. N. Dakhina, M. M. Kapitchnikov

Department of Histology, Faculty of Medicine, Plovdiv, Bulgaria and
Research Laboratory, of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow, USSR

S U M M A R Y

The role of humoral and cellular factors of the recipient in destruction of donor tissue has been studied *in vivo* in rabbits and rats by the diffusion chamber method. It has been established that some of the humoral antibodies (hemagglutinins and lymphocytotoxins) do not induce injuries of the donor tissues in the chamber; on the contrary, in many instances — at higher titers — they exercise rather a stimulating effect. The immunocompetent lymphoid cells, originating from the regional lymph nodes of the recipient, however, destroy the renal tissue of the donor by direct contact.

ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОБЛУЧЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ИММУНОЛОГИЧЕСКУЮ РЕАКТИВНОСТЬ ОРГАНИЗМА

И. Н. МАЙСКИЙ, Г. В. СУВОРОВА, Л. Г. АНДРЕЕВА, С. С. ФЕЙГЕЛЬМАН

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Известно, что слабая реакция иммунологической системы организма по отношению, например, к злокачественным клеткам связана с недостаточной иммуногенностью специфического компонента раковой клетки, а возможно, и с незначительным его содержанием, антигенным сходством с нормальными тканями и подавлением общей иммунологической реактивности организма в процессе развития новообразований (2, 3, 4, 5, 19, 26).

Борьба с опухолевыми заболеваниями, если подходить к этой проблеме с позиций иммунологии, связана с усилением защитных реакций организма. Последнее может быть осуществлено при условии сообщения большей иммуногенности опухолевым клеткам за счет изменения их антигенных свойств и придания большей чужеродности (1, 5).

Получение выраженных изменений в антигенной структуре тканей возможно, видимо, при воздействии, способном оказать активное влияние как на биосинтетические процессы клетки, так и на уникальные клеточные структуры.

К таким воздействиям, по всей видимости, можно отнести ионизирующую радиацию (12, 15, 16).

Хотя в настоящее время нельзя еще однозначно ответить на вопрос о специфических антигенных детерминантах раковой клетки, об их химической природе, но совершенно очевидно, что они связаны с основными полимерными структурами ядра или цитоплазмы, т. е. со структурами, лабильными к радиационному воздействию.

Имеется ряд работ, свидетельствующих о том, что под влиянием различных воздействий (16, 21, 25), а особенно проникающего излучения (6, 7, 12) происходит изменение антигенной структуры опухолевой клетки, ее гетерогенизация (11, 13).

Учитывая актуальность проблемы борьбы со злокачественным ростом и широкое применение радиационного воздействия в онкологии, ка-

залось интересным выяснить нельзя ли эти изменения, возникающие в антигенной структуре раковой клетки, использовать для усиления противоопухолевой резистентности организма-опухоленосителя. В ранее поставленных нами экспериментах (7, 8, 11) было установлено, что проникающее излучение, как электромагнитное (лучи Рентгена), так и корпускулярное (протоны с энергией 640 Мэв), вызывают изменение антигенных свойств злокачественных опухолей, имеющих эпителиальное происхождение (опухоль Эрлиха, опухоль Броуна-Пирс, карцинома Герена, рак желудка человека), но оказываются мало эффективными по отношению к новообразованиям соединительно-тканного гистогенеза (саркома Крокера, саркома М-1) (8). Изменения, возникающие под влиянием радиации, затрагивают как специфические, так и неспецифические антигенные детерминанты раковой клетки, причем разные дозы, также как и различные виды лучевого воздействия, обуславливают неадекватное проявление гетерогенизации.

Установленная возможность изменения антигенных свойств злокачественных клеток под влиянием облучения их *in vitro* лучами Рентгена или протонами с энергией 640 Мэв послужила основанием для проведения ряда исследований, связанных с попытками получения превентивного — вакцинирующего и терапевтического эффекта.

Вакцинирующее влияние по отношению к опухоли Эрлиха было отмечено нами у 50—80% животных, особенно при воздействии на клетки электромагнитным излучением (10).

В целях выявления терапевтического эффекта нами было проведено три серии опытов на мышах линии А, самцах, весом 18—20 г. Пятидесяти мышам было введено внутривенно, девятисто восьми — подкожно по 0,2 мл физиологического раствора, сордержащего 300 000 клеток асцитного штамма опухоли Эрлиха. Все животные каждой серии экспериментов были подразделены на группы. Мышам опытных групп вводили недезинтегрированные облученные опухолевые клетки и их экстракты. Мыши 3 контрольных групп или не подвергались никаким воздействиям или получали экстракты на необлученных опухолевых клеток и инъекции физиологического раствора. Введение проводили через день: при асцитной форме — трехкратно, начиная через сутки после инокуляции клеток опухоли; при подкожной форме — десятикратно в случае начала инъекций на 2 сутки, и шестикратно при начале введения на 7 сутки после прививки опухоли.

Все экспериментальные данные были подвергнуты статистическому анализу по методу Фишер-Стьюдента, методу χ^2 и методу точного критерия Фишера.

Получить росттормозящий эффект по отношению к быстрорастущей асцитной опухоли Эрлиха нам не удалось ($P=0,381$). Видимо, быстротекущий опухолевый процесс способствует «прорыву» недостаточно сформированного иммунитета.

Введение облученных клеток в поздние сроки (7 сутки) после прививки подкожной формы опухоли Эрлиха не только не тормозило развитие опухолевого процесса, но даже несколько отягощало его течение ($P=0,19$).

Наблюдаемое явление в данном случае не связано, по-видимому, с enhancing-эффектом (9) и может быть объяснено снижением защитных сил организма в связи с ростом первично привитой опухоли.

Терапевтическое воздействие облученных опухолевых клеток и их экстрактов было довольно четко отмечено только в серии опытов с подкожной формой опухоли Эрлиха при условии начала упомянутых введений на 2 сутки после инокуляции опухоли.

Т а б л и ц а 1

Влияние облученных опухолевых клеток и их экстрактов на интенсивность роста подкожной формы опухоли Эрлиха

№ группы	Количество мышей в группе	Воздействие	Введение				Средний латентный период (в днях)	Средний размер опухоли (см)			Средняя продолжительность жизни (в днях)
			срок начала инъекций (дни после прививки)	объем (мл)	кратность	интервал в днях		Время после прививки (в днях)			
								20	40	60	
1	10	Опух. клетки обл. 60000 р	2	0,2	10	1	9,2	1,00	1,61	2,5	79
2	10	Экстракт из облученных клеток	2	0,2	10	1	8,7	1,03	1,78	2,7	71
3	10	Экстракт нативных опухолевых клеток	2	0,2	10	1	5,4	1,21	2,41	3,2	62
4	10	Физиологический раствор	2	—	10	1	4,2	1,57	3,33	—	42
5	10	Контроль	—	—	—	—	4,4	1,53	3,62	—	43

Статистический анализ показал, что различие между 1—2 и 4—5 группами вполне достоверно ($P < 0,01$), между 1—2 и 3 группами, также как и между 3 и 4—5 группами — недостоверно ($P > 0,01$). Следует подчеркнуть, что наиболее выраженный ингибирующий эффект был выявлен при многократном введении недезинтегрированных облученных асцитных клеток ($P < 0,01$). Последнее, по-видимому, связано с сохранением в данном случае более полного антигенного комплекса, а также его депонированием. О возможности получения частичного росттормозящего влияния на развитие опухоли при введении облученных опухолевых клеток свидетельствуют также работы Д. Дональзон и Дж. Митчел (20) и др.

В связи с полученными результатами, а также с тем, что имеются сообщения о применении облученных тканей для терапии злокачественных новообразований человека (17), нам казалось важным выявить механизмы, обуславливающие отмеченное изменение иммунологической реактивности у животных, поскольку выяснение этого вопроса может способствовать нахождению новых подходов при решении проблемы противоопухолевого иммунитета.

В экспериментах, проведенных на 380 мышах линии А и ВаLB, было установлено, что механизм этой резистентности связан с накоп-

лением в сыворотке крови антител. Последние были выявлены реакцией связывания комплемента (1 : 80—1 : 160), реакцией преципитации на Оухтерлони и методом микропреципитации Файнберга (22), реакцией пассивной кожной анафилаксии Овагу (интенсивность реакции 4+) и методом нефелометрии Уанье при разведении сывороток 1 : 4 и антигенов 1 : 5000. Об изменении иммунологического статуса у вакцинированных животных свидетельствовало также обнаруженное при помощи электрофореза увеличение γ -фракции (12,0—13,81 в опыте и 9,82—10,88 в контроле). ($P > 0,01$) (14).

Увеличение количества пиронинофильных клеток в отпечатках лимфатических узлов у подопытных животных было стабильным ($P < 0,01$) при 5—7-кратной их вакцинации, и не колебалось в тех случаях, когда иммунизирующее начало вводили десятикратно с интервалами в 24 ч. По-видимому, в этом случае, как и в исследованиях Асконоса (18) и Харриса (24), введение больших доз антигена снижало выявляемое антителообразование в лимфатических узлах (14).

Резюмируя приведенные выше данные, можно прийти к заключению, что инокуляция животным гетерогенизированных радиационным воздействием опухолевых клеток с измененными антигенными свойствами оказывает влияние на иммунологическую реактивность организма, обуславливая возможность получения положительного превентивного (вакцинирующего) и терапевтического (росттормозящего) эффекта в эксперименте с карциноматозными опухолями животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков-Вережников Н. Н., И. Н. Майский, В. С. Гостев. В кн.: Матер. докл. X сессии АМН СССР, М., 1956, 38.
2. Кавецкий Р. Е. В кн.: Опухоль и организм, Киев, 1962, 135.
3. Косяков П. Н. В кн.: Антигенные вещества организма и их значение в биологии и медицине. М., 1954, 267.
4. Косяков П. Н., В. С. Коростелева. В кн.: Тр. VIII Международного противоракового конгресса. М., 1963, 287.
5. Майский И. Н. О биологических основах противоракового иммунитета. М., 1955, 59.
6. И. Н. Майский, Г. В. Суворова. — *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 1957, № 9, 941.
7. Майский И. Н., Г. В. Суворова. В сб.: Проблемы пересадки и консервирования органов и тканей. М., 1959, 98.
8. Майский И. Н., Г. В. Суворова, П. П. Филатов. — *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 1961, № 4, 92.
9. Радзиховская Р. М. В кн.: Трансплантационный и специфич. противоопухолев. иммунитет. М., 1965, 192.
10. Суворова Г. В. В кн.: Тез. докл. Конф. по иммунологии рака. Л., 1961, 26.
11. Суворова Г. В. В кн.: Мат. докл. Конф. по иммунобиолог. злокач. новообразований. М., 1965, 40.
12. Суворова Г. В. В кн.: Изменение антигенных свойств злокачественных клеток под влиянием ионизирован. радиации. Докт. дисс. М., 1968.
13. Суворова Г. В., И. Н. Майский. В кн.: Радиобиология (информ. бюллетень) 1965, № 8, 47.
14. Суворова Г. В., И. Н. Майский, Л. Г. Андреева. В кн.: Проблемы соврем. иммунологии. М., 1972, 178.

15. Филатов П. П. В кн.: Иммунологические и морфологические изменения при длительном воздействии малых доз ионизирующей радиации на организм. Автореф. докт. дисс. М., 1967.
16. Alexander P. — *Brit. Med. J.*, 1970, No. 5733, 484.
17. Anderson J., M. A. De Sousa, K. E. Halnan, F. H. Kelly, G. Hannah. — *Brit. J. Surg.*, 1970, 57, No. 8, 557.
18. Askonas J., J. H. Hamprey. — *Biochem. J.*, 1958, 68, 2, 252.
19. Björklund B., V. Björklund, I. Hedfö. — *J. Nat. Canc. Inst.*, 1961, 26, No. 3, 345.
20. Donaldson D. M., J. R. Mitchell — *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1959, 101, No. 2, 204.
21. Duplap C. L., H. B. G. Robinson. — *J. Amer. Assoc.*, 1971, 215, No. 3, 457.
22. Fainberg J. G. — *Nature (Lond.)*, 1961, 192, No. 4806, 985.
23. Ghilezan N. — *Oncol. si Radiol.*, 1970, 9, No. 3, 211.
24. Harris T. N., S. Harris. — *J. Immunol.*, 1950, 64, No. 2, 45.
25. Heyden S. — *Universitas*, 1971, 26, No. 4, 363.
26. Soutchem C. M. В кн.: Тр. VIII Междунар. противоракового конгресса, М., 1963, 3, 219.

INFLUENCE OF THE INOCULATION OF IRRADIATED TUMOUR CELLS ON THE IMMUNOLOGIC REACTIVITY OF THE ORGANISM

I. N. Maisky, G. V. Souvorova, L. G. Andreyeva, S. S. Feigelman

Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow, USSR

SUMMARY

The inoculation of animals with tumour cells (or extracts from them) which have been changed antigenically by an *in vitro* irradiation leads to changes in the immunoreactivity of the recipient — in particular the appearance of antitumour resistance and possibilities for obtaining of a growth-inhibitors' therapeutic effect.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОЖИ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РЕАКЦИЙ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ИММУНИТЕТА

С. С. ФЕЙГЕЛЬМАН, И. Н. МАЙСКИЙ, И. М. ГОНЧАРЕНКО, Г. В. СУВОРОВА

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Установлено, что отторжение аллогенных трансплантатов (гомотрансплантатов) происходит в результате иммунологических реакций, возникающих в ответ на иммунизацию реципиента антигенами, поступающими из трансплантата. Исследования (10) показали, что реакция антиген — антитело сопровождается повышением уровня протеаз сыворотки крови. В свою очередь, протеолитические ферменты способствуют повышению сенсibilизации организма.

Поскольку при всякой пересадке часть клеток трансплантата погибает вследствие ишемии, протеолитические ферменты, поступающие из них, активизируют реакцию отторжения. Это положение, развиваемое Hargis C. A. et al. (1957), подтверждено названными авторами экспериментально. Они обнаружили, что отторжение гомотрансплантата происходит параллельно с нарастанием уровня протеаз сыворотки крови реципиента. Введение ингибиторов протеолитических ферментов увеличивало сроки приживления кожных гомотрансплантатов (6, 9, 1).

Более позднее отторжение у собак кожных гомотрансплантатов, предварительно обработанных 0,5% раствором формалина (4), мы объяснили способностью формальдегида образовывать с белками водонерастворимые комплексы (3), благодаря чему затрудняется поступление из трансплантатов трансплантационных антигенов. Принимая во внимание участие протеолитических ферментов в освобождении трансплантационных антигенов из клеток пересаженной ткани (5, 8), нам казалось интересным выяснить, как изменяется протеолитическая активность кожи после обработки ее формалином, а также изучить активность реакций трансплантационного иммунитета при пересадке обработанной таким методом кожи.

Протеолитическая активность исследована в коже собак после хранения ее в течение 6, 10 и 15 суток в 0,5% растворе нейтрального формалина при +4° С. Раствор формалина готовили из 37% раствора

формальдегида, концентрацию которого принимали за 100%. О протеолитической активности судили по приросту остаточного азота в экстракте гомогената кожи после инкубации его при 37° С в течение 24 часов.

Навеску кожи измельчали ножницами и растирали с двухкратным по весу количеством фосфатного буфера (рН 4,9). Для инактивации ингибиторов протеаз добавляли по 3—5 капель хлороформа (2). Затем гомогенат делили на две части. Одну из них центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 минут и в надосадочной жидкости определяли остаточный азот по Асселю. Вторую часть гомогената помещали в термостат при 37° С. Через 24 часа его также центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли остаточный азот.

Т а б л и ц а 1

Протеолитическая активность кожи после хранения в формалине

№ образца	Остаточный азот в гомогенате свежей кожи (в мг%)			Остаточный азот в коже, хранившейся в 0,5% растворе формалина в течение:								
	до инкубации	после инкубации	прирост остаточного азота	6 суток			10 суток			15 суток		
				до инкубации	после инкубации	прирост остаточного азота	до инкубации	после инкубации	прирост остаточного азота	до инкубации	после инкубации	прирост остаточного азота
1	42	70	28	14	25	11	13	18	5	10	10	0
2	48	78	30	18	29	11	13	20	7	10	13	3
3	48	96	48	12	21	9	10	18	8	0	0	0
4	54	86	32	13	24	11	10	21	11	0	0	0
5	31	92	61	10	18	8	10	18	8	0	0	0
6	36	66	30	13	21	8	10	18	8	6	8	2
7	40	78	38	10	18	8	6	13	7	0	0	0
8	51	80	29	13	25	12	10	21	11	6	6	0
9	33	92	59	10	21	11	10	13	1	0	0	0
10	36	82	46	13	18	5	6	13	7	0	0	0
M	41,9	82,0	40,1	12,6	22,0	9,4	9,8	17,3	7,5			
$\delta \pm$	7,2	9,1	11,4	2,4	3,6	2,2	2,0	4,4	2,8			

Обозначение: М — среднее арифметическое
 δ — квадратичная ошибка

В табл. 1 приведены результаты 10 исследований протеолитической активности кожи после хранения ее в 0,5% растворе формалина. Как можно видеть, протеолитическая активность кожи при этом быстро снижается, составляя через 6 суток 22,5% от первоначальной (соответственно $40,1 \pm 11,4$ мг% и $9,4 \pm 2,2$ мг%), после 10 суток — 18,7%. Хранение кожи в формалине в течение 15-ти суток практически полностью инактивирует в ней протеолитические ферменты.

Активность реакций трансплантационного иммунитета на обработанный формалином гомотрансплантат определяли по скорости оттор-

жения вторичных кожных гомотрансплантатов (реакции «second set»), а также по изменениям, которые наступили в регионарных лимфатических узлах. Реакция second set исследована на 39 морских свинок и 18 кроликах. У морских свинок со спины иссекали полнослойный кожный лоскут $2,5 \times 2,5$ см; у кроликов — $3,0 \times 5,0$ см. Дефект закрывали полнослойным свежим или консервированным в 0,5% растворе формалина кожным гомотрансплантатом. Пересаженный кожный гомотрансплантат хранился в 0,5% растворе формалина от 1 до 4 месяцев. Перед пересадкой кожу трехкратно отмывали от формалина физиологическим раствором в течение 2 часов. Повторную пересадку кожи производили от тех же доноров через 20—25 дней после первичной пересадки.

Реакция лимфатических узлов на пересадку свежего и обработанного формалином кожного гомотрансплантата исследована у 34 кроликов. С этой целью животным на левое ухо пересаживали нативный гомотрансплантат, на правое — кожу, консервированную в формалине. Для контроля 8 кроликам произведена аутоотрансплантация кожи. На 7—8-й день у 14 кроликов и на 15-й день у 12 животных удаляли верхние позадушные лимфатические узлы. При аутоотрансплантации лимфатические узлы исследованы через 15 дней после пересадки. Удаленные лимфатические узлы взвешивали и изготовляли мазки — отпечатки, которые окрашивали по Паппенгейму. Производили подсчет «больших» и «средних» лимфоцитов, лимфобластов и иммунобластов («бласты»), а также юных и зрелых плазматических клеток на 1000 зрелых лимфоцитов. Полученные результаты подвергнуты статистической обработке по методу Стьюдента.

Гибель свежих кожных гомотрансплантатов наступила у морских свинок через $7,1 \pm 1,2$ дней, при повторной пересадке через $4,6 \pm 0,8$ дней; у кроликов, соответственно, через $7,8 \pm 1,8$ дней и через $4,9 \pm 1,3$ дней. Отторжение формализированных гомотрансплантатов наступало у морских свинок через $7,8 \pm 1,4$ дней при первичной пересадке и через 7,3 дней после повторной, а у кроликов, соответственно, через $8,7 \pm 1,4$ дней и через $8,5 \pm 1,0$ дней.

Следовательно, отторжение повторно пересаженных нативных кожных гомотрансплантатов происходит по ускоренному типу, в то время как после пересадки кожи, консервированной в формалине, реакция second set не выявляется.

Средний вес регионарных лимфатических узлов через 15 дней после гомотрансплантации нативной кожи (табл. 2) более чем вдвое превышает вес лимфатических узлов на стороне с пересаженным формализированным гомотрансплантатом ($P=0,01$). (Ввиду большого разброса веса лимфатических узлов в каждой группе кроликов, достоверность различия определяли методом критерия знаков). Разница в весе регионарных лимфатических узлов после аутоотрансплантации кожи и после пересадки кожи, обработанной формалином, оказалась статистически недостоверной ($P=0,2$).

Исследование цитологического состава отпечатков регионарных лимфатических узлов после гомотрансплантации нативной и формализи-

Т а б л и ц а 2

Вес регионарных лимфатических узлов кроликов после гомотрансплантации нативной и формализированной кожи

	Гомотрансплантат				Аутологичный трансплантат
	нативный		формализированный		
	дни после пересадки				
	7—8	15	7—8	15	
М	214,0	233,5	161,3	99,2	77,0
m	124,1	132,2	36,3	47,0	23,2
n	14	12	14	12	8

Обозначения: М — среднее арифметическое веса лимфатических узлов в мг; m — средняя арифметическая ошибка; n — число исследованных лимфатических узлов.

Т а б л и ц а 3

Количество иммунокомпетентных клеток в отпечатках регионарных лимфатических узлов при пересадке нативной и формализированной кожи

Подсчет на 1000 малых лимфоцитов	Гомотрансплантат				Аутологичный трансплантат	
	нативный		формализированный			
	дни после пересадки					
	7—8	15	7—8	15		
«Бласты»	$19,4 \pm 4,7$	$29,6 \pm 3,0$	$9,0 \pm 4,2$	$15,1 \pm 6,0$	$12,5 \pm 7,8$	
Плазматич. клетки	$12,5 \pm 3,6$	$13,6 \pm 7,5$	$4,4 \pm 1,7$	$7,7 \pm 3,5$	$6,0 \pm 5,2$	
Лимфоциты	Больш.	$18,2 \pm 6,6$	$36,2 \pm 13,6$	$15,2 \pm 4,6$	$16,3 \pm 9,4$	$19,6 \pm 5,3$
	Среди.	$24,6 \pm 10,0$	$32,0 \pm 13,6$	$17,4 \pm 7,2$	$18,2 \pm 11,0$	$20,0 \pm 11,5$

формализированной кожи (табл. 3) позволило выявить существенную разницу между содержанием в них иммунокомпетентных клеток. Через 7—8 дней после пересадки нативного кожного гомотрансплантата количество «бластов» составляло $19,4 \pm 4,7$, плазматических клеток $12,5 \pm 3,6$. После пересадки кожи, обработанной формалином, — соответственно $9,0 \pm 4,2$ и $4,4 \pm 1,2$. Через 15 дней число «бластов» и плазматических

клеток после пересадки нативной гомологичной кожи составляло соответственно $29,6 \pm 13,0$ и $13,6 \pm 7,5$; после гомотрансплантации кожи, обработанной формалином, — $15,1 \pm 6,0$ и $7,7 \pm 3,5$ ($P < 0,01$).

Клеточная реакция в регионарных лимфатических узлах после пересадки аутологичной кожи и кожного гомотрансплантата, обработанного формалином, были близки между собой, составляя для «бластов» $12,5 \pm 7,3$ и $15,1 \pm 6,0$ и для плазматических клеток $6,0 \pm 5,2$ и $7,7 \pm 3,5$ ($P > 0,2$).

При подсчете больших и средних лимфоцитов отмечено их увеличение на стороне нативного гомотрансплантата по сравнению с формализованным, однако разница эта статистически недостоверна.

Из представленного материала видно, что пересадка гомологичной кожи, предварительно обработанной формалином, вызывает более слабую реакцию трансплантационного иммунитета по сравнению со свежим гомотрансплантатом. Реакция на формализованный кожный гомотрансплантат не намного отличается от реакции на кожный ауто-трансплантат.

Полученные данные могут служить подтверждением тому, что активность реакций трансплантационного иммунитета зависит от количества поступающих из трансплантата водорастворимых трансплантационных антигенов. Снижение протеолитической активности и связывание водорастворимых белков в нерастворимые комплексы являются, по-видимому, причиной того, что активность реакций трансплантационного иммунитета на гомотрансплантацию обработанной формалином кожи значительно менее выражена по сравнению с нативным кожным гомотрансплантатом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гитис Е. А. В кн.: Трансплантация органов и тканей. Горький, 1970, 423.
2. Сориннов А. Н., В. А. Фролов. — *Лабораторное дело*, 1967, 5, 304.
3. Уокер Дж. В кн.: Формальдегид. М., 1957, 7.
4. Фейгельман С. С., В. П. Торбенко. — *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1970, 8, 92.
5. Davies D. A. L., A. J., D. Visa, J. Colombani, J. Danset. — *Presse med.*, 1968, 76, 37, 1753.
6. Gillette R. W., A. Findey, H. Conway. — *Transplantation*, 1963, 1, 116.
7. Hardin C. A., A. A. Werder, A. D. Hooper, M. C. Liggett — *Surgery*, 1957, 4, 752.
8. Kahah B. D. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1968, 61, 897.
9. Kohlen H. E. — *Z. ges. exptl. Med.*, 1967, 143, 3—4, 325.
10. Ungar G. — *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1953, 4, 258.

INFLUENCE OF THE SKIN PROTEOLYTIC ACTIVITY CHANGES
ON THE INTENSITY OF THE TRANSPLANTATION IMMUNITY REACTION

S. S. Feigelman, I. N. Maisky, I. M. Goncharenko, G. V. Souvorova

Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow, USSR

S U M M A R Y

The influence of the skin proteolytic activity on the transplantation immunity has been studied in conditions of skin homoplastics. It was shown that treatment with 0,5% formalin solution decreases the proteolytic activity of the skin homotransplant which results in a less expressed transplantation immunity reaction, compared to the reaction, obtained with untreated skin homotransplants.

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ НА ПЕРВИЧНЫЕ ОПУХОЛИ И ИХ МЕТАСТАЗЫ

М. С. ЛОМАКИН, И. Н. МАЙСКИЙ, Е. В. СОКОЛОВА, С. Н. ГУБЕНКО

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Согласно современным представлениям организм, пораженный злокачественным ростом, может отвечать определенной иммунологической реакцией на развивающуюся в нем опухоль. При этом иммунологическую форму защиты подразделяют на несколько видов, главными из которых считают иммунитет к первичной опухоли и иммунитет к ее метастазам (1,4). Это положение находит достаточное подтверждение как в клинике, так и в опытах на экспериментальных животных.

Торможение роста опухоли и ее метастазов в настоящее время связывают главным образом, с клеточными факторами иммунитета.

Одним из доказательств наличия клеточного иммунитета считается развитие мононуклеарной реакции в тканях. При этом рядом авторов отмечается определенная корреляция между длительностью течения злокачественного процесса, его летальным исходом и интенсивностью инфильтрации опухоли макрофагами, лимфоцитами, лейкоцитами, плазматическими клетками и другими мононуклеарами (6—11).

В свете этих данных были изучены клеточные реакции иммунитета как на первичную опухоль, так и на ее метастазы, протекающие в организме спонтанно, в условиях аутотрансплантации и эксплантации опухолей.

В опытах были использованы крысы Вистар обоего пола весом 120—150 г. Для получения индуцированных опухолей крысам вводили в мышцу бедра 9, 10 диметил 1,2-бензантрацен (ДМБА) в вазелиновом масле в дозе 4—5 мг на животное. Клеточные реакции иммунитета на первичную опухоль и метастазы изучали на гистологических препаратах. Кусочки опухоли фиксировали в 10% формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 5—7 μ окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали под световым микроскопом. Аутотрансплантацию опухолей производили в селезенку в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток и подкожно в дозе $20 \cdot 10^6$ — $30 \cdot 10^6$ клеток. В опыте использовали опухоли 4—6 месяцев канцерогенеза, когда они достигали размеров $2 \times 2 \times 3$ — $3 \times 5 \times 6$ см.

Критерием иммунологических реакций организма против опухоли и ее метастазов служила инфильтрация их различными видами мононуклеаров (макрофагами, лейкоцитами, лимфоцитами, плазматическими клетками и др.), которую определяли по методу Хемлина (6). При отрицательной или слабо положительной реакции местных областей лимфоидно-мононуклеарной реакции не наблюдается и видны лишь случайные, единичные мононуклеары (0). Умеренной реакцией считали наличие в опухолях маленьких местных областей инфильтрации или очень тонких сплошных зон мононуклеаров (I). Сплошную зону мононуклеаров или очень большие местные зоны лимфоидно-мононуклеарной инфильтрации обозначали как резко выраженную клеточную реакцию (II). Клеточные реакции и взаимодействие клеток первичных опухолей и их метастазов с мононуклеарами изучали также и в культуре ткани, которая ставилась по методу А. Фишера (5). Мононуклеары получали из перитонеального экссудата экспериментальных животных нормальных и с развивающимися у них первичными индуцированными опухолями.

Т а б л и ц а 1

Интенсивность лимфоидно-мононуклеарной инфильтрации в первичных индуцированных опухолях, метастазах и аутотрансплантатах крыс

Исходный материал	Количество крыс с опухолями	Степень инфильтрации в абсолютных единицах и процентах		
		0	I	II
Рабдомиосаркомы	15	7 (46,6)	3 (20)	5 (33)
Полиморфно-веретеноклеточные саркомы	43	17 (39,5)	10 (23,2)	16 (37,2)
Веретеноклеточные саркомы	25	7 (28)	9 (36)	9 (36)
Полиморфноклеточные саркомы	12	8 (66,6)	1 (8,3)	3 (25)
	Всего — 95	Ср. = 41,8	Ср. = 24,2	Ср. = 34,6
Метастазы в:				
а) легких	37	12 (32,4)	9 (24,3)	16 (43,2)
б) печени	33	15 (45,4)	6 (18,1)	12 (36,3)
в) сальнике	8	5 (62,5)	0	3 (37,5)
г) брыжейке	6	3 (50)	2 (33,3)	1 (16,6)
	Всего — 84	Ср. = 42,0	Ср. = 20,2	Ср. = 38
Аутотрансплантаты в:				
а) селезенке	11	1 (9,0)	4 (36,3)	6 (54,5)
б) подкожно	12	6 (50,1)	2 (16,6)	4 (33,3)

Примечание: 0 — нет областей клеточной реакции и видны лишь случайные мононуклеары, I — небольшие области мононуклеаров, II — многочисленные скопления мононуклеаров как по периферии, так и в центре опухоли.

Для изучения клеточных реакций на первичные опухоли и их метастазы было взято 206 крыс 4—6 месяцев канцерогенеза. Результаты этих исследований представлены на таблице 1. Как показали исследования, из 95 первичных опухолей резко выраженная лимфоидно-

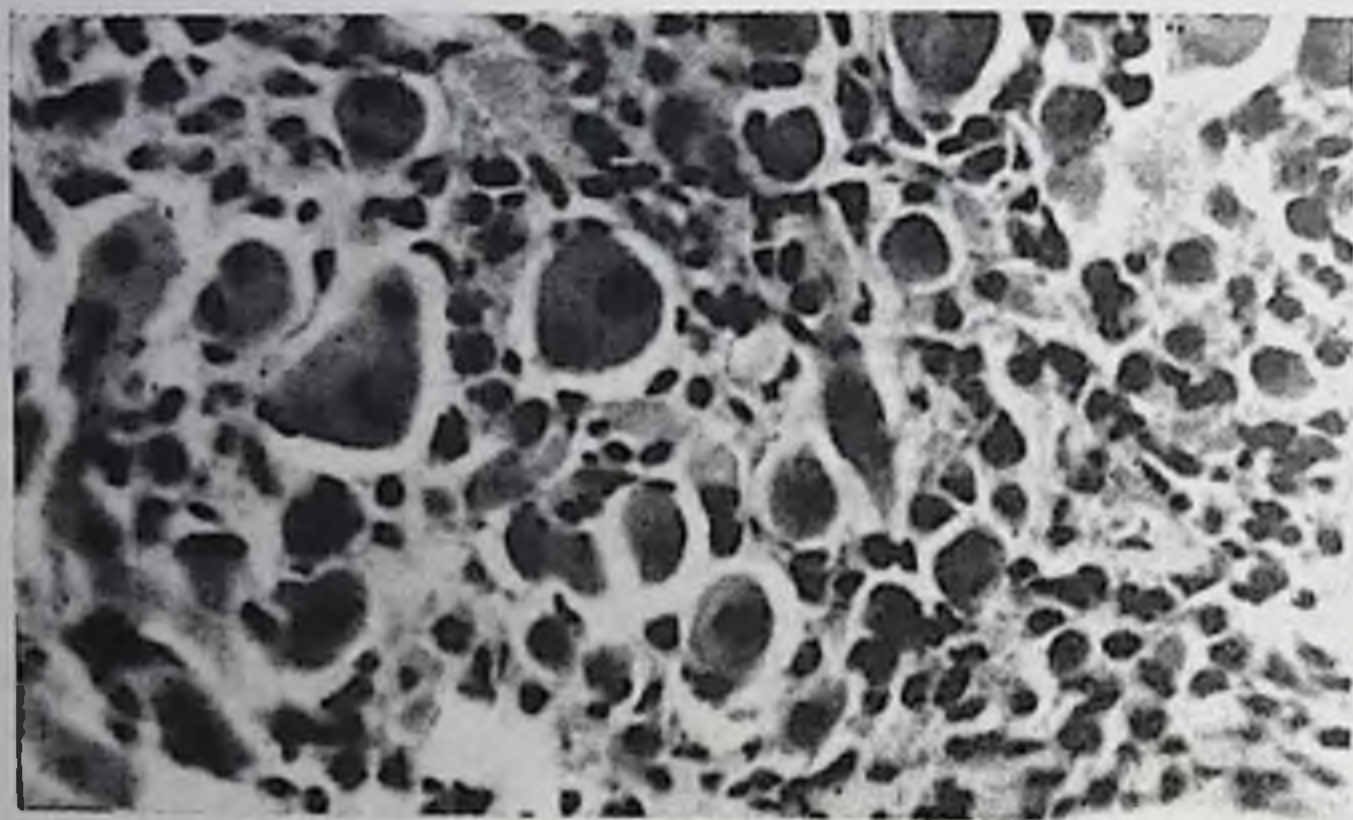


Рис. 1. Выраженная мононуклеарная реакция в первичной рабдомиосаркоме. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 250$.

мононуклеарная инфильтрация была обнаружена в 34,6% случаев, умеренная — в 24,2% и отрицательная или слабо положительная —



Рис. 2. Умеренная мононуклеарная реакция в первичной веретенноклеточной саркоме. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 90$.

в 41,8%. В метастазах из 84 случаев резко выраженную клеточную реакцию наблюдали в 38% случаев, умеренную — в 20,2% и слабо положительную или отрицательную — в 42%. Интенсивность лимфо-

идно-моноклеарной реакции в аутотрансплантатах опухоли была соответственно в селезенке — 54,5; 36,3; и 9,0 и подкожно — 33,3; 16,6 и 50% случаев. На рис. 1, 2 и 3 показаны образцы лимфоидно-моноклеарной реакции в первичных опухолях и метастазе.

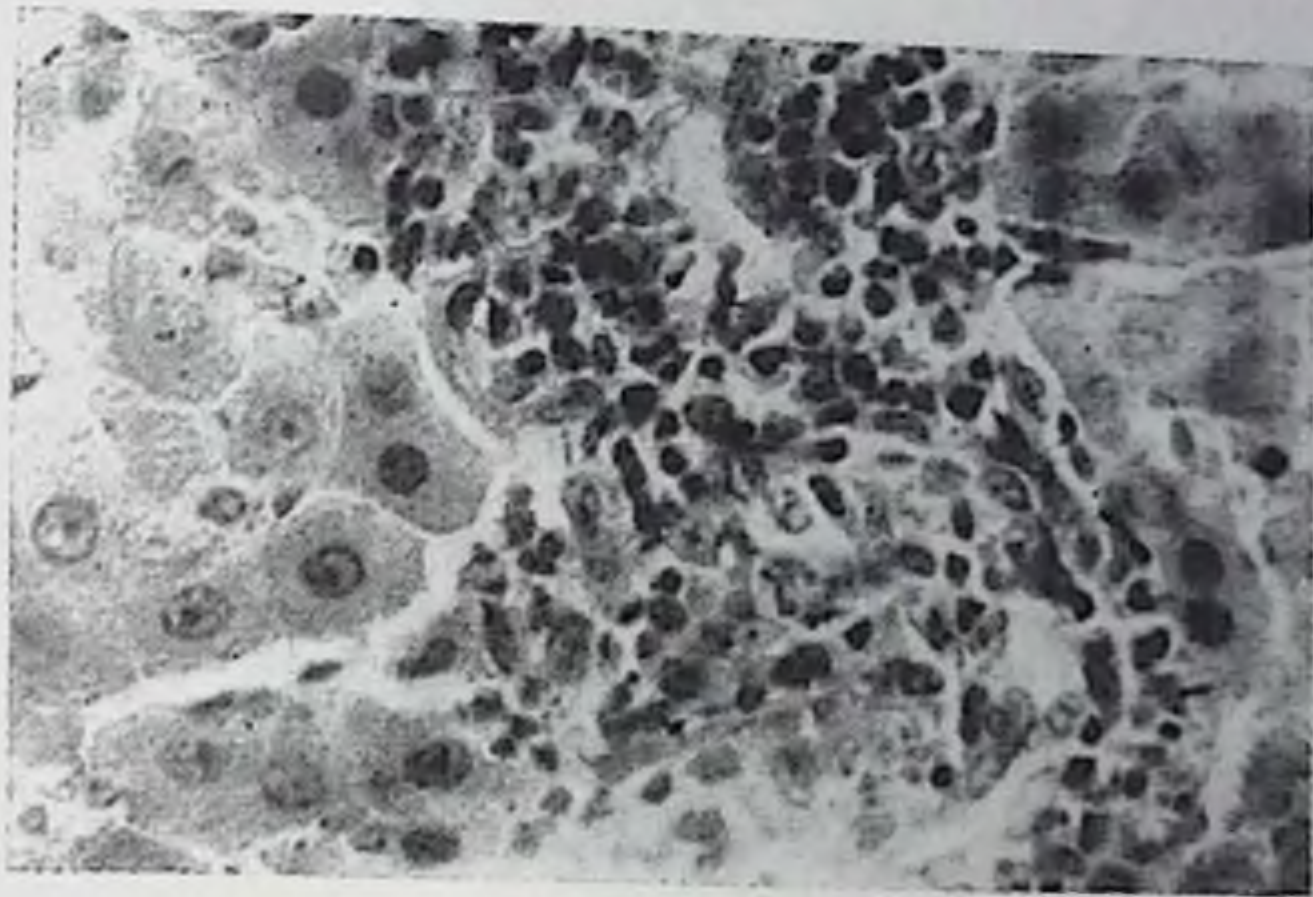


Рис. 3. Метастаз веретенноклеточной саркомы в печень. Интенсивная моноклеарная реакция. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 250$.

Полученные результаты показали, что первичные индуцированные опухоли и их метастазы по интенсивности в них клеточной реакции подразделяются на три вида: опухоли с отрицательной, умеренной и резко выраженной инфильтрацией их моноклеарами. Повидимому, в опухолях с относительно выраженной антигенностью моноклеары, интенсивно инфильтрируя ткань опухоли, вступают в определенную реакцию с злокачественными клетками и, тем самым, оказывают ингибирующее влияние на злокачественный рост. На основании этого предположения были изучены клеточные взаимодействия между опухолью и моноклеарами в культуре ткани. Исследования, проведенные в культуре ткани, показали, что при эксплантации первичных опухолей и их метастазов на аутологичных и гомологичных сыворотках наблюдаются три типа роста: 1) отсутствие или очень слабая пролиферация злокачественных клеток при интенсивной миграции из эксплантатов макрофагов, лимфоцитов и других моноклеаров, 2) умеренная пролиферация клеток опухоли при слабой или умеренной миграции моноклеаров и 3) интенсивная пролиферация злокачественных клеток и отсутствие или очень слабая миграция моноклеаров.

В дальнейшем мы решили выяснить, как будут реагировать в культуре ткани злокачественные клетки и моноклеары, взятые от животных, нормальных (контроль) и имеющих первичные индуцированные опухоли (опыт). Для этой цели были взяты макрофаги, которые, как известно, обладают высокой чувствительностью в отношении распознавания новых антигенов, появляющихся в организме при различных

патологических процессах, в том числе и при злокачественном росте. Как показали наши исследования, в перитонеальной жидкости крысы, взятой через 48 часов после введения животным 2% раствора пептона, содержится 80—85% макрофагов, 15—20% лимфоцитов и 3—5% дру-

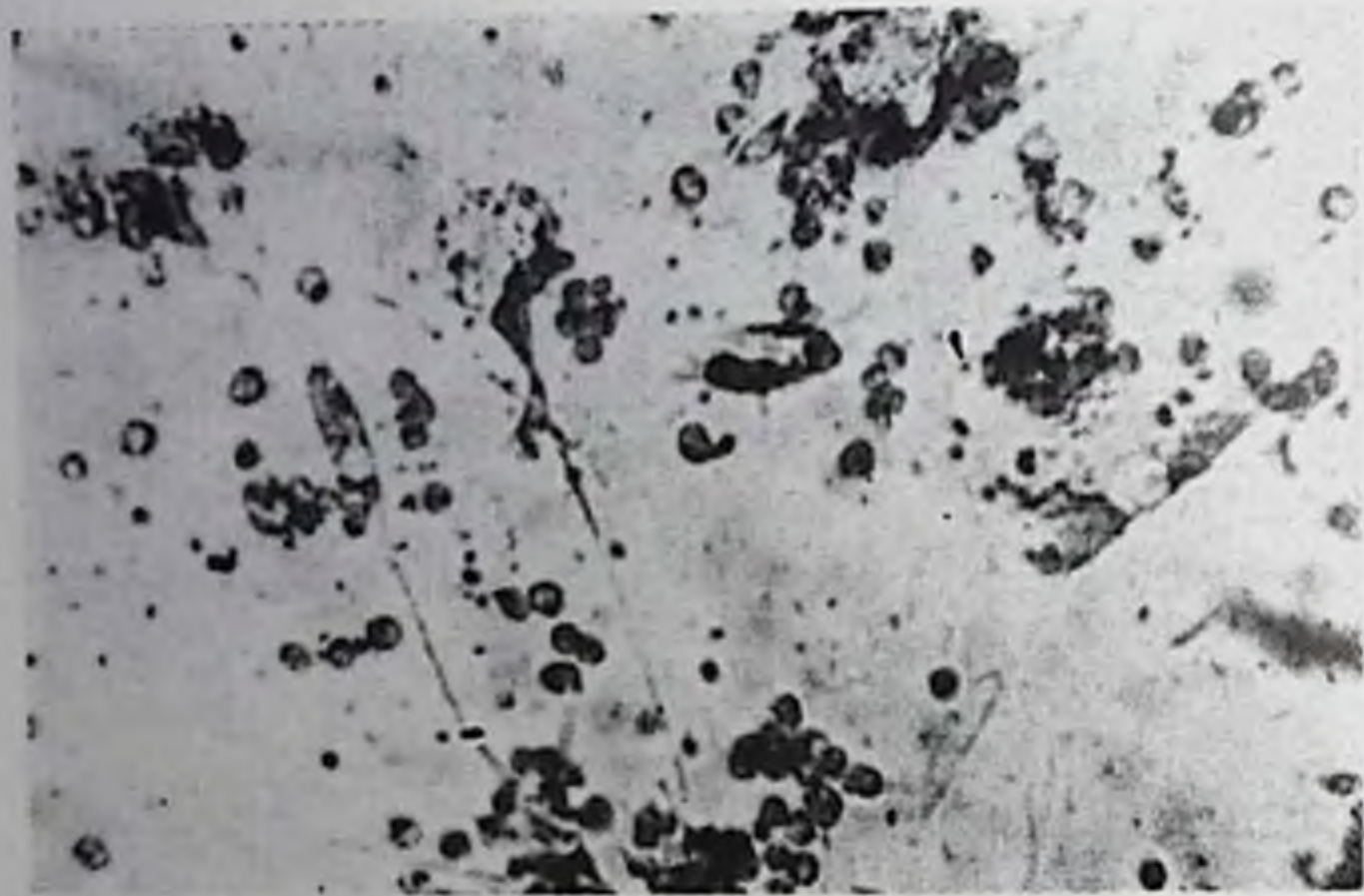


Рис. 4. Цитоллиз в культуре ткани клеток полиморфноклеточной саркомы аутомакрофагами. Увеличение $\times 200$.

гих круглоклеточных элементов. Макрофаги добавляли в культуру ткани через 48 часов эксплантации, когда появлялась интенсивная зона роста, состоящая из пролиферирующих злокачественных клеток. Результаты взаимодействия клеток учитывали через 24 часа после добавления макрофагов. Исследования показали, что макрофаги взятые от нормальных животных, не обладали ингибирующим или цитотоксическим действием в отношении пролиферирующих злокачественных клеток. Макрофаги, взятые от крыс с развивающимися индуцированными опухолями (аутомакрофаги), при добавлении их в культуру ткани скапливались вокруг некоторых злокачественных клеток, прилипали к ним и затем через некоторый промежуток времени (18—24 часа) повреждали их и вызывали полный цитоллиз (рис. 4). Однако не все злокачественные клетки, тесно контактирующие с аутомакрофагами, подвергались цитоллизу. Часть из них сохраняла целостную структуру. Повидимому, такое различное взаимодействие макрофагов с злокачественными клетками можно объяснить различным характером антигенности самих злокачественных клеток, а также сенсибилизирующей активностью макрофагов.

Таким образом, полученные данные показали, что животные в определенном проценте случаев могут отвечать выраженной иммунологической реакцией не только на развивающиеся у них первичные опухоли, но и на их метастазы. Это свидетельствует о том, что и в клетках метастазов имеются новые антигены, с которыми способны реагировать макрофаги, лимфоциты и другие моноуклеары. Иммунологические исследования, проведенные в этом направлении, подтверждают это положение (2, 3). Если исходить из предположения, что клеточные реакции проявляются в организме в ответ на появление новых, не

присущих гомологичным нормальным клеткам, антигенов, то по характеру этих реакций можно судить об антигенности опухоли и подразделить их на три вида: опухоли сильно антигенные, слабо антигенные и неантигенные. Такой характер антигенности присущ не только различным опухолям экспериментальных животных, но и всей популяции клеток одной и той же опухоли. Различное реагирование аутомакрофагов с клетками опухоли в культуре ткани показывает, что злокачественные клетки одной и той же опухоли по своей антигенности не равнозначны. Повидимому, клетки с выраженными антигенными свойствами интенсивнее повреждаются клеточными факторами иммунитета, чем клетки неантигенные или слабо антигенные.

Результаты проведенных исследований могут представлять определенный интерес в отношении изучения тонких механизмов противоопухолевого иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков - Вережников Н. Н., П. Н. Майский, В. С. Гостев. — В кн.: Тез. научн. доклада на X сессии общего собрания АМН СССР, 1956.
2. Косяков П. Н., Р. П. Павлюченкова. — *Вопр. онкол.*, 1972, XVIII, 3, 41—45.
3. Ломакин М. С. Иммунология роста и метастазирования злокачественных опухолей. Автореферат докт. диссертации, 1969.
4. Петров Н. Н. В: Злокачественные опухоли, Л., 1947.
5. Fischer A. — *Cell. Res.*, 1954, 6, 2, 520—524.
6. Hamlin I. M. — *Brit. J. Cancer*, 1968, 22, 3, 383—401.
7. Moore O. S., F. W. Foote. — *Cancer*, 1949, 2, 635.
8. Nomoto K., R. K. Gershon. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1970, 44, 4, 739—749.
9. Richardson W. W. — *Brit. J. Cancer*, 1956, 10, 415.
10. Southam C. M., A. E. Moore. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, 73, 6, 635—651.
11. Yamada H., A. Yamada, V. R. Hollander. — *Cancer Res.*, 1969, 29, 7, 1420—1427.

A STUDY OF THE CELL RESPONSE TO PRIMARY TUMOURS AND THEIR METASTASES

M. S. Lomakin, I. N. Maysky, E. V. Sokolova, S. N. Goubenko

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The primary tumours, induced in the thigh muscles of DMBA-strain rats and their metastases can be divided in: tumours with no infiltration, tumours with moderate — and such with strong mononuclear cell infiltration. When explanted and treated with autologous sera these tumours show 3 types of explant growth: 1. Weak or no proliferation of malignant cells, accompanied by intensive migration of macrophages; 2. Moderate proliferation of malignant cells, accompanied by weak or moderate migration of macrophages; 3. Intensive proliferation of malignant cells, accompanied by weak migration of macrophages.

The mononuclear cells (autologous macrophages) added to the culture medium 48 hours after the explantation cause an inhibition (in a definite percentage of the cases) of the proliferation of the malignant cells and leads to their destruction.

О МЕЖКЛЕТОЧНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПЕРВИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ДМБА, С АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ

Г. П. АЙРАПЕТЬЯН, Р. Б. ГУДКОВА, И. Н. МАЙСКИЙ

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Рядом авторов показано, что лимфоциты играют определенную роль в противоопухолевой-резистентности организма (6, 7, 8, 15). Считают, что специфические раковые антигены локализуются на клеточных мембранах и ведут себя как слабые трансплантационные антигены (10, 11). В реакциях *in vitro* изучено взаимоотношение иммунных лимфоцитов с клетками-«мишенями» злокачественного происхождения, в основном, в сингенной и аллогенной системах (17, 1, 4, 3). В связи с тем, что антигены опухолей, индуцированных химическими канцерогенами, имеют индивидуальную специфичность (13, 16, 14, 20), наибольший интерес представляют те работы, в которых изучение взаимодействия между лимфоцитами и опухолевыми клетками *in vitro* проводилось в аутологичной системе (19 и др.).

Известно также, что введение канцерогена может вызывать уже на вторые сутки иммунодепрессию организма, которая сохраняется в течение двух месяцев (12, 9).

Исходя из вышесказанного, в нашу задачу входило изучить в аутологичной системе межклеточное взаимодействие между лимфоцитами и клетками сарком, индуцированных ДМБА у крыс Вистар и мышей линии СВА. В эксперименте использовались опухоли на четвертом месяце канцерогенеза, т. е. когда снижалось иммунодепрессивное влияние введенного канцерогена. Никакой дополнительной антигенной стимуляции не проводилось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты ставились по методу, разработанному Розенау и Мортонем (17). Крысу наркотизировали и асептически удаляли кусочек опухоли. Затем готовили взвесь опухолевых клеток, отмывали и подсчитывали их количество в 1 мл. Клетки культивировали в количестве $4 \cdot 10^6$

в 1 мл во флаконах с покровными стеклами размером $1,8 \times 1,1$ мм в среде 199 с добавлением 20% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 μ г/мл стрептомицина. Через 48 часов после культивирования опухолевых клеток к клеткам-«мишеням» присоединяли лимфоциты того же животного, выделенные после забоя крысы из селезенки. Контролем служили опухолевые клетки, культивируемые с лимфоцитами селезенки интактного животного. Соотношение клеток-«мишеней» и лимфоцитов во всех экспериментах составляло 1 : 50, что являлось оптимальным для данных условий опыта.

В связи с тем, что мыши плохо переносили иссечение кусочка опухоли, в этих опытах проводили раздельное культивирование клеток опухоли и лимфоцитов этого же животного в течение 48 часов, а затем после образования монослоя опухолевыми клетками к ним присоединяли аутологичные лимфоциты. В предварительных опытах методом Эрне было выявлено, что иммунокомпетентность мышинных лимфоцитов на третьи сутки культивирования, как правило, восстанавливалась до первоначального уровня. Эти результаты согласуются также с данными Утешева и Пинегина (2). Культивирование лимфоцитов до соединения с клетками-«мишенями» проводили в среде Игла с добавлением инсулина и витамина B_{12} .

Результаты опытов регистрировали через 24 часа после начала совместного культивирования. Взаимодействие лимфоцитов с опухолевыми клетками оценивалось по цитотоксической реакции при окрашивании трипановым синим. С целью морфологического изучения препаратов произвели прижизненную фиксацию и окраску культур клеток гематоксилином по Караччи. На каждую пробу использовали 4—6 флаконов и вычисляли средние показатели цитотоксической реакции. Морфологические наблюдения документировали микрофотографиями под увеличением $900 \times$. Всего было обследовано 30 мышей линии СВА и 28 крыс Вистар.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

Полученные данные по определению цитотоксического теста при культивировании клеток опухолей с аутологичными и нормальными лимфоцитами представлены на графике 1. В опытах с клетками опухолей, полученными от крыс Вистар, наблюдалось в 65% случаев статистически достоверное различие в проявлении цитотоксической реакции аутологичных лимфоцитов по сравнению с лимфоцитами, выделенными от интактных животных. Причем, интенсивность этой реакции также колебалась в достоверных пределах что позволило подразделить животных с положительным тестом на две группы. У 35% крыс цитотоксическое взаимодействие клеток-«мишеней» с иммунными лимфоцитами не проявлялось.

Аналогичные результаты были получены в культурах опухолевых клеток, вызванных ДМБА на мышях СВА. Однако цитотоксическое

взаимодействие *in vitro* между клетками опухолей и аутологичными лимфоцитами было более выраженным и отмечалось в 80% случаев.

Морфологическое изучение препаратов показало активное взаимодействие сенсibilизированных лимфоцитов с опухолевыми клетками.

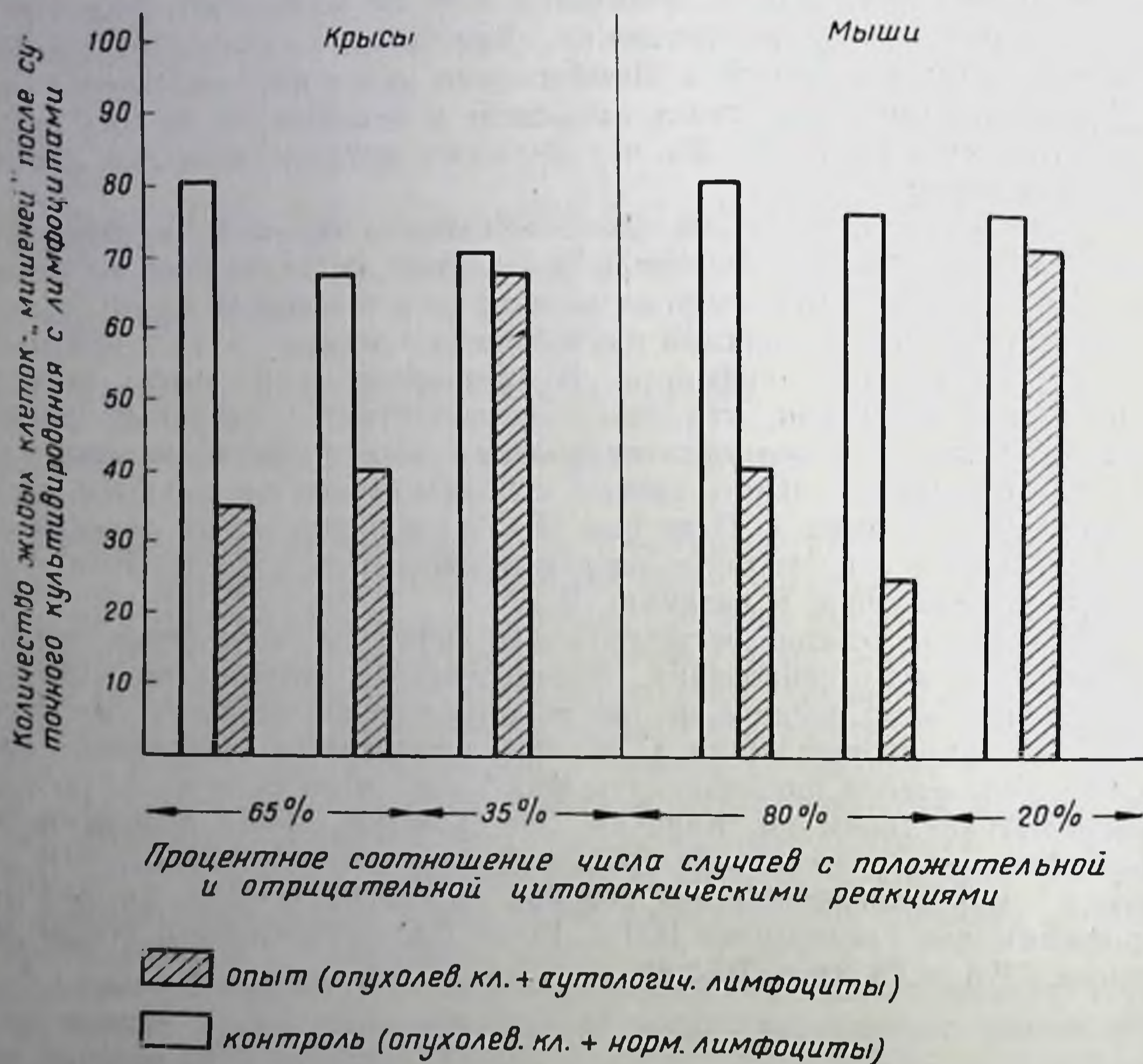


График 1. Цитотоксическое взаимодействие аутологичных лимфоцитов с клетками первичных опухолей, индуцированных ДМБА.

Лимфоциты, образуя грозди и цепочки между собой (рис. 1а), прикреплялись к поверхности клеток-«мишеней». На препарате можно было наблюдать проникновение лимфоцита в клетку со сдвигом в сторону ядра (рис. 1б). При пенетрации лимфоцита в клетку вокруг него часто образовывалась вакуоль (рис. 1в). Затем происходила де-струкция клетки (рис. 1г). В результате такого взаимодействия часто погибала не только раковая клетка, но и сам иммунный лимфоцит. Создавалось впечатление, что лимфоцит при пенетрации в клетку по-падал как бы в ловушку, в которой он погибал. Не исключено, что он утилизировался опухолевой клеткой, как донатор ДНК (5).

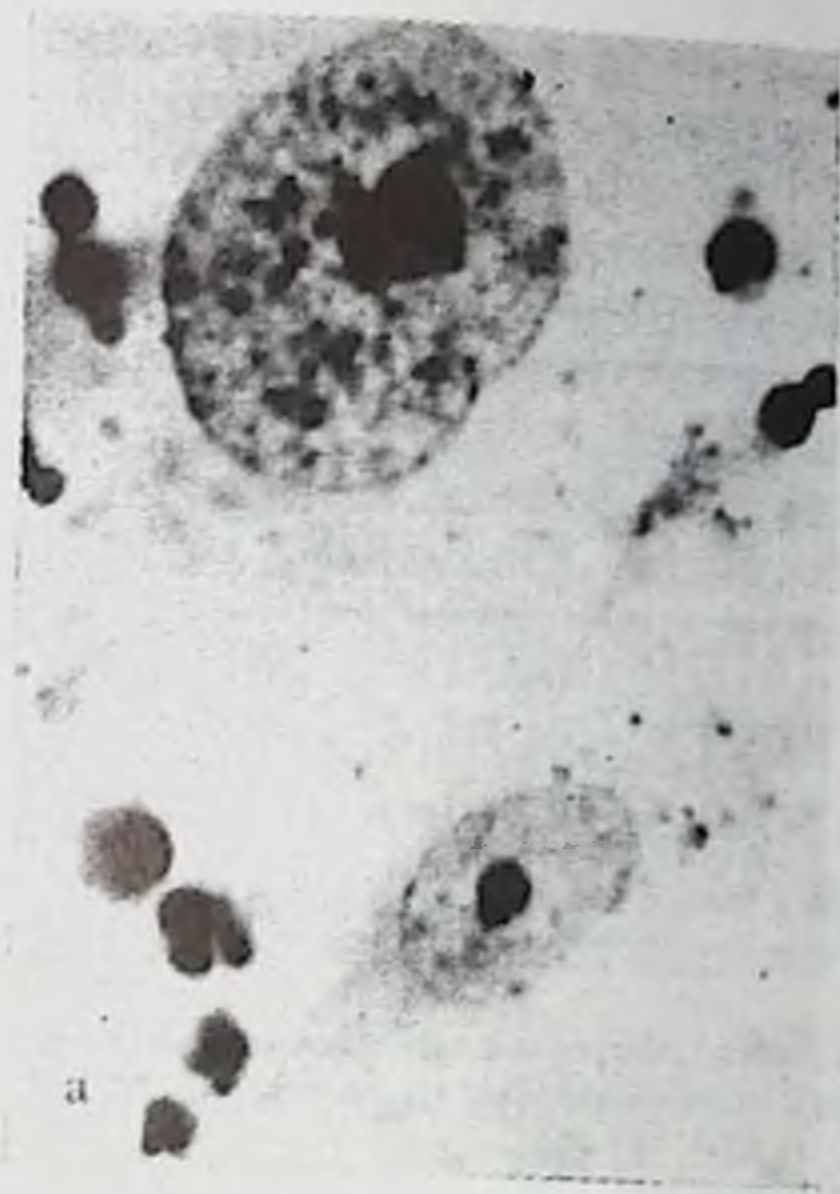


Рис. 1а. Образование цепочки из лимфоцитов. Ок. 10X, об. 90X.

Рис. 1б. Пенетрация лимфоцита. Ок. 10X, об. 90X.

Рис. 1в. Образование вакуоли вокруг лимфоцита. Ок. 10X, об. 90X.

Рис. 1г. Деструкция опухолевой клетки. Ок. 10X, об. 90X.

Однако и при морфологическом изучении в $1/3$ экспериментов отсутствовало взаимодействие между иммунными лимфоцитами и опухолевой клеткой, это, очевидно, связано с слабой индивидуальной антигенной активностью опухолей, индуцированных ДМБА. Необходимо подчеркнуть, что нормальные лимфоциты тоже способны были прикрепляться к клетке-«мишени» и даже проникать в нее, но их взаимодействие было случайным и значительно менее интенсивным.

Все вышеизложенное свидетельствует о роли клеточных факторов иммунитета при химическом канцерогенезе. Необходимо дальнейшее изучение более интимных механизмов этого явления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брондз Б. Д. В сб.: Вирусы, рак, иммунитет. М., 1965, 362.
2. Пинегин Б. В., Б. С. Утешев и др. — *Цитология*, 1970, 12, 10, 1307—1319.
3. Подоплелов И. И. и др. В сб.: Материалы Всесоюзн. конф. по общей иммунологии и противовирусному иммунитету, посвященной 125-летию со дня рожден. И. И. Мечникова, М., 1970, 1, 34.
4. Черняховская И. Ю., Г. Я. Свет-Молдавский. В кн.: Вопросы иммунопатологии в клинике и эксперименте, 1966, 48, 161—172.
5. Шац В. Я. — *Цитология*, 1972, 14, № 1, 3—12.
6. Berg S. — *Cancer*, 1959, 12, 714—720.
7. Black M. — *N. Y. State J. Med.* 1970, 70, 962—971.
8. Grunschwig A., C. Southam, A. Lewin. — *Ann. Surg.*, 1965, 7, 162, 416—425.
9. Cawein M., K. Sudnor. — *Cancer Res.*, 1968, 28, 320—327.
10. Hellström I. et al. — *Nature*, 1968, 220, 1352—1354.
11. Hellström I. et al. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 60, 1231—1238.
12. Huggins C. et al. — *Nature*, 1961, 189, 204—207.
13. Klein G. — *Cancer Res.*, 1959, 19, 4, 343—358.
14. Koldovsky P. — *Cancer Res.*, 1969, 22, 4, 251—259.
15. Menwissen H. et al. — *Seminars hemat.* 1969, 6, 28—66.
16. Old L., E. Bouse. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, 101, 1, 80—106.
17. Rosenau W., D. Morton. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1966, 36, 4, 825—836.
18. Rosenau W., H. Moon. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1961, 27, 471—477.
19. Sinkovics J. et al. — *Tex. Rep. Biol. a. Med.*, 1971, 29, 2, 227—242.
20. Smith R. — *New Eng. J. Med.*, 1968, 278, 1207—1214.

ON THE INTERACTION BETWEEN THE CELLS OF PRIMARY INDUCED DMBA TUMOURS AND AUTOLOGOUS LYMPHOCYTES

G. P. Ayrapetyan, R. B. Goudkova, I. N. Maysky

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

The interaction between immune lymphocytes and cells of induced DMBA tumours has been studied in an autologous cell culture system. The autologous lymphocytes exercise a cytotoxic effect on target-cells in 65% in rats and in 80% in mice. The morphologic study of the cultures disclosed a specific interaction, expressed in immune adherence, penetration, vacuoles formation and cell destruction.

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК ИНДУЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛУЧЕЙ РЕНТГЕНА

И. Н. МАЙСКИЙ, Г. В. СУВорова

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В предшествующих работах нами была показана возможность изменения антигенной структуры перевивных опухолей животных (кроликов, крыс, мышей) при условии воздействия *in vitro* на опухоли клетки, особенно эпителиального происхождения, проникающего излучения, в частности, лучей Рентгена и протонов с энергией 640 Мэв (2, 3, 4, 5).

Цель настоящей работы — выяснить, вызывают ли лучи Рентгена изменение антигенных свойств опухолей, индуцированных воздействием канцерогена, например, ДМБА.

В качестве экспериментальных животных были использованы мыши линии BALB, самки, весом 16—18 г.

Индукцирование опухоли достигали путем нанесения раствора канцерогена в бензоле на кожу спины в области лопаток, лишенную волосяного покрова. Смазывание проводили через день в течение 5 месяцев. Суммарная доза ДМБА на одну мышь составляла 1 мг.

Появившиеся новообразования через 6 месяцев после начала воздействия канцерогена удаляли, готовили из них антиген, которые использовали при проведении последующих экспериментов.

Влияние облучения на антигенные свойства опухоли, вызванной канцерогеном, выявляли с помощью реакции пассивной кожной анафилактики Овагу и методом нефелометрии Уанье.

Необходимую для применения указанных методов иммунную сыворотку получали путем иммунизации кроликов тканью опухоли, полученной под воздействием ДМБА в те же сроки на мышах указанной линии. Иммунизацию проводили пятикратно с интервалами в один день. Количество вводимого белка определяли по методу Кьельдаля. Суммарная доза белка на цикл иммунизации составляла 15 мг.

Двух кроликов (№ 25 и № 75) иммунизировали тканью опухоли, не подвергавшейся радиационному воздействию. Двум другим кроликам (№ 18 и № 130) вводили ткань опухоли, облученной *in vitro*

10 000 р. Облучение проводили при силе тока 15 мА, напряжении 40 кV, фильтре 0,1 мм Al, фокусном расстоянии 75 мм. Кровь брали у животных из краевой вены уха на 7-ой день после последней иммунизации.

При постановке реакции пассивной кожной анафилаксии Ovaгу морским свинкам, весом около 250 г, внутрикожно вводили по 0,1 мл иммунной сыворотки. В кожу правого бока инъецировали сыворотки № 18 и № 130, полученные путем иммунизации кроликов облученной *in vitro* тканью индуцированной опухоли. В кожу левого бока вводили сыворотки № 25 и № 75, специфичные к нативной необлученной ткани той же опухоли. Контрольным животным внутрикожно вводили по 0,1 мл физиологического раствора.

По прошествии латентного периода (4 часа) всем опытным и контрольным морским свинкам в вену бедра вводили 1 мл смеси 1 : 1 раствора синьки Эванса и антигена, полученного из нативной ткани опухоли, индуцированной ДМБА. Интенсивность наблюдаемой реакции учитывали по шкале, предложенной С. Михклой (1).

При применении метода нефелометрии Уанье имеющиеся антисыворотки, специфичные по отношению к нативной и облученной *in vitro* ткани опухоли, индуцированной ДМБА, разводили физиологическим раствором 1 : 4. К полученному разведению сывороток добавляли в кюветы последовательно 7 порций по 0,01 мл антигена нативной ткани индуцированной опухоли в разведении 1 : 1000. Нефелометрирование проводили на ФЭК-56.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены данные, полученные при постановке реакции пассивной кожной анафилаксии Ovaгу.

Т а б л и ц а 1

Интенсивность реакции Ovaгу (по шкале С. Михклы)

№№ морских свинок	Введение сывороток			
	специфичных к облученной ткани индуцированной опухоли		специфичных к нативной ткани индуцированной опухоли	
	№ 18	№ 130	№ 25	№ 75
1	+	±	++	+++
2	++	+	++	+++
3	+	+	+++	++
4	±	+	++	+++
5	+	±	++	++

Из представленных данных следует, что интенсивность реакции Ovaгу была значительно более выраженной в тех случаях, когда анти-

ген необлученной ткани опухоли взаимодействовал с сывороткой, полученной путем иммунизации животных тканью нативной необлученной опухоли. Реакция этого же антигена с сывороткой, полученной при иммунизации кроликов облученной тканью опухоли, была значительно менее интенсивной. Последнее свидетельствует о том, что ткани опухоли, индуцированной ДМБА, изменили присущие им антигенные свойства под влиянием воздействия на них *in vitro* лучей Рентгена в дозе 10 000 р.

Результаты взаимодействия антигена нативной ткани индуцированной опухоли с двумя видами иммунной сыворотки, выявляемого при помощи метода Уанье, представлены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Результаты нефелометрирования

Вид антигена	№ порции антигена	Показатели нефелометра	
		сыворотки, специфичные по отношению	
		к нативной ткани индуцированной опухоли № 75	к облученной ткани индуцированной опухоли № 18
Нативная ткань опухоли, индуцированной ДМБА	0	0,304—0,304	0,257—0,256
	1	0,285—0,285	0,257—0,256
	2	0,270—0,270	0,228—0,226
	3	0,270—0,271	0,210—0,208
	4	0,257—0,256	0,208—0,209
	5	0,249—0,249	0,186—0,186
	6	0,249—0,248	0,180—0,180
	7	0,230—0,230	0,171—0,172

Результаты нефелометрирования свидетельствуют о том, что антиген нативной ткани опухоли, индуцированной ДМБА, различно реагирует с сыворотками, полученными иммунизацией кроликов одноименной тканью нативной и облученной *in vitro* лучами Рентгена в дозе 10000 р. Если в первом случае мы отмечаем при добавлении 3-ей и 6-ой порций антигена образование двух плато, т. е. имеем реакцию интенсивностью 2+, то во втором случае можно отметить только незначительную задержку падения оптической плотности исследуемого материала при добавлении 4-ой порции антигена.

Резюмируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что лучи Рентгена при воздействии *in vitro* вызывают изменение антигенных свойств не только первичных опухолей, но оказывает влияние на антигенную структуру опухоли, возникающей в результате действия канцерогена, в частности ДМБА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михла С. К. Сравнительная характеристика некоторых серологических и иммунологических реакций. Автореферат канд. дисс., Л., 1965.
2. Майский, И. Н. Г. В. Суворова. — *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 1957, № 9, 94.
3. Майский, И. Н. Г. В. Суворова. В кн.: Проблемы пересадки и консервирования органов и тканей, М., 1959, 98.
4. Суворова Г. В. В кн.: Труды конфер. по иммунобиологии злокачеств. новообразований, М., 1965, 40.
5. Суворова Г. В. В кн.: Изменение антигенных свойств злокачественных, клеток под влиянием ионизирующей радиации. Автореферат докт. дисс. М., 1968.

CHANGES OF THE ANTIGENIC BEHAVIOR OF INDUCED TUMOUR CELLS AFTER X-RAY IRRADIATION

I. N. Maysky, G. V. Souvorova

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

Carcinogen induced tumours, in particular the DMBA induced, change their antigenic behaviour after *in vitro* X-ray irradiation.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РАКОВЫХ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

В. С. КОРОСТЕЛЕВА, П. Н. КОСЯКОВ

Отдел иммунологии Института вирусологии им. Д. И. Иванского АМН СССР,
Москва

Проблема рака, несмотря на многолетние исследования, продолжает оставаться одной из наиболее сложных и актуальных в современной медицине. Успешная борьба с опухолевыми заболеваниями во многом зависит от познания закономерностей злокачественного роста и, особенно, причин его возникновения. Иммунология занимает одно из ведущих мест в изучении этого вопроса и развивается в двух основных направлениях. С одной стороны, изучаются особенности антигенного состава опухолей, с другой — выясняется возможность ответной иммунологической реакции организма на опухолевый рост. Оба эти направления тесно связаны между собой, так как понятие о противоопухолевом иммунитете предполагает наличие в тканях злокачественных опухолей новых, специфических для них, антигенных веществ, отсутствующих в нормальных тканях.

В качестве специфических антигенов могут выявляться не только чужеродные для организма онкогенные вирусы, но и вещества, возникающие эндогенно, вследствие воздействия на клетки вирусов и других этиологических агентов. Пока еще не доказана с достоверностью роль вирусов в происхождении опухолей у человека. Поэтому, их иммунологическое изучение с целью обнаружения новых антигенов основывается в настоящее время на сопоставлении антигенных свойств опухолевых и нормальных тканей.

Такое сравнительное изучение связано с большими трудностями ввиду ярко выраженного сходства антигенного состава опухолей и тканей здоровых лиц. Известно, что опухолевые клетки, несмотря на злокачественную трансформацию, сохраняют видовые, групповые и некоторые другие антигены, характерные для исходных нормальных тканей (7). Наличием общих антигенов объясняются и те большие методические трудности, которые возникают при получении моноспецифических сывороток, а также при выделении и очистке препаратов опухолевых антигенов.

На протяжении ряда лет нами проводились исследования по выявлению специфических антигенов в раковых тканях человека, изучению их некоторых физико-химических свойств, а также в направлении иммунологического дифференцирования этих антигенов в опухолях отдельных больных. Упомянутые выше вопросы представляют не только теоретический интерес, так как способствуют выяснению этиологии и патогенеза заболевания, но имеют и большое практическое значение с позиций возможного применения иммунологических методов в клинике.

Для решения поставленных задач нами был разработан метод избирательной абсорбции, который оказался пригодным не только для очистки противораковых сывороток от неспецифических, перекрестно-реагирующих антител, но в сочетании с реакцией связывания компонента (РСК) — и для сравнительного анализа антигенов злокачественных и нормальных тканей (8, 9).

Наши опыты показали высокую степень специфичности в РСК противораковых сывороток, полученных при иммунизации кроликов антигенным материалом из индивидуальных опухолевых образцов и подвергнутых истощению гомогенатом нормальной формализированной ткани. Такие антисыворотки интенсивно связывали компонент с экстрактом из карциномы соответствующего больного и не реагировали при этом с сывороточным белком, экстрактами из эритроцитов различных групп крови и из самых разнообразных тканей здоровых взрослых людей (печень, почки, селезенка, кишечник и другие). Кроме того, подвергнутые истощению противораковые сыворотки не содержали антител к различным эмбриональным тканям человека, а также к эритроцитам барана и почке морской свинки, т. е. к гетерогенному антигену Форсмана (11, 12). Достоверность полученных результатов подкреплялась одновременным перекрестным испытанием антигенов с контрольными иммунными сыворотками, специфично направленными к сывороточному белку, эритроцитам А и В групп крови, тканям здорового человека, а также к эритроцитам барана и почке морской свинки.

Таким путем было установлено, что раковые опухоли содержат новые, специфические для них антигенные вещества, отличающиеся от ряда уже известных факторов организма, общих для опухолей и тканей здорового взрослого человека, а именно: от видовых, групповых, органоспецифических и гетерогенных антигенов, а также от антигенов эмбриональных тканей.

В процессе этой работы нами был выяснен важный в методическом отношении факт. Оказалось, что из всех, использованных нами для контроля клеток и тканей наибольшей антигенной близостью с опухолями обладает ткань селезенки здорового человека (1). Поэтому серологические реакции, применяемые для обнаружения опухолевых антигенов, следует контролировать на их специфичность не только с антигеном из органа, соответствующего локализации опухоли, как это было принято прежде, а с антигенами из ряда нормальных органов и, прежде всего, из селезенки.

Антигенное своеобразие карцином человека в сравнении с нормальными тканями взрослого и эмбриона было полностью подтверждено опытами абсорбции противораковых и противотканевых сывороток гомогенатами опухолевой и нормальной ткани.

Еще более убедительные данные о существовании в раковых опухолях человека специфических для них антигенов получены при исследовании полностью однородного в генетическом отношении материала, т. е. при сравнении антигенов опухоли и не пораженных злокачественным процессом органов тех же самых больных, погибших от рака (5). Специфический антиген обнаруживался при этом только в опухолевой ткани и не содержался во многих, исследованных нами, органах больных раком.

Согласно данным РСК и метода флуоресцирующих антител, специфические антигены распределяются диффузно в цитоплазме опухолевой клетки и отсутствуют в ядре (13).

При иммунологическом сопоставлении раковых опухолей от нескольких больных раком с противораковыми сыворотками к индивидуальным тканевым образцам был обнаружен существенно важный факт, свидетельствующий о наличии специфических антигенных и иммуногенных различий между ними (2, 4, 10). Оказалось, что противораковая сыворотка, полученная к карциноме одного лица, при положительной реакции с экстрактом из этой же опухоли не взаимодействовала с опухолью другого больного. Наличие специфического антигена к второй опухоли было установлено только с противораковой сывороткой, приготовленной в результате иммунизации карциномой второго пациента. Качественное различие специфических антигенов раковых опухолей подтвердилось и методом абсорбции. Тем не менее, антигены раковых опухолей не являются индивидуально специфическими и встречаются группы опухолей со сходными свойствами, что также выявлялось в РСК и в опытах абсорбции (2). Сходство и различие специфических антигенов не было связано с локализацией опухоли, ее гистологическим строением и с содержанием групповых антигенов АВ0. На основании изучения 67 новообразований от больных раком было отмечено, что антигенные различия раковых опухолей выражены в большей степени, чем их сходство. Нами обнаружена также полная идентичность антигенной структуры первичной опухоли и ее метастазов в лимфатические узлы или различные внутренние органы.

Исходя из установленного нами факта существования нескольких, качественно обособленных, иммунологических вариантов специфических опухолевых антигенов у больных раком, можно предполагать различие и многообразие этиологических агентов, вызывающих раковый процесс у человека, подобно тому, как различные опухолеродные вирусы и канцерогены индуцируют разные по своей специфичности антигены в экспериментальных опухолях животных.

При изучении физико-химических свойств опухолевых антигенов было обнаружено, что они полностью сохраняют свою серологическую активность и способность индуцировать антитела у кроликов после

обработки опухолевых тканей формалином, кипячения в течение 30 минут и воздействия протеолитических ферментов: пепсина, трипсина и папаина (3, 6). Это дало нам основание исключить белковую природу опухолевых антигенов.

Оказалось, что препараты высокомолекулярных соединений углеводов или их комплексы, выделенные из опухолевых тканей, также не содержат специфических опухолевых антигенов.

Наши исследования показали, что специфические антигенные свойства карцином связаны с другим классом соединений, а именно с веществами липидной природы, способными растворяться в этиловом спирте, эфире, хлороформе и не растворимыми в ацетоне, т. е. относящимися, вероятно, к фосфолипидам (11). По своим иммунологическим свойствам опухолевые липиды являются типичными гаптенами. Они обладают специфической серологической активностью *in vitro*, но не приводят к возникновению антител при введении *in vivo*. Однако, в сочетании с чужеродным белком лошади, т. е. шлеппером, липиды приобретают свойства полноценных антигенов и индуцируют у кроликов противораковые антитела.

Дальнейшее изучение в опытах с применением липазы, перйодата калия и кислотного гидролиза показало, что липидные гаптены раковых опухолей являются не простыми, а сложными соединениями липидов и включают в свою структуру сахара, т. е. представляют собой глико-липидные комплексы (3). Согласно полученным нами данным, специфической серологической активностью обладает только глико-липидный комплекс, но не отдельные его компоненты.

Следовательно, физико-химическое изучение природы специфических комплементфиксирующих антигенов раковых опухолей человека показало, что они являются сложными, комплексными антигенами и состоят из белкового носителя, играющего роль шлеппера, и детерминантной группы глико-липидной природы, с которой и связана специфичность этих антигенов.

То, что белки опухолевой клетки, согласно нашим данным, не определяют специфичность ракового антигена, а несут роль шлеппера, т. е. не отличаются иммунологически от белков клеток и тканей здорового человека, является, возможно, одной из причин слабой чужеродности опухолевого антигена и, соответственно, причиной слабой ответной иммунологической реакции организма на развитие в нем опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коростелева В. С. В кн.: Вопросы иммунологии нормальных и злокачественных тканей. М. Медгиз, 1956, 94—104.
2. Коростелева В. С. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, 1957, 8, 87—90.
3. Коростелева В. С. — *Вопр. онкол.*, 1968, 7, 35—40.
4. Коростелева В. С., П. Н. Косяков. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, 1957, 4, 83—87.
5. Коростелева В. С., П. Н. Косяков. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, 1966, 5, 94—97.

6. Коростелева В. С., П. Н. Косяков. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, 1961, 2, 87—92.
7. Косяков П. Н. Антигенные вещества организма и их значение в биологии и медицине. М., Медгиз, 1954.
8. Косяков П. Н., В. С. Коростелева, Н. И. Кузнецова. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, 1955, 9, 63—65.
9. Косяков П. Н., В. С. Коростелева. В кн.: Иммунологические методы исследования злокачественных новообразований. М., 1959, 59—70.
10. Косяков П. Н., В. С. Коростелева. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, 1959, 2, 93—98.
11. Косяков П. Н., В. С. Коростелева. — *Вопр. онкол.*, 1965, 10, 58—63.
12. Косяков П. Н., В. С. Коростелева. — *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 1967, 2, 89—93.
13. Павлюченкова Р. П., В. С. Коростелева, П. Н. Косяков. — *Вопр. онкол.*, 1970, 6, 38—34.

IMMUNOLOGIC SPECIFICITY OF HUMAN CANCER TISSUES

V. S. Korosteleva, P. N. Kossjakov

Section of Immunology, D. I. Ivanovski Institute of Virology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

A brief report of the basic results of the authors' years-long studies on the immunology of human cancer is given in this paper. These studies refer to the detection of tumour specific antigens, the investigation of their physical and chemical properties and their immunological differentiation in various cancer patients. A list of references on the same subject is added.

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АУТОАНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГЕНИТАЛИЙ

Л. МАРХОЛЕВ, Б. БОТЕВ, СТ. ЖИВКОВ, Б. ВАСИЛЕВ

Кафедра общей биологии Медицинской академии, София, Болгария

В последние годы возрос интерес к вопросу о наличии опухолевоспецифических антигенов и соответствующих аутоантител при раке у человека (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14). Различия в результатах многих исследований в этой области можно объяснить разными методическими подходами: использованные методики отличаются не только своей чувствительностью, но и возможностью обнаруживать поверхностные или внутриклеточные антигены или тот или иной вид антител.

Задачей нашего исследования — определение наличия опухолевоспецифических аутоантител в сыворотке больных раком методом иммуноприлипания (8).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сыворотки получали из крови, которую брали до оперативного удаления опухоли и в отдельных случаях через 14—20 дней после удаления. После декомплементирования (выдерживая при 56° С в течение 20 мин), сыворотку распределяли по 0,5 мл в ампулы и сохраняли при — 25° С.

Кратковременные культуры опухолевых клеток получали после трипсинизации стерильно взятого материала опухоли. Промытые раствором Хенкса клетки помещали в пробирки, содержащие по 2 мл питательной среды Eagle, содержащей 20% телячьей сыворотки. В 1 мл суспензии содержалось 30 000—50 000 клеток. Исследования производили через 3—7 дней после начала инкубации клеток.

Примененный в работе метод иммуноприлипания описан в другой нашей статье (в этом же сборнике).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обследованы сыворотки 19 женщин: в 9 случаях обнаружен рак шейки матки, в 2 — рак тела матки и в 8 — установлен рак яичников. Из общего числа больных, сыворотки 8 исследованы как до, так и после оперативного вмешательства. Дважды исследована сыворотка неоперабельной больной с поздней стадией рака яичника (шифр № 21 в таблице).

Взятие крови почти во всех случаях проводили до применения химио- и/или лучевой терапии. Только у больных (с шифром 5 и 21) забор крови для повторного исследования был после лучевой терапии (шифр № 5) и после химиотерапии (шифр № 21).

В таблице представлены результаты исследований сыворотки больных до и после операции. В качестве антигена использованы клетки собственной опухоли.

Т а б л и ц а 1

Сыворотка больной раком	№ протокола	до	после	Примечание
		операции		
Шейки матки	1	++		№ 5 — до повторного исследования начато лучевое лечение
	2	+		
	5	++±	+±	
	8	—	+	
	10	+±		
	11	+	+±	
	13	—	—	
	16	++		
	19	—	+	
Тела матки	7	—		
	20	+±		
Яичника	4	++	+++	№ 21 — неоперабельна. До повторного исследования начата химиотерапия
	12	+±		
	14	+		
	15	+±	+±	
	18	+	++	
	21	+	—	
	22	++±		
	23	+		

Результаты реакции сыворотки раковых больных с аутологичными клетками опухоли методом иммуноприлипания.

Видно, что из 19 сывороток, взятых до операции, 15 дают положительную реакцию, а 4 — отрицательную. Во всех 8 случаях рака яичников реакция сыворотки была положительной.

Наши результаты подтверждают данные других авторов (3, 5, 6, 10, 11, 14) о наличии аутоантител в сыворотке больных раком. Несовпадение частоты случаев положительных реакций с данными других авторов можно объяснить различием в чувствительности использованных методик и, вероятно, особенностями самого заболевания.

Оперативное удаление опухоли приводит к некоторому изменению реакций: в двух случаях отрицательная реакция стала положительной, в трех случаях отмечено усиление положительной реакции, в двух случаях изменение не наблюдалось и в одном выявлено снижение реакции.

Малое число повторно взятых и исследованных сывороток не дает возможность сделать надежные выводы. Имея в виду, что в результатах этих исследований преобладает позитивирование и усиление иммунной реакции (только в одном случае отмечено снижение силы этой реакции, когда сыворотка на повторное исследование была взята после проведения лучевой терапии), и основываясь на аналогичных исследованиях против клеток HeLa (3), мы склонны принять, что удаление опухоли отражается положительно на наличие опухолевоспецифических аутоантител в сыворотке больных.

В пользу этого вывода можно привести случай с неоперабельной больной, у которой выявлена поздняя стадия ракового заболевания (с шифром № 21), у которой при повторном исследовании (без удаления опухоли) выявлено снижение положительной до этого, хотя и очень слабой иммунной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ботев Б., Л. Мархолов. — *Онкология (Соф.)* 1967, IV, 2, 53.
2. Жуков-Вережников Н. Н., И. Н. Майский, В. С. Гостев. В кн.: Труды X сессии АМН СССР, М., 1959.
3. Зильбер Л. А., В. В. Городилова, Л. Н. Аверкиева, В. А. Артамонова, К. В. Ильин, Ж. Ж. Спурье, И. В. Колядюк. — *Вопр. онкол.*, 1969, № 5, 18.
4. Покровская Т. А., Л. Мархолов, Б. Ботев, Ст. Живков, Зл. Дудунков, Х. Швачев, Б. Василев, И. Руменов — В этом сборнике, стр. 153.
5. Dogé J. F., R. Motta, L. Marholev, I. Hrsak, H. Colas de la Noue, G. Seman, F. de Vassal and G. Mathé. — *Lancet*, 30, 1967, 1396.
6. Dogé J. F., L. Marholev, E. Ajuria, M. Dogé, M. Raintrand, G. de Thé and G. Mathé. В сб.: *I Нац. Конгрес по онкология*, 1969, № 315, 183.
7. Edumek E., Y. Hirshaut, L. Old, G. Temple In: Proc. Amer. Assoc. for Cancer Res., N° 298, 73, 1971, Illinois.
8. Fulton F. — *Nature*, 1965, 207, 1214.
9. Gray B., G. Meligan, D. Morton. In: Proc. Amer. Assoc. for Cancer Res., № 315, 79, 1971, Illinois.
10. Hellström I., K. Hellström, G. Pierce, A. Bill. — *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, 1968, 6, 1231.
11. Klein G., P. Clifford, E. Klein, J. Sternswärd. — *Proc. Natl. Acad. Sci., US.*, 1966, 55, 1628.

12. Lewis M. — *Lancet*, 1969, 2, 921.
13. Old L., E. Boyse. — *Cancer Res.*, 1968, 28, 1288.
14. Southam C. — *Progr. exp. tumor res.*, 9, 1967, 9, 1.

TUMOUR SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN FEMALE PATIENTS WITH CANCER OF THE GENITALS

L. Markholev, B. Botev, S. Zhivkov, B. Vassilev

Department of General Biology, Medical Academy, Solia, Bulgaria

SUMMARY

The sera of 19 women with cancer of the uterus or the ovaries have been studied by immune adherence technique using autologous tumour cells as antigens. In 15 patients the reaction was positive and in 4 — negative. Eight of the women were reinvestigated 14—20 days after the surgical removal of the tumour. An activation of the serum immune reactions (including positivization of formerly negative reactions) was observed in 5 patients; in 2 the reactions remained unchanged and in 1 the reaction subsided.

These results are in agreement with the concept that malignant degeneration of the cell, as well as the development of cancer growth is connected with arising of specific cancer antigens and autoimmunization in the organism.

РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ НА РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ РЕГУЛЯЦИИ АНТИТЕЛОГЕНЕЗА В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Н. И. РЫБАКОВ, М. Н. ВОЛКОВ, З. П. КОЗЛОВСКАЯ, Е. Д. АНИСКИН,
А. Н. КУЛАГИН, М. Ю. КЛИМОВА, Э. А. МОИСЕЕВ, П. А. КОНСТАНТИНОВ,
Г. М. БОЧКО, О. Б. ЧИМИРОВ

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Биологическое моделирование процессов клеточного иммунитета было осуществлено еще в прошлом столетии И. И. Мечниковым путем сравнительного изучения акта пищеварения у простейших одноклеточных и явления фагоцитоза у клеток высших организмов. В настоящее время, в связи с огромным достижением молекулярной биологии в области изучения механизмов регуляции процессов биосинтеза и распада веществ в клетке, возможности для дальнейшей разработки общебиологической концепции моделирования защитных клеточных реакций по Мечникову значительно расширились. Это касается прежде всего проблемы резистентности клеток как одного из возможных направлений изучения эволюции иммуногенеза.

Сопrotивляемость клеток различных биологических форм к воздействию чужеродных факторов инфекционной и неинфекционной природы обусловлена генетически контролируемыми механизмами, выработанными в процессе их исторического развития в результате постоянной конкуренции живых систем. Несмотря на большое многообразие имеющих форм проявления клеточной резистентности наследственного типа, в основе ее лежат, повидимому, общие закономерности регуляции биохимических процессов, осуществляемые посредством индукции, ретроингибирования и механизма обратной связи (13, 20, 2).

Неотъемлемым компонентом этой регуляторной системы являются, как известно, ферменты и их репрессоры (полипептиды блокирующего действия), обладающие высокой степенью стереоспецифичности в их реакциях с субстратными молекулами. Антиген в этом отношении ведет себя подобно субстрату фермента: индуцируя *de novo* синтез специфических γ -глобулинов, антиген вступает с ними в иммунологические реакции. Исходя из общепринятых представлений относительно регуляции синтеза биополимеров и, в частности, белков, посредством

индукции и ретронингибирования, некоторыми авторами были выдвинуты теоретические положения с попыткой объяснения основных фактов образования антител (24), а также их возможных предшественников (4, 9) в эволюционном аспекте.

Изучение природы индуцируемого синтеза ферментов, по сути дела, порождает те же проблемы, что и вопросы регуляции антителогенеза. Это дает основание для постановки рекогносцировочных экспериментов, связанных с изучением проблемы резистентности клеток и некоторых вопросов иммунитета (в общебиологическом аспекте).

Одним из таких направлений может служить поиск структурных аналогов различных субстратов ферментов или промежуточных продуктов их расщепления, обладающих свойством специфического индуктора синтеза определенных биополимеров.

В Научно-исследовательской лаборатории экспериментальной иммунобиологии АМН СССР и на кафедре химии Московского физико-технического института накоплен большой опыт по искусственному созданию субстратов — индукторов, способных дерепрессировать участки считывания генетической информации синтеза ферментов или других белковых молекул, вступающих в специфический комплекс с субстратом. В отличие от естественных субстратов-индукторов, которые под влиянием адаптивных ферментов расщепляются до конечных продуктов или инактивируются, их искусственные структурные аналоги могут быть весьма стойкими к действию ферментов. Индукторы подобного рода, в частности, производные галактозидов (бензил-тио-β, Д-галактозид; аллил-тио-β, Д-галактозид; тенил-тио-β, Д-галактозид и др.), были синтезированы И. Н. Волковым и П. А. Константиновым.

Результаты исследований этих соединений, проведенные с *E. coli* 200 PS/Flac, показали, что степень индуцируемого синтеза β-галактозидазы зависит от структуры агликонового компонента используемых индукторов (1, 5), что представляет большой интерес с точки зрения подхода к управлению механизмами регуляции синтеза биополимеров, в том числе и образования антител.

Об этом свидетельствуют и данные о возможности влияния на индуцируемый синтез ферментов или других биополимеров белковой природы некоторых гормонов на уровне клетки. При изучении влияния виадрила, гидрокортизона, адресона и АКТГ на синтез β-галактозидазы, индуцируемой указанными выше галактозидами, было установлено, что гормоны в зависимости от дозы способны стимулировать или угнетать синтез фермента у бактерий *E. coli* 200 PS/Flac (3).

Многие антибиотики так же, как и производные галактозы, (тио-галактоиды) и другие субстраты, способны индуцировать синтез ферментов, которые, вступая в реакцию с соответствующими индукторами (антибиотиками), переводят их в неактивное состояние (21, 11). Одним из этих механизмов обуславливается резистентность микробной клетки к некоторым лекарственным препаратам. В частности, известно, что фермент хлорамфениколацетилтрансфераза, индуцируемый хлорамфениколом, инактивирует антибиотик путем превращения его гидроксиль-

ного радикала на примыкающем 1 и 3 углеродных атомах пропандиоловой цепи в 3-ацетокси- или в 1,3-диацетоксихлорамфеникол.

В процессе комплексного изучения проблемы резистентности бактерий к лекарственным препаратам проф. Волковым М. Н. и доц. Константиновым П. А. был синтезирован структурный аналог левомицетина, в пропандиоловой цепи которого были устранены гидроксильные радикалы с образованием двойной связи между атомами углерода во 2 и 3 положении. Такое производное левомицетина, вызывая индукцию синтеза хлорамфениколацетилтрансферазы, оказалось стойким к ацетилирующему действию этого фермента.

Выделенные из микроорганизмов стероидоподобные вещества способны повышать резистентность бактерий к некоторым антибиотикам (23), возможно, вследствие их стимулирующего действия на синтез адантивного фермента, обуславливающего антибиотикорезистентность микробной клетки.

Таким образом, структурные аналоги левомицетина и других антибиотиков, так же как и тиогалактозиды, специфически взаимодействуя с аллостерическими белками-репрессорами, вызывают дерепрессию участков считывания генетической информации синтеза определенных биополимеров, регулируемого посредством механизма обратной связи.

Репрессоры как продукты генов-регуляторов принимают непосредственное участие и в других более сложных субстрат-ферментных реактивных системах. Как установлено, процесс регуляции защитных реакций посредством индукции, ретронингибирования и механизма обратной связи может распространяться и на систему вирус-клетка. Так, на примере лизогенизации микробной клетки умеренным бактериофагом показано, что специфический репрессор (22), синтез которого детерминирован «С»-областью фагового генома, подавляет вегетативное развитие бактериофагов. Лизогенная бактерия иммунна к повторной инфекции тем же фагом. Это явление в известной мере можно рассматривать как аналог клеточного иммунитета, где репрессор выступает в роли антивирусного белка, способного блокировать внутриклеточное развитие умеренного бактериофага на уровне транскрипции генов фаговой ДНК (16).

Система вирус—соматическая клетка животных или человека в ответ на внедрение вибриона способна к выработке низкомолекулярного белка — интерферона (15), который, в свою очередь, индуцирует синтез антивирусного белка, контролируемого клеточным геномом. Механизм действия антивирусного белка, согласно имеющимся данным, связан с подавлением синтеза ферментов нуклеинового комплекса, необходимых для репродукции вируса (19, 14, 18).

Не исключено, что и у бактерий может иметь место подобное звено противовирусных защитных реакций, контролируемых геномом микробной клетки. Так, результаты наших исследований показали, что воздействие на культуру клеток *E. coli* Сф-14 (λ) за 30—60 минут до заражения их вирулентным T_2 -бактериофагом приводило почти к полной блокаде развития бактериального вируса. Обработка бактерий интерфероном в тех же условиях, до заражения их умеренным бакте-

риофагом лямбда, увеличивала частоту лизогенизации. Однако, применение интерферона в момент заражения бактерий или после фаговой инфекции оказалось неэффективным (6, 8).

Таким образом, анализ приведенных данных литературы и фактического материала наших исследований свидетельствует, что репрессоры как белки блокирующего действия играют определенную роль в механизмах защитных реакций клеток, их сопротивляемости к факторам инфекционной и неинфекционной природы. В этом смысле механизм защитных реакций клетки посредством индукции и ретроингибирования можно рассматривать как молекулярногенетическую основу эволюции адаптивного иммунитета, а репрессоры, белки блокирующего действия — как предшественники антител.

Последующее изучение этого вопроса на уровне клеток высших организмов является исключительно перспективным. В настоящее время в Научно-исследовательской лаборатории экспериментальной иммунобиологии АМН СССР удалось получить варианты культур соматических клеток человека линии CaVe, Hep-2, HeLa, резистентные к цитотоксическому действию иммунных гамма-глобулинов, некоторым химическим соединениям аминотиоловой группы (7), а также к высоким концентрациям пенициллина (свыше 10 000 мкг/мл), при которых интактная культура клеток (линии CaVe) полностью погибала. Резистентность соматических клеток высших организмов к различным воздействиям, возможно, обеспечивается механизмами, основанными на том же принципе регуляции адаптивного синтеза специфических биополимеров, что и в случае устойчивости микроорганизмов. В пользу этого аргумента могут служить данные о возможности индукции или репрессии синтеза некоторых ферментов у соматических клеток в культуре путем специфических изменений условий их культивирования (10, 25) или введения в среду субстратных ингредиентов (12, 17). Сравнительные исследования механизмов резистентности и клеточного иммунитета к воздействующим факторам с использованием живых систем различных уровней биологической организации, в том числе и клеточных элементов системы РЭС организма, значительно углубят наше представление об эволюции специализированной системы защитных реакций и антителогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронкова З. П. Исследование влияния вариантов индукторов синтеза β -галактозидазы на систему регуляции лактозного оперона *E. coli* K-12. Канд. диссерт. М., 1968.
2. Жуков - Вережников Н. Н. Теория генетической информации. Изд-во «Мысль», М., 1966.
3. Жуков - Вережников Н. Н., А. В. Сергеев, М. Ю. Климова, Р. Д. Сейфулла, А. И. Майский — ЖМЭИ, 11, 4, 1971.
4. Жуков - Вережников Н. Н. В кн.: Проблемы современной иммунобиологии. «Медицина», 16, 1971.
5. Козловская З. П., М. Ю. Климова, Э. М. Халилов. В кн.: Проблемы современной иммунобиологии. «Медицина», М., 1972, 60.

6. Колобов А. В., М. А. Губерниев, Н. И. Рыбаков, О. Б. Чимиров. — *Антибиотики*, 1, 67, 1971.
7. Кулагин А. Н., В. А. Козлов, В. И. Горшков. — *Бюлл. эксп. биол. мед.* 9, 53, 1971.
8. Моисеев Э. А., В. А. Кискина. В кн.: *Проблемы современной иммунологии*. «Медицина», М., 1972, 71.
9. Рохлин О. В. В кн.: *Имуногенетика*. «Медицина», М., 1971, с. 280.
10. Burkhalter A., M. Jones, B. Featherstone. — *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 96, 747, 1957.
11. Shaw W., D. Bentley, Z. Sauds. — *J. Bact.* 104, 3, 1095, 1970.
12. Cox R., C. McLeod. — *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 49, 504, 1963.
13. Jacob F., J. Monod. — *J. Mol. Biol.*, 3, 318, 1961.
14. Joklik W., T. Merigan. — *Proc. Natl. Acad. Sci., US* 56, 558, 1966.
15. Isaaks A., J. Lindenmann. — *Proc. Roy. Soc.*, 147, 258, 1957.
16. Isaaks L., N. Echols, W. Sly. — *J. Mol. Biol.*, 13, 963, 1965.
17. Lieberman I. — *Biol. Chem.*, 255, 883, 1957.
18. Marcus P., I. Salb — *Virology*, 30, 502, 1966.
19. Miner N., W. Ray, E. Simon. — *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 24, 264, 1966.
20. Mouod J. In: *Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitive State* (H. S. Lawrence, ed.), p. 628, Hoeber-Harper, New York, 1959.
21. Novick R. — *Fed. Proc.*, 26, 1, 29, 1967.
22. Ptashne M., N. Hopkins. — *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, 60, 1282, 1968.
23. Starr P. R., L. W. Parks — *J. Bact.* 83, 1042, 1962.
24. Szilard L. — *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 46, 277, 1960.
25. Weiss P. — *Principles of Development*, New York, 1939 — *Idem. Quart. Rev. Biol.*, 25, 177, 1950.

APPROACHES TO THE STUDY OF THE REGULATION OF ANTIBODY GENESIS IN MODEL SYSTEMS

N. I. Ribakov, M. N. Volkov, Z. P. Kozlovskaya, E. D. Aniskin, A. N. Koulagin, M. U. Klimov, E. A. Moyseyev, P. A. Konstantinov, G. M. Botchko, O. B. Tchimirou

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow, USSR

SUMMARY

Microbiologic test-objects and cultures of human cell might be used as experimental models in the study of primary mechanisms of regulation of synthesis of enzymes, conditioning the cell resistance to various factors. The repressors as components in the system of regulation of biopolymer synthesis in the cell, by means of induction, repression and the feedback mechanism, are considered by the authors as evolution precursors of antibodies.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДНК ЛЕЙКОЗНОЙ ТКАНИ КОРОВ

А. А. ПЕРЕЛАЗНЫЙ, М. А. ГУБЕРНИЕВ, К. Г. ЧАМОВА

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В настоящее время установлено, что в результате инфицирования животных или культур клеток онкогенными или лейкозогенными вирусами происходит трансформация клеток с появлением в них специфических тканевых антигенов, отличных от антигенов исходных генетически идентичных клеток.

В то же время вопрос о наличии специфических антигенов при спонтанных опухолях и лейкозах человека и животных требует своего окончательного решения.

Литературные источники свидетельствуют о том, что процесс малигнизации сопровождается определенными биохимическими изменениями во внутриклеточных процессах, приводящих к нарушениям в дезоксирибонуклеиновых кислотах.

Кроме того, имеющиеся экспериментальные данные (2, 3, 4) указывают на возможность обнаружения антител к ДНК в крови животных и людей, больных злокачественными новообразованиями, лейкозами и другими заболеваниями.

Подобного рода факты, повидимому, могут служить доказательством того, что в некоторых случаях ДНК может выступать в роли аутоантигена.

К настоящему времени имеются работы (6, 8, 10), указывающие на существование антигенных различий между лейкозной и нормальной тканями человека и животных. При этом природа специфических лейкозных антигенов остается невыясненной.

С этой точки зрения представляет несомненный интерес изучение специфичности нуклеиновых кислот при неопластических процессах.

Важное место в решении этих вопросов принадлежит иммунологическим методам, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью реакции антиген-антитело.

В настоящем исследовании мы поставили своей целью изучить иммунологическую специфичность ДНК лейкозной ткани крупного рогатого скота.

В работе использовали препараты ДНК из ткани селезенки коров, больных лейкозом (миелоидная форма) и из гомологичных и гетерологичных нормальных тканей. Выбор нами в качестве объекта исследования крупного рогатого скота, больного миелолейкозом, основывался на следующем:

1. Лейкоз коров по своей клинической картине и многим гематологическим и патоморфологическим признакам является моделью лейкоза человека (1).

2. Известно, что при хронической форме миелолейкоза у людей обнаруживаются специфические изменения в 21-ой паре хромосом (9).

Препараты ДНК выделяли из ДНП сочетанием методов Севага и Кирби, модифицированного Георгиевым (7).

Всего было получено и использовано в опытах 46 препаратов тканевой ДНК. Все препараты детально анализировали физико-химически.

Для получения анти-ДНК-сывороток проводили внутривенную иммунизацию кроликов полимерными препаратами нативной ДНК из нормальных и лейкозных тканей. В опытах использовали 65 анти-ДНК-лейкозных и 88 анти-ДНК-нормальных сывороток.

Иммунологический анализ препаратов ДНК и антисывороток проводили с помощью количественной РСК по 50% гемолизу, реакции преципитации в геле по Оухтерлони и РПГА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные физико-химического анализа показали, что использованные нами препараты ДНК были депротенизированными (количество белка — 0,2—3%), нативными (ϵP — 6140—6600, R_{E270} — 0,5—0,59) и высокополимерными (мол. вес — 8,0—13,5 $\times 10^6$). Для очистки препаратов ДНК от примесей РНК применяли обработку их РНК-азой, а для освобождения от полисахаридов использовали химические методы и гельфильтрацию на Сефадексе G-200.

Сравнительный анализ физико-химических свойств ДНК, выделенных из органов здоровых коров и больных лейкозом, не дал каких-либо различий по большинству использованных тестов за исключением гиперхромного эффекта, где наблюдалось занижение гиперхромизма у препаратов ДНК лейкозной ткани (ДНК нормальной ткани — 1,36, ДНК лейкозной ткани — 1,28).

Хроматографический анализ нуклеотидного состава препаратов ДНК нормальных и лейкозных органов также не дал достоверных различий между ними.

Серологическое исследование иммунных сывороток в трех реакциях (количественная РСК, реакция преципитации и РПГА) показало, что указанные сыворотки содержат только комплементсвязывающие антитела.

Изучение природы комплементсвязывающих антител к ДНК методом гель-фильтрации на Сефадексе G-200 позволило установить, что они являются γ -М-глобулинами.

О специфичности взаимодействия ДНК-антитело судили по результатам реакции при использовании в качестве тест-антигена термоденатурированных ДНК, а также препаратов обработанных ДНК-азой. В первом случае наблюдали увеличение серологической активности ДНК, во-втором — отсутствие последней.

Кроме того, видонеспецифичность ДНК из различных источников также указывает на наличие антител к ДНК в анти-ДНК-сыворотках.

В перекрестных опытах с использованием анти-ДНК-лейкозных и анти-ДНК-нормальных сывороток, а в качестве тест-антигенов — ДНК лейкозной и гомологичной нормальной ткани, была выявлена иммунологическая специфичность не только у препаратов нативной ДНК лейкозной ткани, но она сохранялась и у термоденатурированных препаратов ДНК, реагирующих с антисыворотками в более высоких титрах, чем нативные препараты (Таблица 1).

Т а б л и ц а 1

РСК анти-ДНК-нормальных и лейкозных сывороток в перекрестных опытах с соответствующими нативными и денатурированными препаратами ДНК

Антисыворотки к ДНК	№№ сывороток	Нативная ДНК селезенки коров		Денатурированная ДНК селезенки коров	
		нормальной	лейкозной	нормальной	лейкозной
Лейкозной селезенки	7	нет	1 : 80	1 : 20	1 : 320
	11	1 : 10	1 : 160	1 : 40	1 : 640
	109	1 : 10	1 : 40	1 : 80	1 : 320
Нормальной селезенки	27	1 : 40	нет	1 : 160	1 : 40
	59	1 : 40	1 : 10	1 : 160	1 : 40
	73	1 : 80	1 : 20	1 : 320	1 : 80

Обнаруженная иммунологическая специфичность у ДНК лейкозной ткани была показана и в опытах по истощению анти-ДНК-лейкозных сывороток препаратами ДНК нормальных гомологичных органов (рис. 1).

Далее, используя препараты ДНК с разным содержанием белка, а также после дополнительной очистки их от примесей РНК и полисахаридов, было установлено неучастие указанных примесей в проявлении серологической активности препаратов ДНК.

Таким образом, в перекрестных опытах в количественной РСК и в опытах по истощению анти-ДНК-лейкозных сывороток был обнаружен факт иммунологической специфичности ДНК лейкозной селезенки коров.

Сохранение иммунологической специфичности у препаратов ДНК после их термоденатурации свидетельствует о том, что указанная специфичность, по-видимому, обусловлена изменениями в однонитевой структуре молекулы ДНК.

Наличие иммунологической специфичности у препаратов ДНК при лейкозах открывает перспективу для решения вопроса о природе специфических антигенов при неопластических процессах, а также позволяет подойти к расшифровке некоторых сторон патогенеза лейкозов и роли в нем ДНК. Кроме того, обнаружение различий в иммунологических свойствах между ДНК лейкозных и гомологичных нормальных органов позволяет надеяться на использование в дальнейшем высокочувствительных иммунологических методов для ранней прижизненной диагностики лейкозов у животных и человека.

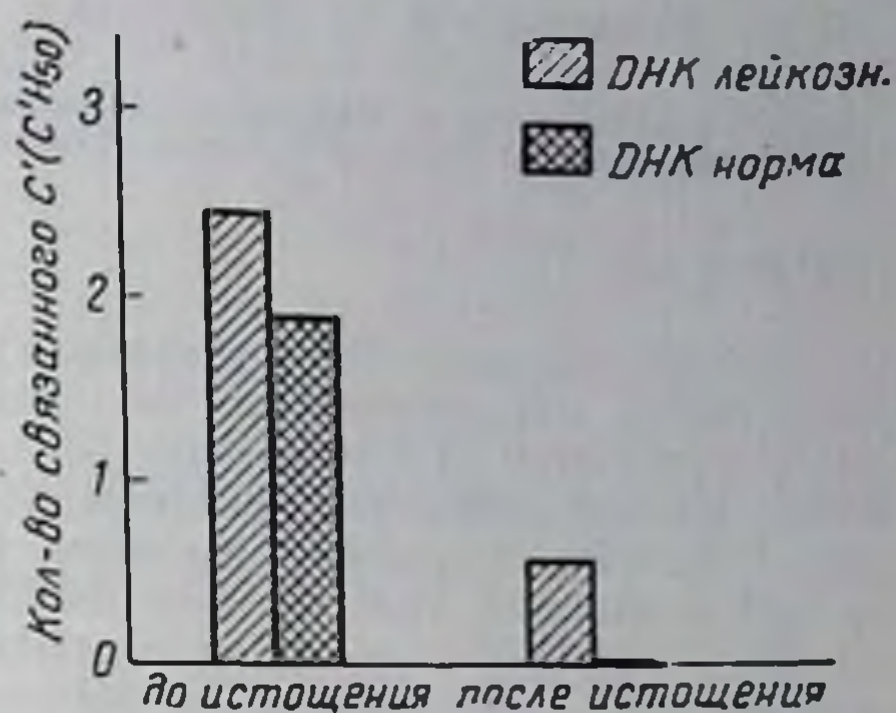


Рис. 1. РСК с анти-ДНК-лейкозными сыворотками до и после истощения препаратами ДНК гомологичной нормальной ткани.

На оси абсцисс — результаты взаимодействия анти-ДНК-лейкозных сывороток с препаратами ДНК лейкозной и нормальной ткани до и после истощения; на оси ординат — количество связанного компонента в 50% единицах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бергольц В. М., Н. В. Румянцев. Сравнительная патология и этиология лейкоза человека и животных. М., Медицина, 1966.
2. Бордюшков Ю. Н., И. А. Косаревская, М. И. Левин. *Бюлл. exper. биол. мед.*, 1967, 10, 74.
3. Демин А. А., В. А. Колаев, И. В. Константинов. В сб.: *Соврем. пробл. гематол. и перелив. крови*. Вып. 38, М., Медицина, 1966, 51.
4. Зильбер Л. А., К. В. Ильин, И. Н. Крюкова. В сб.: *Вирусы в онкологии*. Рига, Зинатне, 1966, 181.
5. Парнес В. А. *Иммунология лейкоза*. М., Медгиз, 1960.
6. Перелазный А. А. Тезисы докладов конф. ИЭБ АМН СССР, М., 1968, 138.
7. Георгиев Г. П. *Биохимия*, 1959, 24, 3, 472—480.
8. Hyde R., S. Garb, A. Bennet. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 1967, 38, 909.
9. Nowell P., D. Hungerford. — *Science*, 1960, 132, No. 3438, 1496.
10. Vulchanov V. H. — *Z. Immunitätsforsch.*, 1964, 127, 436.

IMMUNOLOGIC SPECIFICITY OF DNA ISOLATED FROM COW'S LEUKEMIC TISSUES

A. A. Perelazny, M. A. Guberniyev, K. G. Tchamova

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

A high-polymeric DNA preparation, purified of admixed proteins, RNA or polysaccharides, was isolated from the organs of healthy and of leukemic cows. As a result of immunization of rabbits with DNA preparations (obtained from normal and leukemic tissues) anti-DNA antibodies, detectable by 50% hemolysis complement fixation test, were formed in the rabbits' sera. Further, by the method of gel-filtration it was found out, that these antibodies are localized in the γ -M-globulin fraction.

In cross experiments using quantitative complement fixation, as well as in experiments with exhaustion of the antileukemic-DNA sera by DNA-preparation of normal tissues, the immunologic specificity of leukemic cow's spleen DNA was demonstrated. It is proved, that the immunologic specificity of leukemic DNA is characteristic not only to the intact DNA molecule, but to heat-denaturated one as well.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННОЙ ОБЩНОСТИ МЕЖДУ ЯИЧКОМ И ОКОЛОУШНОЙ ЖЕЛЕЗОЙ ЧЕЛОВЕКА

В. Х. ВЫЛЧАНОВ и И. Р. КЕХАПОВ

Лаборатория клеточной иммунологии Института зоологии
Болгарской академии наук, София, Болгария

Проведенные за последние десятилетия исследования антигенного состава органов на лабораторных животных и у человека показали, что степень антигенной общности (родства, близости) различных тканей и органов имеет существенное значение для распространения и локализации инфекционного процесса в организме (2, 4, 5, 6, 9, 15), а также играет, вероятно, определенную роль в метастазировании злокачественных новообразований (7, 8, 10).

С точки зрения клеточной иммунологии весьма интересным является известный в клинической практике факт, что эпидемический паротит у половозрелых мужчин в более 20% случаев (а в тяжелых формах процент еще выше) осложняется орхитом, который может вызвать серьезные последствия и привести к бесплодию. Как известно, в редких случаях у женщин паротит осложняется сальпингоофоритом, острым вульвовагинитом, бартолинитом и маститом. Важно учитывать при этом, что наряду с постпаротитным орхитом часто выявляются нарушения центральной нервной системы, при которых обнаружены участки демиелинизации головного мозга, что характерно для паротитного менингоэнцефалита.

Причины постпаротитного нарушения яичка, соотв. яичника и реже мозга не выяснены, а предположения о вероятной иммунологической обусловленности этих осложнений не были предметом изучения. Некоторые данные наших предварительных исследований с целью выяснения этого вопроса и являются предметом настоящей статьи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Антисыворотки для проведения анализа антигенных взаимоотношений между околоушной железой и яичком человека были получены путем иммунизации кроликов солевыми экстрактами этих органов,

взятых от одного трупа. Содержание белка в антигенах определяли на рефрактометре; для иммунизации использовали 0,01 г/мл белка в антигене. Иммунизацию кроликов проводили по следующей схеме: I инъекция — внутримышечно по 1,0 мл соответствующего антигена (околоушная железа и яичко) вместе с полным адьювантом Фрейнда; через 10 дней — II, III, IV инъекции внутривенно по 1,5 мл антигена с интервалом в 7 дней. На десятый день после последнего введения антигена — тотальное обескровление. Антисыворотки сохраняли при -20°C .

Титр и специфичность полученных антисывороток исследовали в реакциях связывания комплемента (РСК), двойной иммунодиффузии в агаровом геле по Ухтерлони и иммуноэлектрофореза в агаровом геле по Грабару. Антисыворотки исследовали в нативном состоянии (только инактивированные в течении 30 минут при 56°C) и после абсорбции тканями лиофилизированной печени, соответственно с гомогенатом яичка. Определяли их специфичность, используя в качестве антигенов экстракты яичка, околоушной железы, мозга, легкого, щитовидной железы, селезенки и печени, взятые от того же трупа, а также экстракт яичника, взятого от женского трупа. В качестве контроля использовали и соответствующие нормальные (взятые до иммунизации) сыворотки кроликов. Детально схема иммунизации, способы приготовления антигенов и использованные иммунологические тесты сообщаются в других наших публикациях (1, 3, 4, 5, 11, 13).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований сводятся к следующему: В таблице 1 представлены данные, полученные при изучении в РСК иммунных сывороток к тканям тестиса и околоушной железы. Как видно из этой таблицы, неабсорбированная антисыворотка к тканям околоушной железы реагирует с антигеном из ткани околоушной железы в титре 1 : 256, несколько слабее реагирует эта сыворотка с антигенами из яичка и легкого (титр 1 : 128). Еще более низкие титры получены с экстрактами мозга, яичника, почки, щитовидной железы, селезенки (1 : 32) и печени (1 : 16). После абсорбции лиофилизированной печенью эта антисыворотка продолжала реагировать с антигеном околоушной железы в титре 1 : 64 и с антигеном из яичка в титре 1 : 32, очень слабая реакция отмечена с антигенами из ткани легкого (1 : 16), мозга (1 : 8), почки (1 : 2), а реакция с антигенами из щитовидной железы, селезенки и печени была отрицательной. При абсорбции той же самой сыворотки тканью яичка было выявлено, что сыворотка продолжает реагировать с экстрактом околоушной железы (1 : 32) и очень слабо реагирует с экстрактом яичника (1 : 2), и не дает реакции с антигеном яичка и других органов.

Вместе с тем неабсорбированная антисыворотка к ткани тестиса реагировала в одинаковом титре (1 : 256) с антигенами яичка, легкого и почки, а титры антител в отношении антигенов околоушной железы яичника, мозга и щитовидной железы составляют 1 : 64, еще более

низкие титры были в отношении селезенки — 1 : 32 и печени — 1 : 16. После абсорбции лиофилизированной печенью в этой сыворотке остаются антитела к ткани яичка (1 : 32), околоушной железы (1 : 16),

Т а б л и ц а 1

Данные реакции связывания компонента

Антиген \ Антисыворотки	Околоушная железа	Яичко	Яичник	Мозг	Легкое	Почка	Щитовидная железа	Селезенка	Печень
Антипаротисная									
нативная	1 : 256	1 : 128	1 : 32	1 : 32	1 : 128	1 : 32	1 : 32	1 : 32	1 : 16
абсорбированная* тканью печени	1 : 64	1 : 32	1 : 2	1 : 8	1 : 16	1 : 2	0	0	0
абсорбированная** тканью яичка	1 : 32	0	1 : 2	0	0	0	0	0	0
Антитестисная									
нативная	1 : 64	1 : 256	1 : 64	1 : 64	1 : 256	1 : 256	1 : 64	1 : 32	1 : 16
абсорбированная* тканью печени	1 : 16	1 : 32	1 : 2	1 : 8	1 : 8	1 : 8	0	0	0
абсорбированная** тканью яичка	1 : 2	0	0	0	0	0	0	0	0

* лиофилизат (печеночный порошок)

** осажденный гомогенат яичка

мозга, легкого и почка (1 : 8) и яичника (1 : 2), а после абсорбции тканями яичка — только антитела против околоушной железы в очень низком титре (1 : 2).

При применении иммунодиффузионной техники многократное изучение этих сывороток и антигенов показало, что в антисыворотке против околоушной железы обнаруживаются антитела против 4—5 антигенов (выявленные в 4—5 преципитационных полосах), один из которых является общим только для околоушной железы и яичка (рис. 1а), а другой — для околоушной железы, яичка и остальных изучаемых органов (фиг. 1б, 2а, б, 3а, б). Специфичные только для околоушной железы 2 (или 3) преципитационные полосы образует перекрест с антигенами других органов и, очевидно, являются антигенами органного типа (см. полосы против лунок 2 и 5 на рис. 1б, 2а, б и 3а, б). Абсорбированная печенью антисыворотка к околоушной железе дает с антигеном из околоушной железы 3 полосы, а с антигенами остальных органов в этих условиях не образуются преципитационные полосы (рис. 5а, лунки 2, 5 и 3, б). Абсорбция тканью яичка приводит к полному извлечению антител к тестису из антисыворотки к околоушной железе,

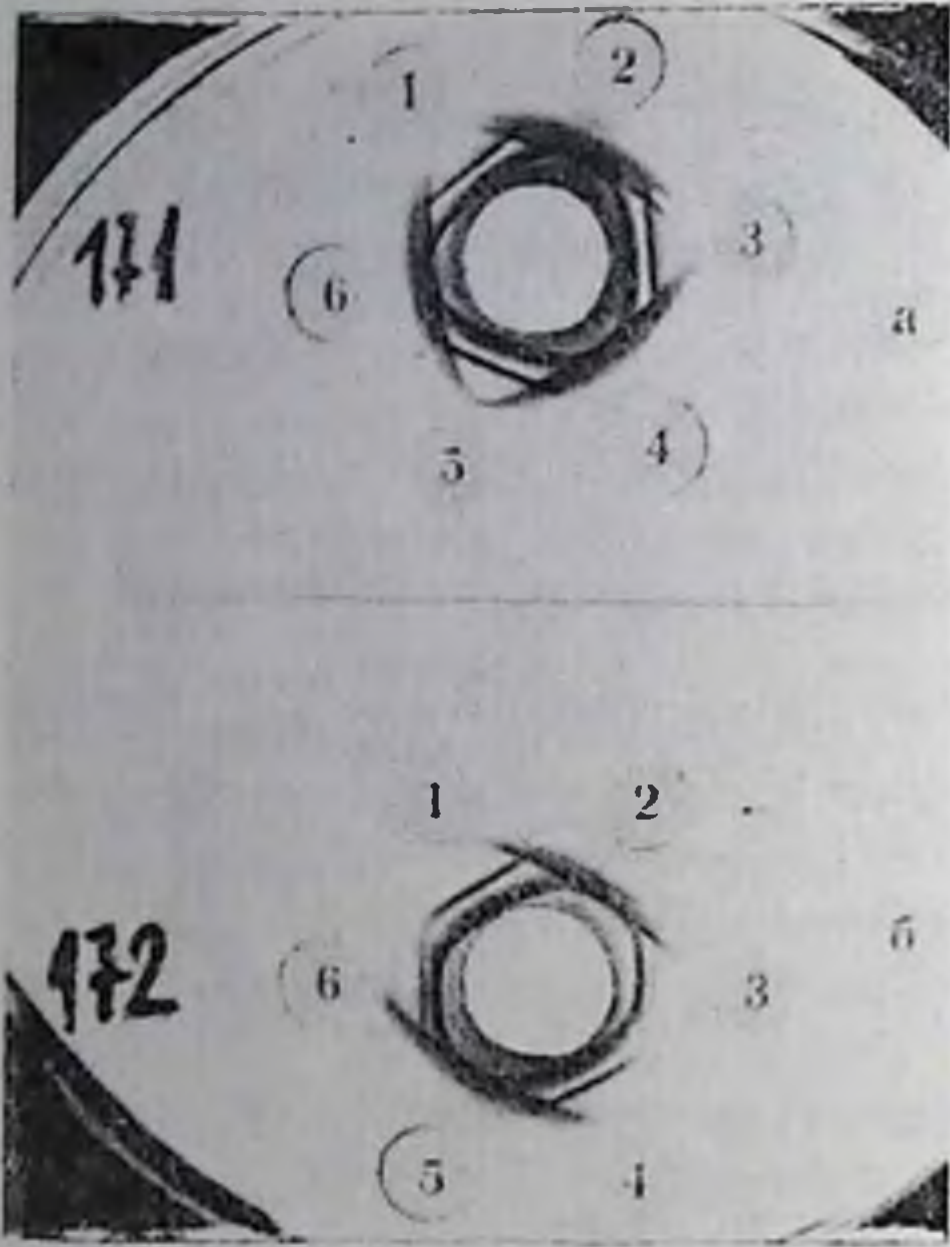


Рис. 1. Центральные лунки:
антипаротисная сыворотка
Периферические лунки:
а. 1, 3, 5 — яичко; 2, 4, 6 — околушная железа
б. 1, 4 — яичко; 2, 5 — околушная железа; 3, 6 — селезенка

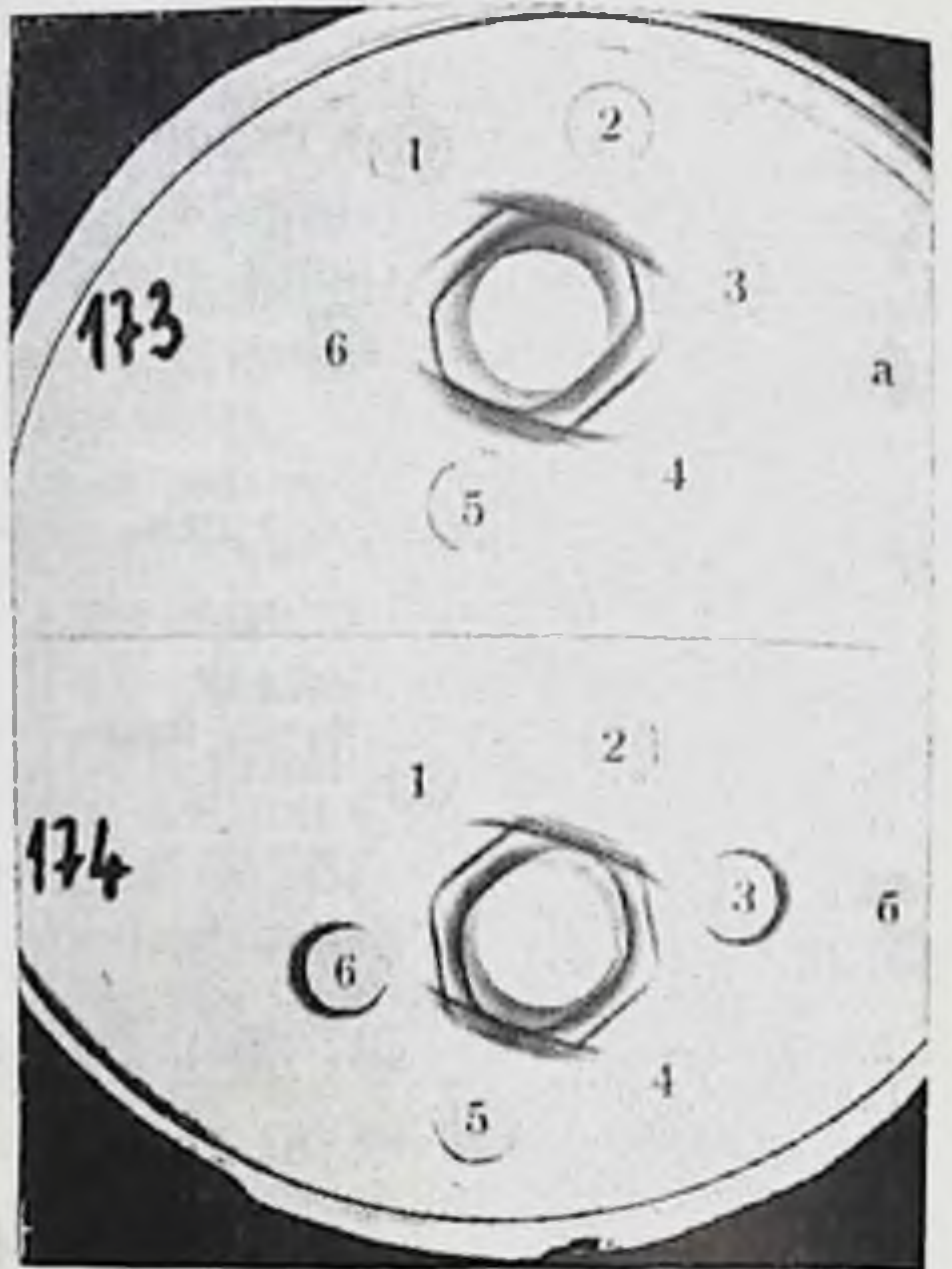


Рис. 2. Центральные лунки:
антипаротисная сыворотка
Периферические лунки:
а. 1, 4 — яичко; 2, 5 — околушная железа; 3, 6 — мозг
б. 1, 4 — яичко; 2, 5 — околушная железа; 3, 6 — щитовидная железа

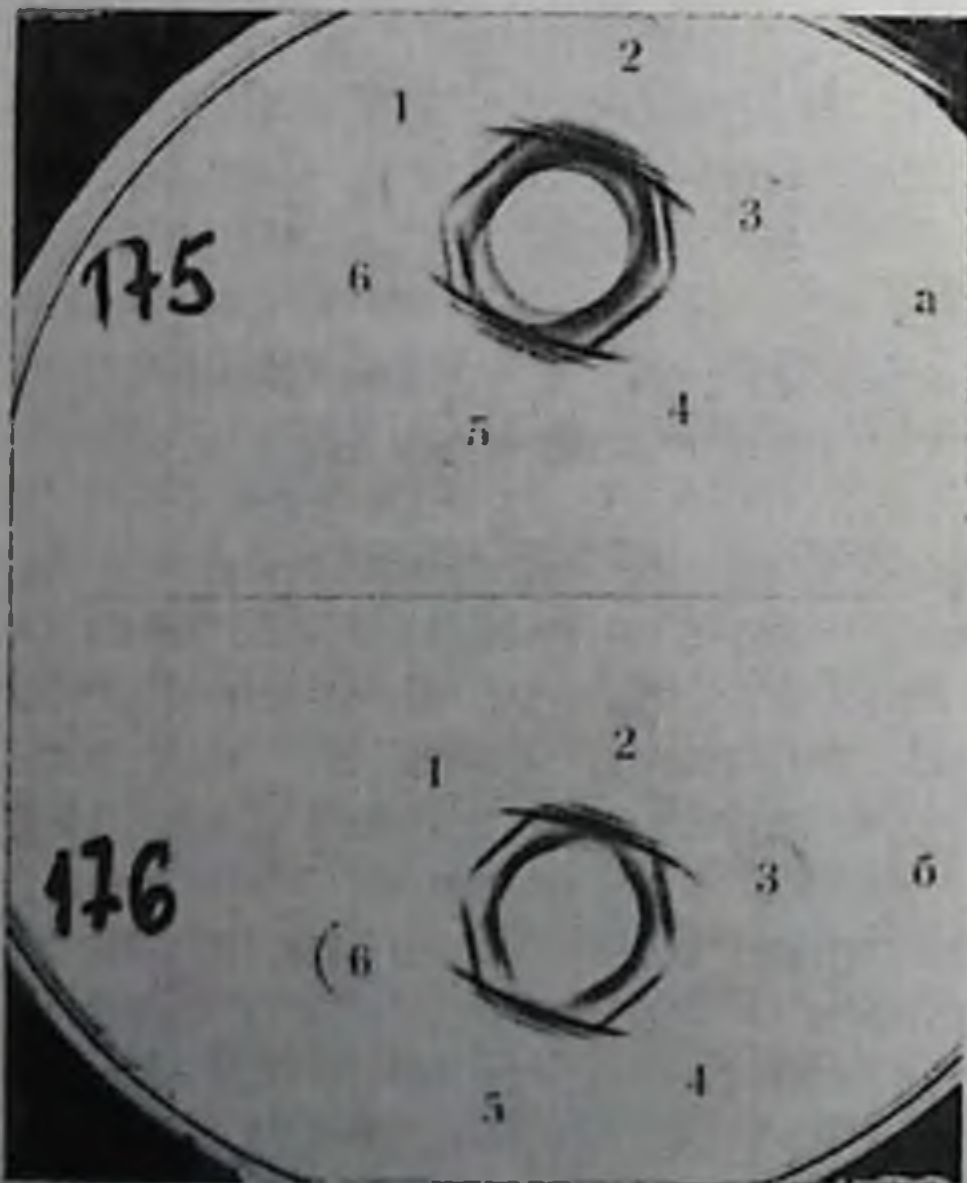


Рис. 3. Центральные лунки:
антипаротисная сыворотка
Периферические лунки:
а. 1, 4 — яичко
2, 5 — околушная железа
3, 6 — печень
б. 1, 4 — яичко
2, 5 — околушная железа
3, 6 — яичник

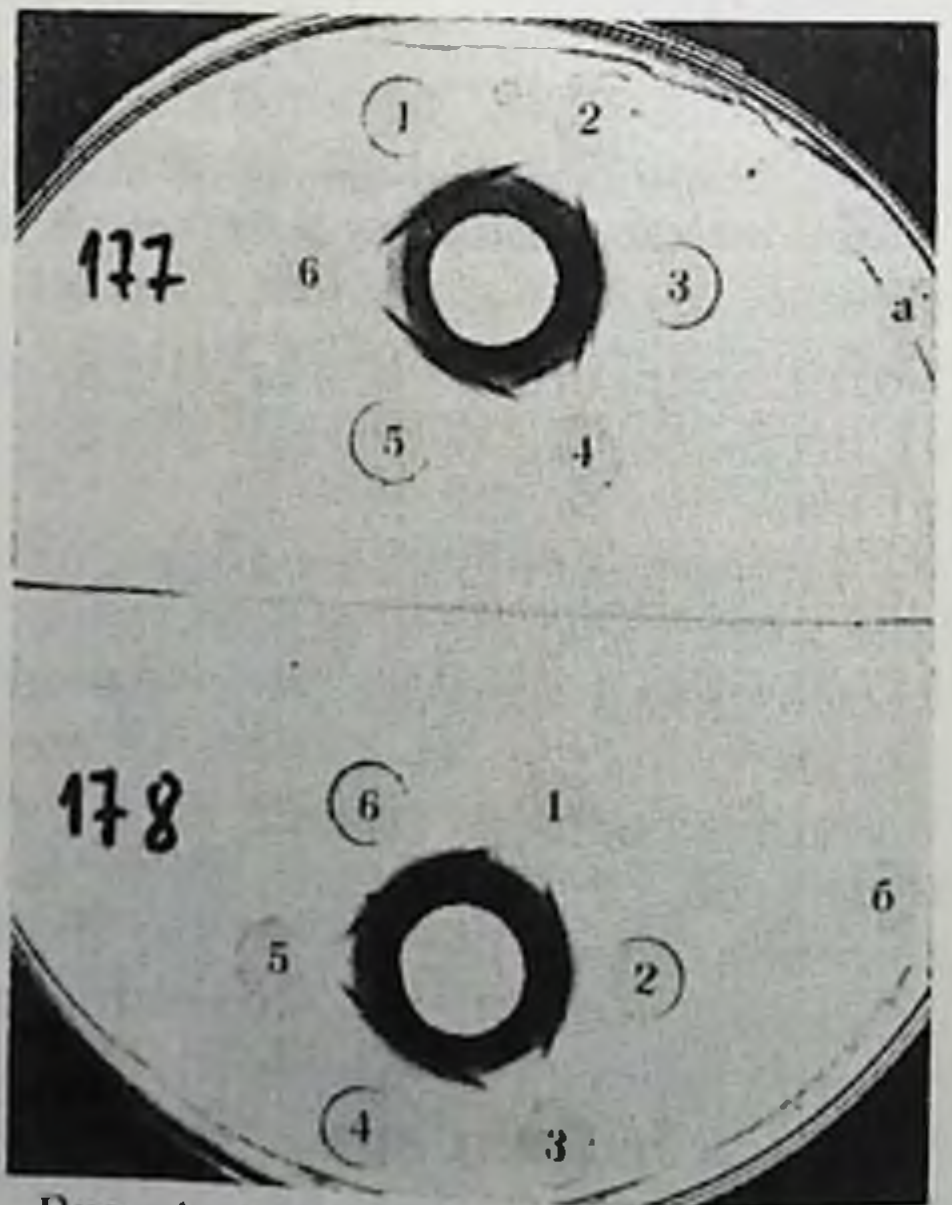


Рис. 4. а. Центральная лунка
антипаротисная сыворотка, обсорбированная печенью
Периферические лунки:
1, 3, 5 — яичко; 2, 4, 6 — околушная железа
б. Центральная лунка:
антипаротисная сыворотка, абсорбированная яичком.
Периферические лунки:
1, 3, 5 — яичко; 2, 4, 6 — околушная железа

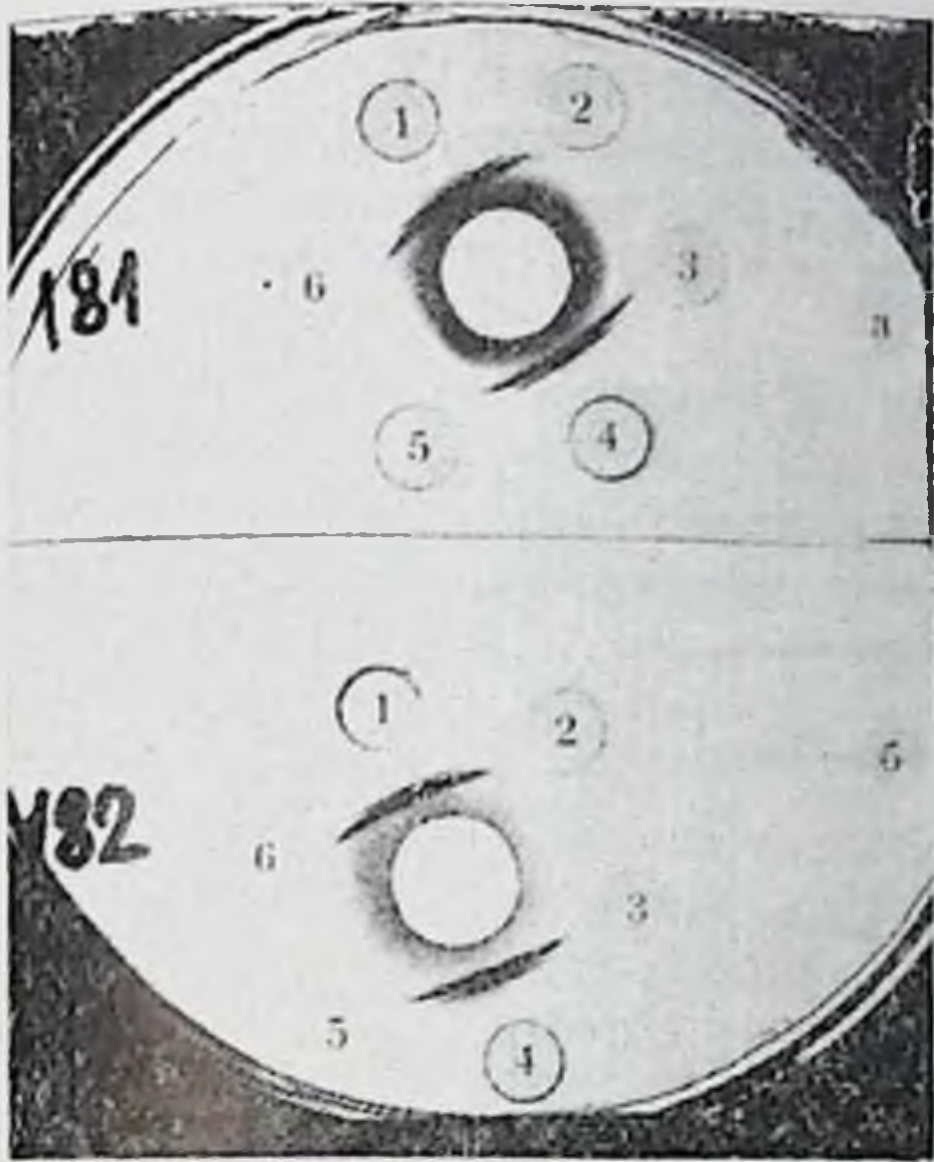


Рис. 5.

а. Центральная лунка:
антипаратическая сыворотка, абсорбированная печенью

Периферические лунки:

1, 4 — околоушная железа; 2, 5 — печень; 3, 6 — почка

б. Центральная лунка:
антипаратическая сыворотка, абсорбированная яичком

Периферические лунки:

1, 4 — околоушная железа; 2, 5 — печень
3, 6 — почка

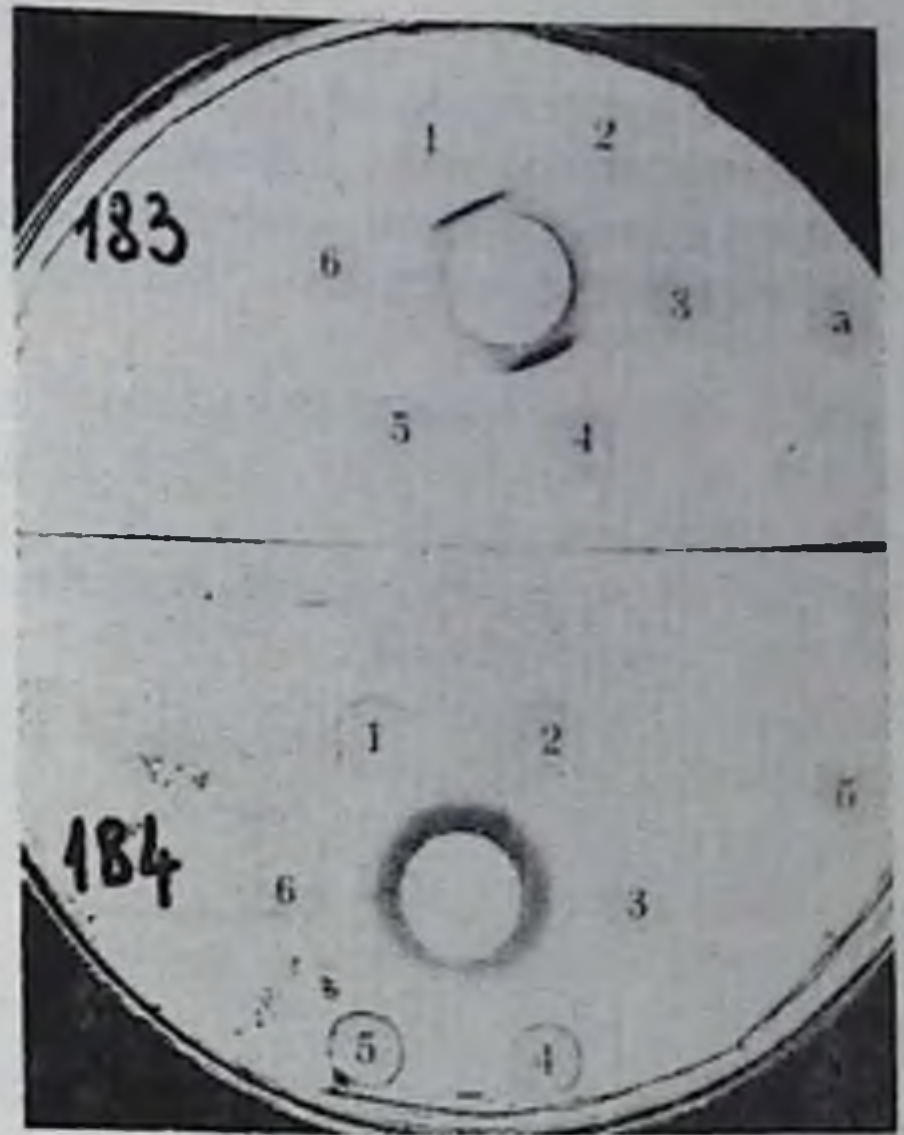


Рис. 6

а. Центральная лунка:
антигестическая сыворотка, абсорбированная печенью

Периферические лунки:

1, 4 — яичко; 2, 5 — печень; 3, 6 — почка

б. Центральная лунка:
антигестическая сыворотка, абсорбированная яичком

Периферические лунки:

1, 4 — яичко; 2, 5 — печень; 3, 6 — почка

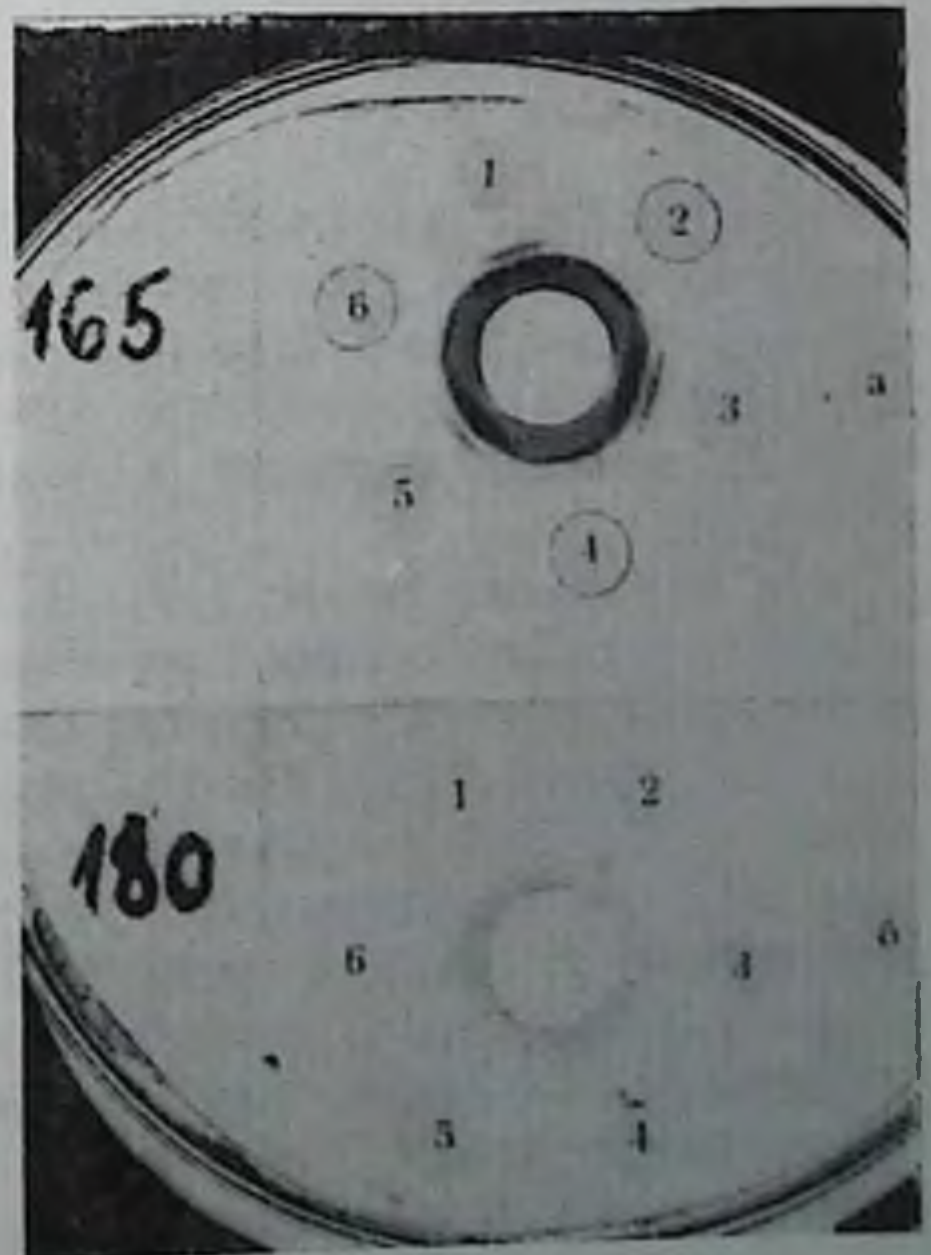


Рис. 7

а. Центральная лунка:
антигестическая сыворотка

Периферические лунки:

1, 3, 5 — яичко; 2, 4, 6 — околоушная железа

б. Центральная лунка:
антигестическая сыворотка, абсорбированная яичком

Периферические лунки:

1, 3, 5 — яичко; 2, 4, 6 — околоушная железа

т. е. антител против компонентов, общих для яичка и околоушной железы; на рис. 4б (лунки 1, 3, 5) и на рис. 5б (лунки 2, 5 и 3, 6) видны преципитационные полосы, отражающие наличие только антител к околоушной железе, что показывает, что эта сыворотка превратилась в моноспецифическую.

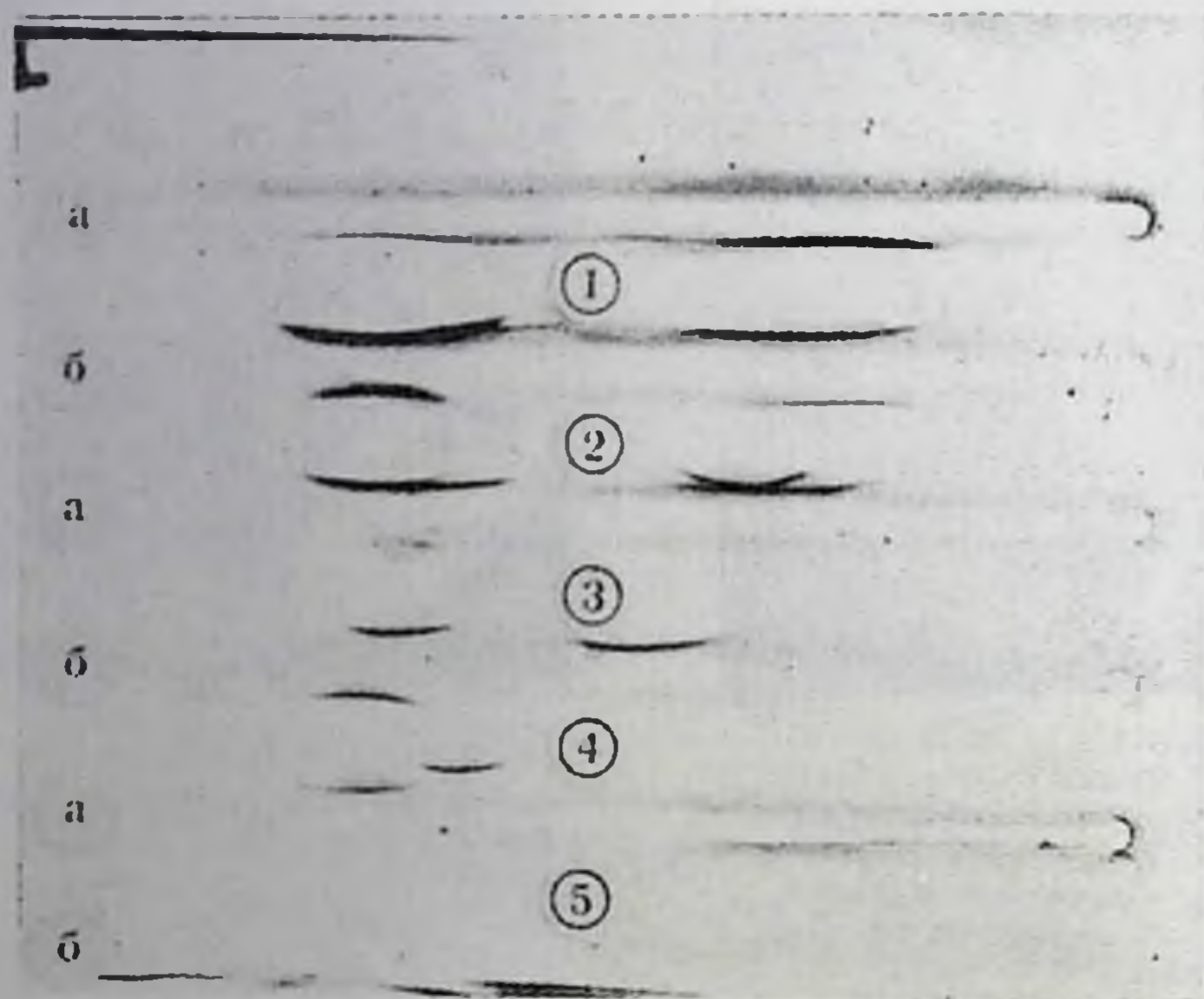


Рис. 8. Иммуноэлектрофорез

Стартовые лунки:

1 — яичко, 2 — околоушная железа, 3 — мозг, 4 — семенная плазма, 5 — сперматозонды

Траншеи:

а. антиларотическая сыворотка

б. антитестисная сыворотка

Неабсорбированная антисыворотка к тестису дает с антигеном из ткани яичка 3—4 преципитационные полосы, а с антигеном околоушной железы — 2 до 3 полосы; после абсорбции тканями печени остаются 2 полосы только с антигеном яичка (рис. 6 а, лунки 1, 4), а абсорбция тканью яичком приводит к полному извлечению всех антител (рис. 6 б, 7 б).

На основании этого (рис. 1—5) можно сделать заключение, что, кроме антигенов, общих с яичком, околоушная железа имеет по 1 (или 2) антигена, общих с антигенами селезенки (рис. 1 б, лунки 3, 6), мозга (рис. 2 б, лунки 3, 6), печени (рис. 3 а, лунки 3, 6) и яичника (рис. 3 б, лунки 3, 6). Эти результаты согласуются с данными наших предыдущих опытов, в которых было установлено наличие антигенов, общих для яичка, яичника и легкого (13, 14).

Результаты иммуноэлектрофоретических исследований показали следующее: антитела, содержащиеся в иммунной сыворотке к тканям околоушной железы, реагируют с антигеном из околоушной железы образованием 4 преципитационных дуг; реакция этой антисыворотки

с яичком дает 2 дуги, с семенной плазмой — 2 дуги, с сперматозоидами — 1 дугу и мозгом — 1 дугу. Содержащиеся в антитестикулярной сыворотке антитела реагируют с антигеном из яичка с образованием 3 преципитационных дуг, с околоушной железой образуют 1 (или 2) дуги, с семенной плазмой и сперматозоидами — 1 дугу и с мозгом 2 дуги (см. рис. 8).

Выявленная нами в РСК реакции иммунодиффузии в агаре и иммуноэлектрофорезе антигенная общность между околоушной железой и яичком человека согласуется с результатами Bevilacqua (1968), который обнаружил отчетливые гистопатологические изменения не только в околоушной железе, но и в яичке (соотв. в яичнике) крыс после введения здоровым животным иммунной сыворотки к тканям околоушной железы. С другой стороны, у крыс, которым вводили антисыворотку против гомологичной подчелюстной слюнной железы, этот же автор обнаружил изменения только в соответствующей слюнной железе, но не в яичках самцов (соотв. в яичниках самок). Подчеркивая специфичность цитотоксического действия сыворотки против околоушной железы, Bevilacqua высказал предположение о наличии взаимосвязи между околоушной железой и половыми железами крысы.

Представленные в настоящем сообщении результаты иммунологического анализа антигенов околоушной железы и яичника позволяют заключить о возможности иммунологической обусловленности наблюдаемых в клинике постпаротитных орхитов и энцефаломиелитов и раскрывают дальнейшие пути для изучения и других постпаротитных осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вълчанов, В. х. Фагоцитоза, атроцитоза и имуногенеза. С., БАН, 1966, 295.
2. Вълчанов, В. х. и В. Н. Василев. Върху възможността за възникване на автоантигенност при инфекция. — *Изв. Микробиол. инст. БАН*, 15, 1963, 115—127.
3. Вълчанов, В. х., В. Н. Василев и К. Обретенова. О роли инфекции в качестве индуктора аутоантигенности. В кн.: *IX междунар. конгресс по микробиологии*, 24—30 июля, 1966, Москва. Тезисы докладов. М., Медицина, 1966, 616.
4. Вълчанов, В. х. и Р. Попиванов. Автоантигенност и аутоимунизация. С., Мед. и физк., 1972, 272.
5. Кехайов, И. Р. Опити върху възможността за органолокализация на инфекциозния процес чрез въздействия с антиоргани серуми. Дисертация, С., Инст. микробиол. БАН, 1967, 114 с.
6. Кехайов, И. Р. и В. х. Вълчанов. Върху морфологичния аспект на имунологично индуцирана ренална туберкулоза у морски свинчета. — *Епидемиол., микробиол., инф. болести*, 6, 1969, 69—74.
7. Кривошеин, Ю. С. О некоторых иммунологических особенностях метастазирования экспериментальных опухолей и воздействиях на этот процесс. В кн.: *Конф. иммунобиологии злокач. новообразований. Тез. докл.*, М., 1965, 22—25.
8. Кривошеин, Ю. С. и И. Н. Майский. Влияние иммунизации гомологичными и гетерологичными антигенами на процесс метастазирования экспериментальных опухолей и воздействиях на этот процесс. В кн.: *Конф. иммунобиологии злокач. новообразований. Тез. докл.*, М., 1965, 16—21.
9. Левкова, Н. А. Роль органоантител в локализации патологического процесса. Киев, Здоров'я, 1968, 153.
10. Майский, И. Н., М. С. Ломакин и Ю. С. Кривошеин. Об иммунобиологических механизмах метастазирования злокачественных опухолей. — *Успехи совр. биол.*, 63, 1967, 1, 98—109.
11. Марков, В. Н., В. х. Вълчанов и В. Илиева. Изучвания за изясняване действието на невролизините върху механизмите на имунобиологичната защита. — *Изв. Инст. биол. «М. Попов» БАН*, 8, 1957, 277—290.
12. Veveřasová, R. — *Boll. Soc. ital. biol. sperim.*, 44, 833—835 (Цит. по Реф. ж. Биология, 53, *Общ. вопр. патол.*, 7, 1969, p. 151.
13. Hadjioloff, A. I., A. Samardjiev & V. H. Vulchanov. Oestrus retardation in guinea pigs induced by antibodies to homologous ovary in «isofollicle» stage. — *C. r. Acad. Bulg. Sci.*, 24, 1971, 985—987.
14. Kechayov, I. R. Utilization of the immunological tolerance for differentiation between the seminal plasma antigens and the testis antigens. — *C. r. Acad. Bulg. Sci.*, 24, 1971, 1097—1099.
15. Vorlaender, K. O. & H. Luchtrath. Versuche zur künstlichen Lokalisation eines Tuberkulösen Infektes auf die Rattenniere. — *Klin. Wschr.*, 34, 1956, 1069—1070.

STUDIES ON THE ANTIGENIC RELATIONS BETWEEN TESTIS AND GL. PAROTIS IN MAN

V. H. Vulchanov, I. R. Kehayov

Laboratory of Cellular Immunology, Institute of Zoology,
Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

S U M M A R Y

Rabbit antisera to human parotid gland and to testis have been prepared. These antisera have been cross-tested with saline extracts from the two relevant organs as well as with saline extracts from human brain, lung, thyroid gland, spleen, liver, ovary and kidney. The complement-fixation test, double agar-gel immunodiffusion and immunoelectrophoresis techniques were utilized. The results reveal a strongly expressed similarity of the antigenic properties of the parotid gland and the testis. A lesser degree of antigenic similarity between these two organs, and the ovary, the lung and the brain was established. On the basis of these data it is suggested, that orchitis, salpingoophoritis and encephalomyelitis. (all of the observed as complications in patients with parotitis) are probably immunologically conditioned.

К ВОПРОСУ АУТОСЕНСИБИЛИЗАЦИИ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ОЖОГАХ ГЛАЗ

Л. Ф. ЛАЗАРЕНКО, В. К. КОЗЛОВ, Н. Г. ЖУКОВ

НИИ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Экспериментальные и клинические наблюдения показали, что процесс приживления пересаженной роговицы по поводу бельма, возникших в результате тяжелых ожогов глаз, сопровождается интенсивной васкуляризацией, помутнением ее, а иногда и отторжением. По мнению Н. С. Шульгиной (1), причиной указанных изменений являются процессы аутоенсибилизации. Однако этот вопрос недостаточно изучен.

В связи с этим представлялось необходимым изучить развитие аллергической реактивности, возникающей при тяжелых ожогах глаз, на различных стадиях ожогового процесса.

Для этого нами проведены экспериментальные наблюдения на 97 морских свинок. У подопытных животных вызывались с помощью извести ожоги 3 степени. Ожогу подвергался один глаз. На 3-, 15-, 21- и 35-й дни после ожога исследовались анафилактические реакции, феномен Овери, внутрироговичная проба. Результаты проведенных наблюдений показали, что внутривенное введение морским свинкам антигена, приготовленного из собственной обожженной роговицы, на 21-й, день после ожога, не вызывало видимых признаков анафилактического шока.

Проба Овери у 16 морских свинок на 3-й день после ожога была отрицательной. На 15-й день после ожога у 2 из 10 реакция Овери — положительна. На 21- и 35-й дни реакция Овери была положительна уже у 24 морских свинок из 30.

Следовательно, ожог роговицы вызывает сенсibilизацию организма. При этом она наиболее выражена в более поздние сроки развития ожогового процесса.

Так как в обожженной роговице в результате денатурации белков возникают продукты аутолиза, то можно было предполагать, что появление положительных реакций Овери связано не с развитием сенсibilизации, а с раздражающим влиянием продуктов аутолиза на кожу.

С этой целью интактным морским свинкам внутрироговично вводился экстракт роговицы, взятой от обожженных морских свинок в

различные сроки после ожога. Экстракт вводился в дозе 0,5 мл. В этом объеме была экстрагирована одна роговица.

В 1-ой серии опытов (8 морских свинок) изучалась токсичность обожженной роговицы на 3-й день, во 2-ой серии (8 морских свинок) — на 15-й, в 3-ей серии (18 морских свинок) — на 35-й день после ожога. В контрольной серии (5 морских свинок) внутрироговично вводился экстракт нормальной роговицы в такой же дозе.

Наиболее интенсивные воспалительные явления керато-ирита отмечены у животных в первой серии опытов. У всех морских свинок воспалительный процесс наблюдался в течение 18—22 дней. Во 2-ой серии явления керато-ирита отмечены у 4 животных. При этом продолжительность воспалительного процесса уменьшалась до 10—12 дней. В 3-ей серии — только у 2 морских свинок отмечены явления керато-ирита, с длительностью воспалительного процесса в течение 10—12 дней. У контрольных животных воспалительных явлений не отмечалось.

Таким образом, токсические свойства обожженной роговицы наиболее резко выражены в ранние сроки после ожога, в то время как наиболее интенсивные кожные реакции, выявляемые с помощью пробы Овери, отмечались в более поздние сроки после ожога.

Следовательно, наблюдаемые положительные пробы Овери у обожженных морских свинок, не связаны с токсическими свойствами роговицы, а обусловлены развитием процесса аутоенсибилизации, который возникает в результате ожогов глаз.

ЛИТЕРАТУРА

Шульгина Н. С. Ожоги глаз. В кн.: «Труды 3-ей Всесоюзной конференции по пересадке тканей и органов». г. Ереван, 1963, 463—465.

AUTOSENSITIZATION IN SEVERE EYE BURNS

L. F. Lazarenko, V. K. Kozlov, N. G. Zhoukov

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

Severe eye burns in guinea pigs cause gradual autosensitization. This is demonstrated by the increased number of positive tests of Ovary in dependence with the state of the burn wound. The highest number of positive tests was recorded on the 35th day after the induced thermal injury.

К ВОПРОСУ ОБ ИНГИБИРОВАНИИ АКТИВНОСТИ ДНКаз СПЕЦИФИЧЕСКИМИ АНТИТЕЛАМИ

В. А. ДРОЖЕННИКОВ, М. А. ГУБЕРНИЕВ, А. А. ПЕРЕЛАЗНЫЙ

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

В свете современных представлений о повреждающем и ингибирующем действии на клетку агентов химической и физической природы представляет интерес исследование их влияния на различные ферментные системы. Это позволит глубже понять не только специфику их действия на молекулярном уровне, но и возможную роль отдельных ферментов в трансформации первичного эффекта.

Одной из групп ферментов, принимающих участие в обмене генетического материала клетки и играющих немаловажное значение во внутриклеточных процессах, являются нуклеазы. Среди последних видная роль принадлежит ДНКазам, которые, по современным литературным данным, участвуют в целом ряде внутриклеточных процессов: рекомбинации, репарации, ограничении, репликации ДНК и т. д. (1, 3—7).

В связи с вышесказанным исследование ферментативной активности ДНКаз при действии на клетку различными химическими агентами, в том числе и лекарственными препаратами, представляет несомненный интерес не только для более глубокого понимания механизмов действия их на клетку, но и для выявления соединений, обладающих специфическим ингибирующим действием на активность ферментов этой группы. Обнаружение таких ингибиторов позволит использовать их с целью направленного немутационного изменения генетических процессов, происходящих с участием нуклеаз. В этом плане перспективным является получение антител к отдельным ДНКазам, что даст возможность в опытах *in vitro* всесторонне изучить влияние антител как специфических ингибиторов на ферментативный процесс.

В настоящей работе мы исследовали влияние специфических антител на ферментативную активность ДНКазы I.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали хроматографически очищенный препарат ДНКазы I, полученный из Государственного Университета г. Новосибирска. Иммунизацию кроликов ДНКазой I проводили в течение 3 недель в составе полного адьюванта Фрейнда. Суммарная доза препарата ДНКазы, введенного каждому кролику, составляла 15 мг. Полученные индивидуальные сыворотки, взятые до (контроль) и после (опыт) иммунизации, соответственно смешивали по группам и из них с помощью сернистого аммония осаждали суммарные глобулины. Выделенные таким образом глобулины были использованы нами в биологических опытах *in vitro* как возможные ингибиторы активности ДНКазы I. Инкубационную смесь, состоящую из 0,1 мл 0,0025% раствора ДНКазы I 0,9 мл 0,05 М раствора $MgCl_2$ и 3,0 мл глобулиновой фракции (концентрация по белку 62 мг/мл), инкубировали в течение 30 мин при 25° С. Затем добавляли 11,0 мл 0,002% раствора тимусной ДНК и вязкость раствора измеряли в низкоградиентном вискозиметре при 25° С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее проведенной нами работе по изучению иммунологических свойств ДНКазы I (2) было показано, что иммунизация кроликов препаратами ДНКазы I систематически приводила к появлению в крови животных комплементсвязывающих антител к ДНКазе I. Наряду с этим анти-ДНКазные сыворотки содержали и преципитины.

Изучение природы комплементсвязывающих антител позволило установить, что они локализируются во фракции 7S глобулинов.

Для изучения специфичности комплементсвязывающих антител к нативной ДНКазе I нами был использован ряд тест-антигенов: РНКаза, ДНКаза II, бычий сывороточный альбумин и ДНКаза I, прогретая при 100° С в течение 1 часа. Результаты этих исследований выявили специфичность реакции нативная ДНКаза I-антитело.

В настоящей работе представлены экспериментальные данные, полученные на основании проведенных биологических опытов *in vitro* в системе ДНК—ДНКазы I-антитело.

В предварительных экспериментах были отработаны оптимальные условия проведения биологических опытов по ингибированию ДНКазной активности.

Схема опыта дана в разделе «Материалы и методы». Полученные данные представлены на рис. 1, где по оси абсцисс — время в минутах; данные представлены на рис. 1, где по оси ординат — падение вязкости в %. Кривые, представленные на рис. 1, отображают динамику гидролиза ДНК-субстрата под действием ДНКаз.

Анализ кривых 3 и 4 показывает, что как иммунные, так и неиммунные глобулины содержат сывороточную ДНКазу, гидролизующую тимусную ДНК. При этом ход кривых указывает на то, что уровень

активности ДНКазы, содержащейся в глобулинах контрольной и опытной групп, — одинаков.

При сравнении кривых 1, 3 и 4 (рис. 1) видно, что активность сывороточной ДНКазы, присутствующей в глобулинах, выше, чем актив-

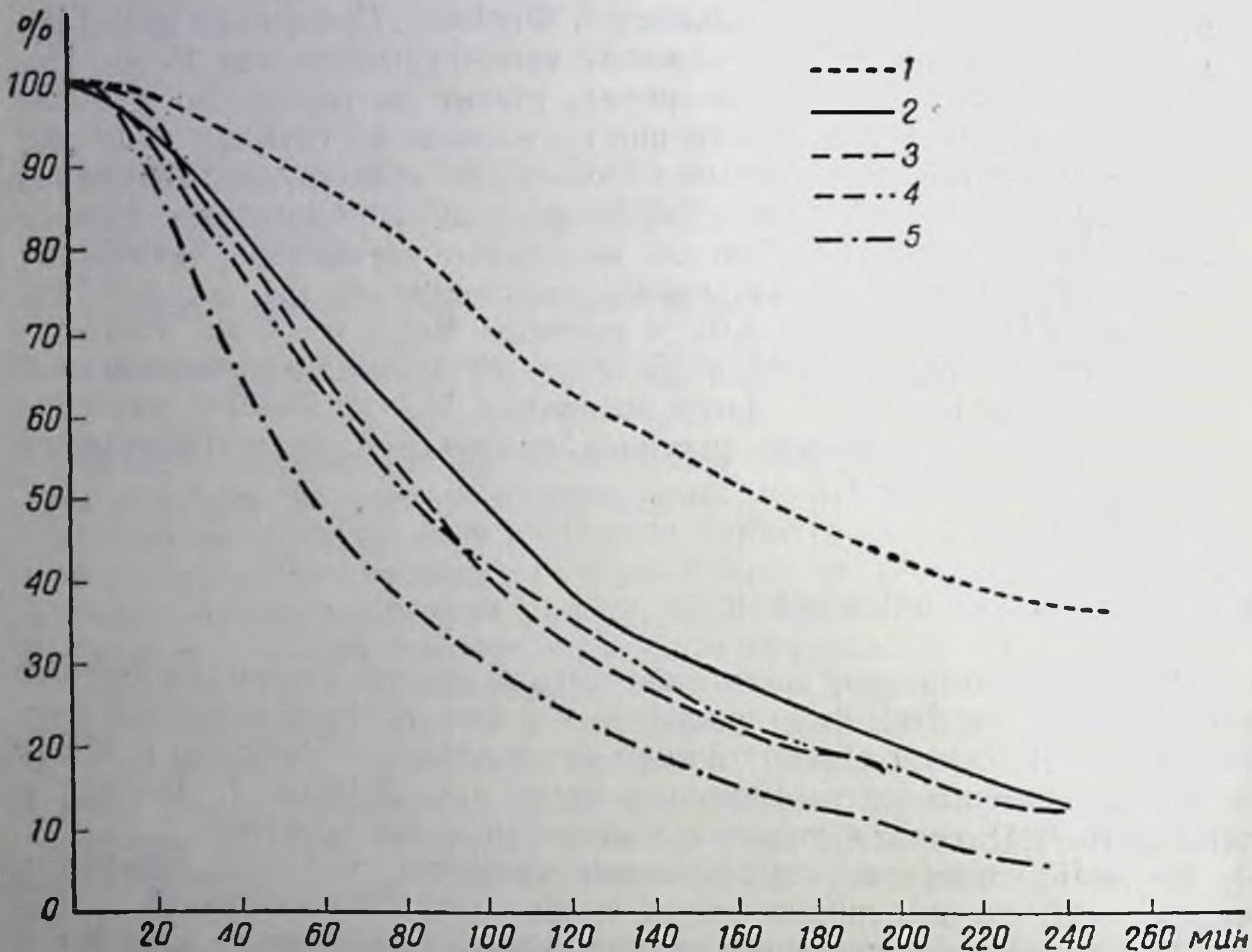


Рис. 1. Изменение вязкости растворов ДНК под действием ДНКазы в присутствии иммунных (ИГ) и неиммунных (НИГ) глобулинов.

1. ДНК+ДНКазы I; 2. ДНК+ДНКазы I+ИГ; 3. ДНК+ИГ;
4. ДНК+НИГ; 5. ДНК+ДНКазы I+НИГ.

ность исследуемой нами ДНКазы I. Совпадение кривых 3 и 4 указывает на то, что антитела к ДНКазе I не обладают ингибирующим эффектом на собственные сывороточные ДНКазы.

Ингибирующий эффект проявляется только в отношении ДНКазы I (кривая 2). В то же время кривая 2, приближаясь к кривым 3 и 4, свидетельствует о менее выраженном гидролитическом эффекте в первом случае (кривая 2) по сравнению с полученными данными, суммированными в кривых 3 и 4, хотя можно было бы предполагать полное совпадение этих трех кривых только за счет проявления ферментативной активности неингибированной сывороточной ДНКазы. Менее выраженный гидролитический эффект, представленный кривой 2 (по сравнению с кривыми 3 и 4), по-видимому, можно объяснить тем фактом, что образующийся комплекс ДНКазы I с иммунными глобулинами за-

трудняет проявление ферментативной активности сывороточной ДНК-азы.

Результаты, отображенные на кривых 2 и 5, свидетельствуют о том, что иммунные глобулины в отличие от неиммунных оказывают ингибирующее действие на активность ДНКазы I. Наиболее выраженный гидролитический эффект, отображенный в кривой 5, вероятно, обусловлен совместным действием ДНКазы I и сывороточной ДНКазы.

На основании проведенной работы можно сделать заключение, что индуцированные иммунные глобулины к ДНКазе I оказывают ингибирующее действие на гидролитическую активность этого фермента, не влияя при этом на активность сывороточной ДНКазы, обнаруживаемой в иммунных и неиммунных глобулинах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губерниев М. А., В. А. Дроженников. — *Журн. общ. биол.*, 31, 1970, 600.
2. Губерниев М. А., В. А. Дроженников, А. А. Перелазный. В кн.: Материалы конф. НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, М., 1971, 101.
3. Varboig S. D., A. J. Clark. — *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 65, 1970, 955.
4. Kaplan J. C., S. R. Kushner, L. Grossman. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, 1969, 144.
5. Meselson M., R. Yuan. — *Nature*, 217, 1968, 1110.
6. Paul A. V., I. R. Lehman. — *J. Biol. Chem.*, 241, 1966, 3441.
7. Signer E., H. Echols, J. Weil, C. Radding, M. Shulman, L. Moore, K. Manly. In: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1968, 33, 711.

INHIBITION OF DESOXYRIBONUCLEASE ACTIVITY BY SPECIFIC ANTIBODIES

V. A. Drozhenikov, M. A. Guberniyev, A. A. Perelazny

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

In *in vitro* experiments it was demonstrated that the globulin fraction, obtained from antisera to pancreatic desoxyribonuclease (DNA-ase I) inhibits the enzyme activity of DNA-ase I.

At the same time the produced immune globulins to DNA-ase I did not influence the desoxyribonuclease activity, demonstrated in fractions of rabbit immune and non-immune globulins.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ТКАНЕВЫХ ДНК В ГОМОЛОГИЧНЫХ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ОТНОШЕНИЯХ

КЛИМОВ В. Ю., М. А., ГУБЕРНИН В. Г. П. ТРИБУЛЕВ

НИЛ экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва

Исследования иммунологических свойств ДНК в гомологичных отношениях впервые были начаты в рамках задач трансплантационной иммунологии (5). Проведенные в 1958 г. исследования (6, 7) показали, что с помощью препаратов ДНК, выделенных из органов животных-доноров, не удается вызвать у реципиента состояния сенсибилизации к клеткам кожного гомотрансплантата. Эти и другие работы послужили основанием для распространенного тогда представления об отсутствии антигенной активности у ДНК в гомологичных отношениях. В то же время отсутствие сенсибилизирующих свойств у донорской ДНК могло определяться и другими причинами: неполноценностью взятых в опыт препаратов ДНК, а также неудачно выбранным в этих работах методом регистрации состояния сенсибилизации животных к ДНК — по сроку переживания клеток кожного гомотрансплантата.

Поскольку иммунологические свойства тканевых ДНК в отличие от ДНК бактериального и вирусного происхождения не были достаточно изучены, свою работу мы начали с экспериментального анализа условий изучения этих свойств, обратив особое внимание на выбор: (А) иммуногена, содержащего ДНК, и (Б) оптимальных для задач исследования форм иммунного ответа реципиента на нуклеиновые кислоты. Эти исследования были проведены в системе гетерологичных отношений; в опытах использовали недеградированные, только высокополимерные, нативные, хорошо депротенизированные препараты ДНК: мол. вес = $8-13 \cdot 10^6$, $\epsilon(P) = 6000-6900$, $R_{E_{270}} = 0,53-0,55$, белок $< 1\%$ (препараты ДНК получали методом повторной фенольной и хлороформной депротенизации ДНП, выделенных из органов по методу Мирского и Полистера, 1946). Принципиальные условия и результаты этих опытов суммированы в табл. 1.

Таблица 1

Условия изучения иммунологических свойств тканевых ДНК

Условия	Иммуноген. источник, количество на курс иммунизации	Тест-антиген	Метод регистрации иммунного ответа	Результат	
Выбор иммуногена, содержащего ДНК Реципиент-кролик (А)	Эритроциты кур свежесотмытые по 0,75 мл на инъекцию, 12 инъекций в течение 4 недель (а)	ДНК эритроцитов кур	а) РСК б) кольцепреципитация	— —	
		Эритроциты кур	а) р-ция гемолиза б) р-ция агглютинации	+ +	
		Сыворотка кур	а) кольцепреципитация	+	
	Гомогенат тимуса теленка 410,37 мг на 9 инъекций в течение трех недель (б)	ДНК тимуса теленка	РСК	—	
		Физ. экстракт из тимуса	РСК	+	
		Сыворотка быка	РСК	+	
	ДНК (белка > 1%) тимуса теленка, эритроцитов кур, 60—110 мг на 9—12 инъекции в течение 3—4 недель (в)	ДНК 1) тимуса теленка, 2) эритроцитов кур	РСК	+	
			РПГА	—	
	Комплекс МБСА—ДНК тимуса теленка, 2 мг ДНК на 4 инъекции в течение 4 недель (г)	ДНК тимуса теленка	РСК РПГА	+ +	
	Условия	Форма иммунного ответа, реципиент	Иммуноген. источник, количество на курс иммунизации	Тест-антиген	Метод регистрации иммунного ответа
Выбор формы иммунного ответа (Б)	анафилактиксия, морские свинки	1) ДНК тимуса теленка, селезенки крыс, 19—90 мг/кг веса свинки, однопятикратное ежедневное введение	ДНК гомологичная: тимуса теленка, печени кролика, эритроцитов кур	анафилактический шок	—
		2) гомогенаты: тимуса теленка, печени кролика, селезенки крыс, 45—150 мг/кг веса свинки			—
		3) эритроциты кур, свежесотмытые, 1,5—3 мл/кг веса свинки			—
	гуморальные антитела, кролики	см. настоящую таблицу раздел (А) графу (в)			

Согласно данным таблицы № 1 для проявления иммуногенной активности тканевых ДНК, получения антител к ней необходимо иммунизировать кроликов нуклеиновой кислотой, взятой либо в форме депротенинизированного препарата, либо — искусственного комплекса ДНК—МБСА. Как оказалось, в составе неразрушенных клеток ДНК не иммуногенна (4) и механического разрушения целостности соматических клеток, по-видимому, недостаточно для проявлений иммуногенной активности их ДНК. Применение одного и того же препарата ДНК в реакциях анафилаксии (морские свинки) и гуморального антителогенеза (кролики) показало, что иммунный ответ животного на ДНК удается фиксировать только в последнем случае. Эти данные, имеющие самостоятельный интерес, определили последовательность нашего подхода к изучению иммунологических свойств ДНК в гомологичных отношениях, которые мы начали с проверки и уточнения наблюдений (6, 7), показавших отсутствие сенсibilизирующих свойств у препаратов донорской ДНК в реакции трансплантационного иммунитета. Результаты наших опытов (2), выполненных на животных инбредного и не инбредного разведения — мышах (в межлинейной комбинации BALB → C57Bl/6J) и крысах («Августа» → «Вистар», а также крысы белые беспородные) показали, что при различных схемах введения животным препаратов донорской ДНК характер переживания у них кожных гомотрансплантатов не отличался от характера переживания гомотрансплантатов у животных контрольных групп, то есть животных, предварительно ничем не обработанных. (В этих опытах были использованы препараты ДНК, выделенные из смеси органов — печени, почек и селезёнок: мышей линии BALB, крыс «Августа» и от 150 крыс беспородных и имеющие соответственно: мол. вес = 8,4·, 6,6· и 7,7 × 10⁶; ε(P) = 6961, 6732 и 6675; N/P = 1,70, 1,66 и 1,64.)

Таким образом, результаты наших опытов подтвердили данные литературы, но в отличии от них мы могли определенно утверждать, что препараты донорской ДНК не вызывают трансплантационного иммунитета у реципиента к кожному трансплантату не потому, что они деградированы, а в связи с присущими ДНК свойствами.

В то же время наши данные не доказывали отсутствия иммуногенной активности ДНК в гомологичных отношениях, поскольку возможную сенсibilизацию реципиента к ДНК определяли не по отношению к нуклеиновой кислоте, а по переживанию клеток трансплантата. В связи с этим в дальнейшем возможный иммунный ответ животного на гомологичные ДНК мы определяли к тому же препарату нуклеиновой кислоты, который использовали в качестве иммуногена. С этой целью три группы морских свинок были сенсibilизированы внутрикожным и подкожным введением в составе полного адьюванта Фрейнда разных доз (10—100—500γ) препарата ДНК, выделенного из смеси органов — печени и селезенки морских свинок, и имеющего мол. вес = 13 × 10⁶; N/P = 1,67; ε(P) = 6505; R_{E270} = 0,55. Повторные (на 7 и 13 дни после первого введения) внутрикожные введения морским свинкам разных доз (6—50—150γ) того же препарата ДНК показали, что у каждого подопытного животного развитие воспаления наблюдалось не во

всех местах введения тест-антигена. Там, где воспаление возникало (обычно на следующий день), отсутствовала видимая зависимость его интенсивности от природы вводимого индикатора — 0,14 М раствора NaCl, растворов гомологичной и гетерологичной ДНК, не наблюдалось также выраженного концентрационного эффекта тест-антигена на интенсивность воспаления; характерным был небольшой диаметр его распространения — не более 7—8 мм и значительное уменьшение воспаления (до 3 мм) к 48 часу наблюдения — все это говорило за то, что перед нами воспалительная реакция, в своей основе имеющая, по-видимому, механическую травму, а не специфическое воспаление, характеризующее реакции типов Артюса и замедленной гиперчувствительности.

В отличие от этого иммунизация кроликов гомологичной ДНК, выделенной из печени кроликов и имеющей: мол. вес = $8-9 \times 10^6$;

Т а б л и ц а 2

Взаимодействие в РСК антисывороток к депротенизированным препаратам ДНК и к комплексу ДНК-МБСА с гомологичными тест-антигенами (максимальные титры)

Иммуноген	№№ сывороток	Тест-антигены: препараты ДНК из печени кролика			
		нативный	денатурированный	после воздействия ДНКазой через	
				3 часа	18 часов
Депротенизи- рованный пре- парат ДНК из печени кро- лика	2063	1 : 10	1 : 40	1 : 10	нет
	2064	1 : 40	1 : 160		
	2006	нет	1 : 20		
	2003	1 : 40	1 : 80		
	2029	1 : 20	1 : 80		
	65	1 : 20	1 : 160		
Искусственный комплекс МБСА-ДНК из печени кролика	2349	1 : 40	1 : 160	1 : 10	нет
	2371	1 : 40	1 : 80	1 : 10	нет
	2400	1 : 40	1 : 80	1 : 10	нет
	8	1 : 40	1 : 160	1 : 10	нет
	2346	1 : 10	1 : 80		
	2302	не стави- ли	1 : 160		
		нет	1 : 80		
	2322				

С контрольными сыворотками, начиная с разведения 1 : 10, РСК с препаратами ДНК была всегда отрицательной.

$\epsilon(P) = 6277$ и 6209 ; $R_{E_{270}} = 0,56$ и белка $< 1\%$, либо ее депротенизированные препаратами (внутривенно 3 раза в неделю по 5 мг ДНК/инъекцию, 4 недели подряд), либо комплексом денатурированной ДНК—МБСА в составе полного адьюванта Фрейнда 1 раз в неделю 4 недели подряд (2 мг ДНК/курс иммунизации/животное) в обоих случаях индуцировала у кроликов иммунный ответ в форме гуморальных антител.

Т а б л и ц а 3

Определение антител к ДНК в антисыворотках к комплексу МБСА-ДНК денатурированная (гомологичная) в РПГА

№ антисыворотки	Серологический тест	Тест-антиген	Максимальный титр агглютинации
2346	РПГА	Эфт-ДНК печ. кролика (А)	+320
	РТПГА(х)	Эфт-ДНК печ. кр. после ДНКазы	+20
		Эфт-ДНК печ. кролика	+20
2371	РПГА	А	+640
	РТПГА(х)	А _____ после ДНКазы	+20
		А	+10
2349	РПГА	А	+320
	РТПГА(х)	А _____ после ДНКазы	
		А	+10
2322	РПГА	А	+320
	РТПГА(х)	А _____ после ДНКазы	
		А	+10
2302	РПГА	А	+640
	РТПГА(х)	А _____ после ДНКазы	
		А	+10
2400	РПГА	А	+640
	РТПГА	А _____ после ДНКазы	+20
		А	+10
8	РПГА	А	+320
	РТПГА(х)	А _____ после ДНКазы	+10
		А	+10

(х) В качестве ингибитора РПГА была использована видоужеродная ДНК тимуса теленка.

Эфт-ДНК: эритроциты, формалинизированные, танинизированные, сенсibilизированные ДНК.

специфически взаимодействующих с ДНК в РСК, а в случае антисывороток к комплексу ДНК—МБСА наряду с РСК и в реакции пассивной гемагглютинации — РПГА (табл. 2 и 3). Фракционирование иммунных сывороток на колонках Сефадекса G-200 показало, что комплексы связывающие и гемагглютинирующие антитела к ДНК характеризуются соответственно как 19S- и 7S-γ-глобулины.

Согласно нашим данным, в РСК, РПГА и РТПГА по взаимодействию с кроличьими антисыворотками к гомологичной ДНК не удается отличить ДНК печени кролика от ДНК селезенки или тимуса крупного рогатого скота (табл. 3). Эти данные дополняют известное положение об иммунологической видонеспецифичности ДНК, основанное на результатах изучения этого вопроса в гетерологичной системе отношений (1). В настоящее время это положение может быть уточнено введением представления об особой форме иммунологической специфичности, характерной для ДНК, состоящей из обычных оснований — аденина, гуанина, тимина и цитозина, которую можно определить как биополимерохимическую форму иммунологической специфичности (3). Эта форма специфичности отличает биополимеры разной природы друг от друга независимо от их видовой принадлежности — в связи с этим реакция носит видонеспецифический характер. В то же время антитела к биополимеру данной природы (в нашем случае к ДНК) выделяют его в среде, смеси биополимеров другой природы (например в сыворотке крови), (8).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдфарб Д. М., Л. А. Замчук. Иммунология нуклеиновых кислот. Изд. Наука, 1968 г.
2. Климов В. Ю. В сб.: Третья Всесоюзная конференция по пересадке тканей и органов. Материалы докладов. Ереван, 1963, 37.
3. Климов В. Ю. В сб.: Проблемы современной иммунобиологии АМН СССР, НИЛ эксперим. Иммунобиол. Медицина, 1972, 97.
4. Климов В. Ю., К. Г. Чамова. В кн.: III Всесоюзная конференция по пересадке тканей и органов. Материалы докладов. Ереван, 1963, 39.
5. Billingham K. E., L. Brent, P. Medawar. — *Nature*, 178, 1956, 514.
6. Naškova V. a. M. Hruběšova. — *Nature*, 182, 1958, 61.
7. Medawar P. B. — *Nature*, 182, 1958, 62.
8. Tan E. M., P. Schur, H. Kunkel. — *J. Clin. Invest.*, 44, 1965, 1104.

A STUDY ON THE IMMUNOGENIC ACTIVITY AND THE IMMUNOLOGIC SPECIFICITY OF TISSUE DNA IN HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS RELATIONSHIP

V. U. Klimov, M. A. Guberniev, G. P. Tribulev

Research Laboratory of Experimental Immunobiology,
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

SUMMARY

It was demonstrated in rabbits immunized with heterologous intact cells, mechanically destroyed cells, tissue homogenates, deproteinized preparations of tissue DNA and DNA-MBSA-complexes, that antibody formation to nucleic acids takes place only in the last two cases.

Likewise in a system of homologous relationships, the immunization of rabbits with deproteinized preparations of DNA or with DNA-MBSA-complexes also induces the formation of specific antibodies to nucleic acids characterized as 19S in the first case and in the second case 19S- and 7S- γ -globulins accordingly. The 19S antibodies are detected by the complement fixation test, and the 7S— by the reaction of passive hemagglutination. Both types of antibodies are specific. The immunologic species-non-specificity of DNA composed of the usual bases — adenine, thymine, guanine and cytosine — is discussed. A biopolymer-chemical pattern of the immunologic specificity of DNA with a given structure is suggested. It was also demonstrated, that in transplantation immunity reactions (mice, rats) as well as in skin hypersensitivity of the delayed type (guinea pigs) the immunogenic activity of deproteinized preparations of homologous DNA is not expressed.

РОЛЬ СЕЛЕЗЕНКИ В ГУМОРАЛЬНОЙ ИММУННОЙ РЕАКЦИИ ГИПЕРИММУНИЗИРОВАННЫХ МОРСКИХ СВИНОК И КРЫС

Л. С. НАКОВ

Кафедра общей биологии Медицинской Академии, София, Болгария

Установлено, что селезенка играет значительную роль в образовании антител (2, 3, 7). Участие селезенки в этом процессе существенно зависит от способа иммунизации (8, 10, 14, 15) и от вида антигена — корпускулярного или растворимого (11). Можно ожидать, что значение селезенки в образовании антител к разным антигенам не одинаково.

Целью настоящей работы является изучение образования преципитинов у спленэктомированных морских свинок и крыс к куриной сыворотке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Морские свинки. Опыты проводили на 6 спленэктомированных и 6 контрольных 3—4-месячных морских свинок весом 180—200 г.

Крысы. Опыты проводили на 15 спленэктомированных и 15 контрольных крысах линии Вистар в возрасте 5—6 месяцев, весом 150—170 г.

Спленэктомию проводили в стерильных условиях под эфиром. Селезенку удаляли после перевязки кровеносных сосудов, а оперативный разрез зашивали двухслойным прерывистым швом. При псевдоспленэктомии у контрольных животных были повторены все манипуляции без наложения лигатур на кровеносные сосуды, без удаления селезенки.

Иммунизацию животных проводили через месяц после операции. Каждой морской свинке вводили 7-кратно по 0,3 мл цельной куриной сыворотки через каждые 6 дней. Первые две инъекции делали интракардиально, третью — интраперитонеально, четвертую — внутримышечно и остальные три — интраперитонеально. При последних 4 инъекциях сыворотку смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда.

Крысам вводили интраперитонеально по 0,3 мл сыворотки. Каждая крыса получала по 6 доз с интервалом в 6 дней. При последних 3-х инъекциях антиген смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда.

К р о в ь для исследования брали посредством интракардальной пункции у морских свинок и из хвостовой вены крыс перед каждой иммунизацией и 3—4 раза через каждые 6 дней после последней иммунизации. Полученные сыворотки от каждой группы смешивали и исследовали иммуноэлектрофоретически по микрометоду Gagar (13) против использованной для иммунизации куриной сыворотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При иммуноэлектрофоретическом исследовании сыворотки морских свинок до иммунизации не дали преципитационных полос с куриной сывороткой.

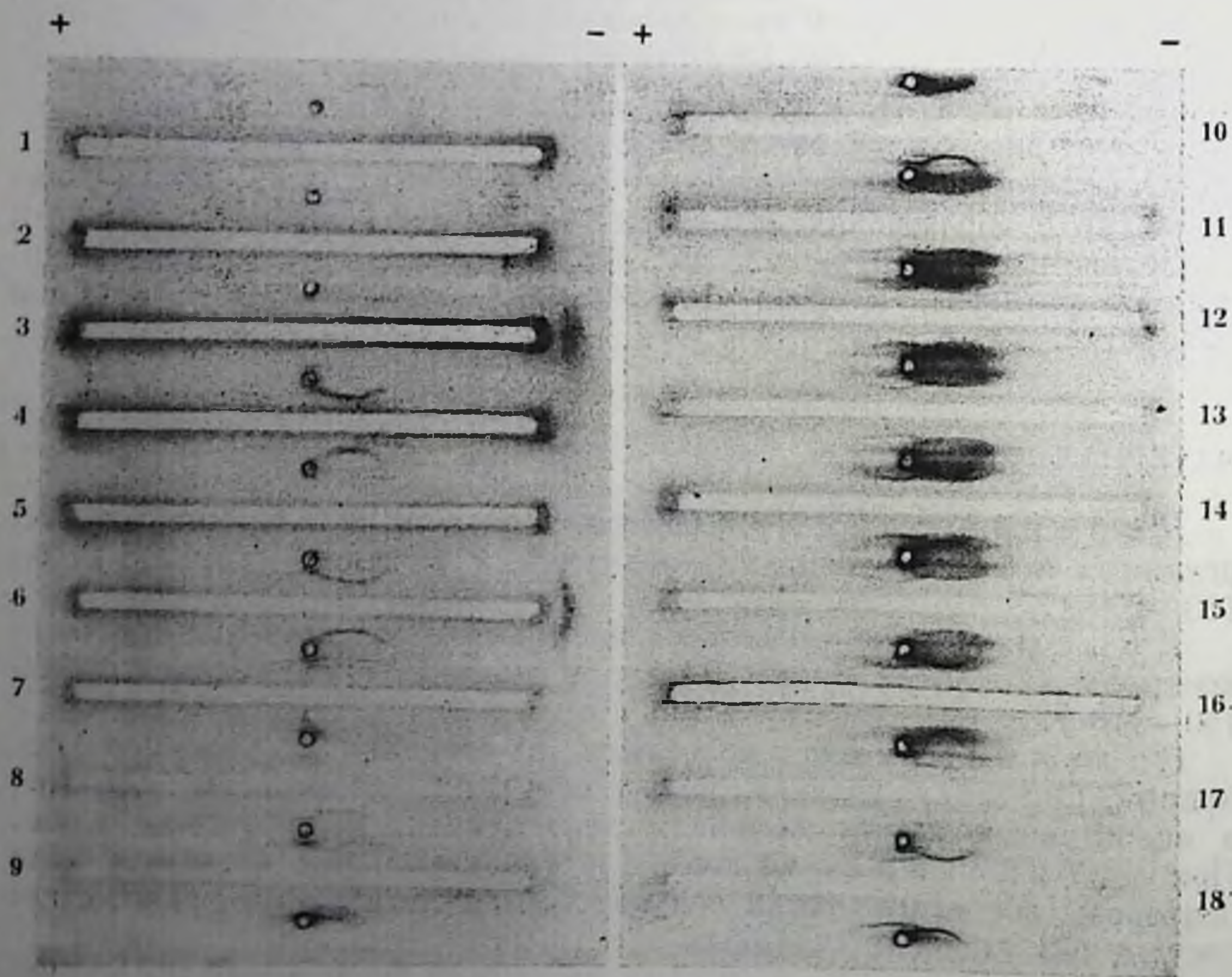
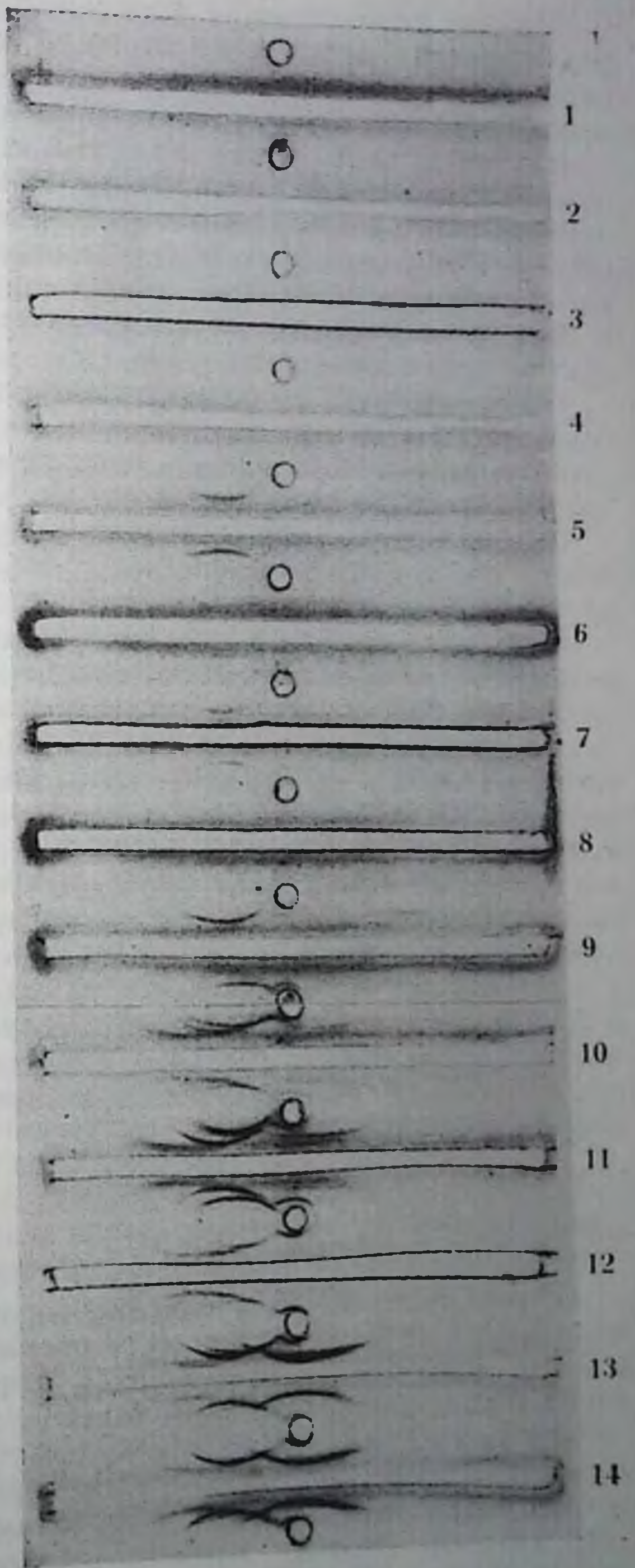


Рис. 1. Иммуноэлектрофорез куриной сыворотки против сборных антисывороток спленэктомированных и псевдоспленэктомированных морских свинок. В каждой лунке — полная сыворотка. В каналах, обозначенных нечетными цифрами, находится иммунная куриная сыворотка спленэктомированных морских свинок, а в обозначенных четными цифрами, — псевдоспленэктомированных морских свинок. Сыворотки 1 и 2 взяты через неделю после начала иммунизации, 3 и 4 — через две недели после начала иммунизации и т. д. Сыворотки 17 и 18 взяты через девять недель после начала иммунизации.

Рис. 2. Иммуноэлектрофорез куриной сыворотки против сборных антисывороток спленэктомированных и псевдоспленэктомированных крыс. Во всех лунках находится цельная сыворотка. В каналах, обозначенных нечетными цифрами, находится иммунная противокуринная сыворотка псевдоспленэктомированных крыс, а в обозначенных четными цифрами — спленэктомированных крыс. Сыворотки 1 и 2 взяты до иммунизации, 3 и 4 — через две недели после начала иммунизации, 5 и 6 — через три недели после начала иммунизации, 7 и 8 — через пять недель после начала иммунизации, 9 и 10 — через шесть недель, 11 и 12 — через семь недель, 13 и 14 — через восемь недель после начала иммунизации.



На рис. 1 представлено фото иммуноэлектрофореза куриной сыворотки против сыворотки спленэктомированных и контрольных морских свинок, иммунизированных той же куриной сывороткой. Видно, что морские свинки образуют антитела против куриной сыворотки, которые можно обнаружить путем иммуноэлектрофореза еще на второй неделе от начала иммунизации. Наряду со слабо выраженными преципитационными полосами в зонах α_2 - и β -глобулинов, которые наблюдаются в обеих группах морских свинок, сыворотка контрольных животных образует и сильную преципитационную полосу, находящуюся в зоне β -глобулинов. В сыворотке спленэктомированных морских свинок такая преципитационная полоса отсутствует.

В ходе иммунизации описанные преципитационные полосы становятся более интенсивными, но, как и в начале, сыворотки спленэктомированных морских свинок не образуют сильно выраженную полосу в β -глобулиновой зоне.

Сыворотки, полученные от крыс до иммунизации и в конце первой недели после начала иммунизации, не дают преципитационных полос при иммуноэлектрофорезе.

Иммуноэлектрофорез с антисыворотками, полученными в ходе иммунизации и после ее окончания, показывает (рис. 2), что преципитины против куриной сыворотки можно обнаружить на третьей неделе после начала иммунизации у контрольных крыс и на шестой неделе у спленэктомированных. От третьей до пятой недели контрольные крысы образуют только одну преципитационную полосу, находящуюся в зоне α_2 -глобулинов. На шестой неделе такая преципитационная полоса, хотя и слабее выраженная, образуется и при реакциях с сывороткой спленэктомированных крыс. В то же время у последних обнаруживаются еще три слабо выраженные преципитационные полосы, которые у контрольных крыс появляются на седьмой неделе и располагаются в зоне α_1 -, α_2 - и β -глобулинов. Несмотря на то, что эти полосы появляются у спленэктомированных крыс на неделю раньше, они выражены слабее по сравнению с контрольными и только к восьмой неделе выравниваются по силе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обычно считают, что спленэктомия ведет к снижению титра антител, но только в течение месяца после операции (12, 16). Во время этого периода наступает компенсаторная гипертрофия остальной лимфоидной ткани, которая частично берет на себя иммунные функции удаленной селезенки. Однако у некоторых видов спленэктомированных животных, после многократного введения антигена (15) или его введения с адьювантом Фрейнда (4, 5, 6), можно получить более высокий титр антител. Поэтому иммунизационные процедуры в ходе наших опытов были начаты через месяц после операции, когда наступало компенсаторное развитие остальных лимфоидных органов.

Полученные нами результаты согласуются с данными Cood и соавт. (9), о том, что морские свинки образуют антитела только против тех антигенов цельной куриной сыворотки, которые располагаются в электрофоретических зонах α_2 - и β -глобулинов даже после четырехкратного введения ее с полным адьювантом Фрейнда.

В наших опытах сыворотка контрольных морских свинок образовала в зоне β -глобулинов одну очень четко выраженную преципитационную полосу, отсутствовавшую в сыворотках спленэктомированных морских свинок.

Исследования на крысах показывают, что от третьей до пятой недели после начала иммунизации только у контрольных крыс можно обнаружить преципитины против одного антигена сыворотки (расположенного в зоне α_2 -глобулинов). У спленэктомированных крыс выявлены преципитины против этого антигена только на шестой неделе. К этому времени появляются и другие преципитационные полосы, выраженные слабее у спленэктомированных крыс; они выравниваются по силе с полосами у контрольных только на восьмой неделе.

Разница во времени появления обнаруживаемых иммуноэлектрофорезом преципитинов против антигенов сыворотки в зоне α_2 -глобулинов у крыс можно объяснить предположением, что образование преципитинов в лимфатических узлах против некоторых антигенов происходит значительно позднее, чем в селезенке.

Другое возможное объяснение полученных результатов можно искать в неравномерном распределении клонов иммунокомпетентных клеток у морских свинок и крыс в разных лимфоидных органах. Если клетки, образующие преципитины к антигену куриной сыворотки, расположенному в зоне β -глобулинов (у морских свинок) или в зоне α_2 -глобулинов (у крыс), локализованы преимущественно (или исключительно) в селезенке, то в оставшихся после спленэктомии лимфоидных органах их будет очень мало или вообще не будет. В виду этого спленэктомированным животным необходим более длительный период для образования этими клетками достаточного количества преципитинов или для возникновения путем мутации новых клеточных клонов.

Представленные результаты позволяют полагать, что участие селезенки в гуморальной иммунной реакции нужно оценивать не только в количественном аспекте: антитела против некоторых антигенов образуются преимущественно, а может быть и исключительно в селезенке.

ЛИТЕРАТУРА

1. С л у д с к а я, А. И. Компенсаторные изменения в лимфоидных органах брюшной полости спленэктомированных кроликов и стимуляция этого процесса лейкоцитарной сывороткой. — *Бюлл. эксп. биол. мед.*, 60, 1965, 110—114.
2. Ф о р ш т е р, Ф. К. К вопросу о механизме образования антител лимфоидными клетками. — *ЖМЭИ*, 1955, 11, 100—106.
3. A n d r s e n S. B., F. B i e r r i n g. Lymphoid organs and normal gamma globulin in the rat. — *Science*, 144, 1964, 1219—1220.
4. B e d n a ř i k T., H. S a j t h a m i o v á. The participation of the spleen in the antibody response during intravenous and depot administration of antigen. — *Physiol. Bohemoslovaca*, 17, 1968, 369—373.

5. Bednařik T., H. Cajthamlová. Formation of antibodies to immunoglobulins after splenectomy during intravenous and depot immunization. — *Physiol. Bohemoslovaca*, 19, 1970, 135—138.
6. Bednařik T., H. Cajthamlová. Zur Frage des erhöhten IgG-Spiegels nach der Splenektomie. — *Z. Immun.-Forsch.*, 141, 1971, 378—384.
7. Bourgois A., A. Paraf. Etude cinétique de la réaction immunitaire chez la souris par la technique d'hémolyse en cellulose. — *Annal. Inst. Pasteur*, 110, 1966, suppl. au n° 3, 33—48.
8. Campbell P. A., M. F. La Via. Effect of splenectomy on primary and secondary response to sheep erythrocytes in rat. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 124, 1967, 571—573.
9. Codd A. A., J. H. Hale, J. B. Selkon, H. R. Ingham. Immunological unresponsiveness of guinea pigs to major antigens in heterologous whole serum. — *Brit. J. Exp. Pathol.*, 49, 1968, 365—370.
10. Draper L. R., D. H. Süssdorf. The serum hemolysin response in intact and splenectomized rabbits following immunization by various routes. — *J. infect. Dis.*, 100, 1957, 147—161.
11. Fitch F. W., J. Winebright. Antibody formation in the rat. II. Agglutinin response to soluble flagellin from *Salmonella typhosa*. — *J. Immunol.*, 89, 1962, 900—905.
12. Gohar M. A., A. A. Eissa, I. Sebai. Antibody response in egyptian splenomegaly. — *Am. J. Trop. Med.*, 31, 1951, 605.
13. Grabar P., P. Burtin. Immunoelectrophoretic analysis. Elsevier, Amsterdam, 1964.
14. Rowley D. A. The effect of splenectomy on the formation of circulating antibody in the adult male albino rat. — *J. Immunol.*, 64, 1950, 289—295.
15. Taliaferro W. H., L. G. Taliaferro. Role of the spleen and nonsplenic sites in antibody formation. — *Science*, 113, 1951, 473.
16. Taliaferro W. H., L. G. Taliaferro. The role of the spleen and the dynamics of hemolysin production in homologous anamnesis. — *J. Infect. Dis.*, 90, 1952, 205—232.

PARTICIPATION OF THE SPLEEN IN THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF HYPERIMMUNE GUINEA PIGS AND RATS

L. Nakov

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria

S U M M A R Y

The author studied the influence of splenectomy on the humoral immune response to hen's serum in rats and guinea pigs. It was established electrophoretically that the splenectomized animals, in contrast to the controls, form with delay or do not form at all precipitins (detectable by immunoelectrophoresis) against some of the antigens of the serum of the hen.

АДСОРБЦИЯ ГРУППОВЫХ А И В АНТИГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА ЛИОФИЛИЗАТОМ ЛИЧИНОК ТРИХИНЕЛЛЫ

Л. НОВОСЕЛСКА

Кафедра общей биологии Медицинской Академии, София, Болгария

Известно, что кутикула нематодов обладает высокой адсорбционной способностью. Hogarth-Scott (1968) установил, что личинки аскарид могут адсорбировать глобулины сыворотки аскаридозных животных, а Новоселска (1972) показала, что кутикула аскарид может адсорбировать *in vitro* групповые А и В антигены желудочного сока людей-секреторов. Gadea и соавт. (1967) сообщили, что взрослые трихинеллы и их личинки могут адсорбировать *in vitro* гамма-глобулины сыворотки человека.

Целью нашего исследования было установить возможность адсорбции *in vitro* групповых А и В антигенов слюны секреторов лиофилизатом личинок трихинеллы.

МАТЕРИАЛЫ

Исследования проводили с лиофилизатом личинок трихинеллы. Их выделяли от экспериментально зараженных морских свинок, промывали многократно физиологическим раствором и лиофилизировали. Для исследования их способности к адсорбции использовали слюну лиц секреторов А и В, получаемую от постоянных доноров. Нативную слюну кипятили в продолжении 30 минут на водяной бане и центрифугировали. Смывали надосадочную жидкость и определяли путем ингибиционного гемагглютинационного теста наличие групповых антигенов и их титр. Титр в обеих пробах составлял 1 : 256. К каждой пробе слюны добавляли мертиолат в конечном разведении 1 : 10 000 и пробы сохраняли в холодильнике при 4° С.

Использовали сборные анти-А и анти-В сыворотки с титром 1 : 64 и А₂ и В эритроциты, получаемые от постоянных доноров.

1. **А б с о р б ц и я** — две стандартные капли анти-А и анти-В сывороток смешивали в отдельности с 4 мг лиофилизата личинок трихинелл по описанному нами ранее методу (5). Абсорбированные сыворотки исследовали на наличие анти-А и анти-В антител.

2. **А д с о р б ц и я**. По 4 мг лиофилизата добавляли к 1 мл слюны секретора А и секретора В. Смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов, после чего центрифигуровали при 2000 об/мин в течение 5 мин, сливали надосадочную жидкость, а лиофилизат промывали физиологическим раствором до полного исчезновения групповых антигенов в надосадочной жидкости.

Обработанным лиофилизатом абсорбировали стандартные анти-А и анти-В сыворотки (5) и по наступившим изменениям титров определяли его адсорбционную способность.

3. **Э л ю ц и я**. Для определения способности трихинелл задерживать или отдавать адсорбированные антигены, инкубированный лиофилизат в слюне секретора А или секретора В подвергали многократному элюированию до полной адсорбции групповых антигенов элюатом. Элюцию проводили в 0,3 M растворе хлорида натрия путем кипячения на водяной бане в продолжение 20 минут.

После последнего элюирования осажденный лиофилизат высушивали и использовали для абсорбции анти-А и анти-В сывороток. По изменениям их титра судили о наличии адсорбированных антигенов на лиофилизате личинок трихинелл.

Адсорбцию групповых антигенов лиофилизированными личинками (и последующее элюирование) проводили восьмикратно при следующих постановках:

1. Инкубация личинок трихинеллы в слюне секретора А.
2. Инкубация личинок трихинеллы в слюне секретора В.
3. Последовательная инкубация одной и той же пробы личинок трихинеллы в слюне секретора А и секретора В и, наоборот.

Наличие групповых А и В антигенов в лиофилизате до адсорбции и после элюции определяли посредством ингибиционного гемагглютинационного теста (8).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В таблице 1 представлены результаты исследований способности лиофилизата личинок трихинелл адсорбировать групповые А и В антигены слюны секреторов и задерживать или отдавать эти антигены. Из таблицы видно, что нативный лиофилизат снижает исходный титр анти-А сыворотки с 64 до 8, а анти-В сыворотки — с 64 до 16. После предварительного инкубирования нативного лиофилизата в слюне секретора А или секретора В и последующей абсорбции сывороток, титр агглютининов значительно снижается. Инкубированный в слюне А лиофилизат трихинелл полностью ингибирует анти-А сыворотку, а

Т а б л и ц а 1

Титр абсорбированных анти-А и анти-В сывороток с лиофилизатом (нативным, инкубированным и элюированным) личинок трихинелл

Стандартные эритроциты	Титр стандартных сывороток	Титр стандартных сывороток после абсорбирования с:	Титр стандартных сывороток после абсорбирования с:							
			лиофилизатом личинок трихинелл, инкубированных в слюне:				лиофилизатом личинок трихинелл, инкубированных последовательно в слюне:			
			секретора А		секретора В		секретора А + секретора В		секретора В + секретора А	
			до элюции	после элюции	до элюции	после элюции	до элюции	после элюции	до элюции	после элюции
А ₂	анти-А 64	8	0	8		0	8	0	8	
В	анти-В 64	16			4	8	4	16	8	16

инкубированный в слюне В — снижает титр анти-В сыворотки до 4.

Кроме того, из таблицы видно, что после последовательного инкубирования лиофилизата личинок трихинелл в слюне А и В секреторов наблюдали ингибирование анти-А и анти-В сывороток. И в этом случае титр анти-А сыворотки падал до нуля, а анти-В — до 4. Эти значения титра не зависели от порядка последовательности инкубирования в соответствующей слюне.

Лиофилизат личинок трихинелл, адсорбировавший А, В или А и В антигены, после элюции приобретает ингибиционные качества, одинаковые с качествами нативного лиофилизата (анти-А — 8, анти-В — 16).

Результаты показывают, что группоспецифические А и В антигены, обнаруженные Oliver—Gonzalez (1944) в полисахаридной фракции личинок *Trichinella spiralis*, выявляются и в их лиофилизате. Кроме того, лиофилизат обладает способностью адсорбировать из слюны секреторов-А и В групповые А и В антигены в отдельности и последовательно, причем его абсорбционная способность к антигену А несколько выше чем к антигену В. При исследовании способности кутикулы аскарид адсорбировать групповые А и В антигены человека нами (1972) была обнаружена повышенная активность к В антигену. Способность к адсорбированию групповых А и В антигенов у человека доказана и на других биологических объектах. Попиванов и соавт. (1967, 1969) сообщали о способности сперматозоидов человека адсорбировать групповые А и В антигены семенной плазмы и слизи шейки матки секреторов и установили, что эта адсорбция необратима. Однако, наши исследования показали, что адсорбция групповых антигенов лиофилизатом трихинелл является обратимой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новоселска Л. Адсорбционна способност на кутикула на аскарид к груповым А и В антигенам человека. — *Мед. паразитол. и параз. болести* (в печати).
2. Попиванов Р., Т. Еврев, Т. Анапиев. Адсорбиране на груповите антигени от семиналната плазма върху човешки сперматозонди. В кн.: Иммунология на сперматозонди и оплодотворения. София, 1969.
3. Gadea D., L. L. More, Jr. and J. Oliver-Gonzalez. Adsorption of Globulin to the Cuticle of Larvae and Adults *Trichinella spiralis*. — *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 1967, 6, 750—751.
4. Hogarth-Scott R. S. Naturally occurring Antibodies to the Cuticle of Nematodes. — *Parasitology*, 58, 1968, 221—226.
5. Novoselska L. Group-like Antigens of the ABO(H) System in Sheep Echinococcus Cyst. — *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 21, 1968, No1, 79—82.
6. Oliver-Gonzalez J. and M. Torregrosa. A substance in Animal Parasites Related to the Human Isoagglutinogens. — *J. Inf. Dis.* 74, 1944, 173—177.
7. Попиванов Р., Е. Старкалев, Т. Еврев, Т. Анапиев. Адсорпция на вещества от група на цервикален мucus върху сперматозонди на човек. — *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* t. 22, 1969, 1341—1348.
8. Wiener A. Rh-Factor in immunological reactions. — *Ann. Allergy*, 6, 1948, 293—295.

ADSORPTION OF A AND B BLOOD GROUP ANTIGENS BY LYOPHILIZED LARVAE OF TRICHINELLA SPIRALIS

L. Novoselska

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria

SUMMARY

The ability of the lyophilizate of *Trichinella* larvae to adsorb *in vitro* human group antigens, isolated from the saliva of A or B secretors has been studied.

The investigations revealed, that the larvae possess the ability to adsorb actively the A and B group antigens. By elution technique it was proved, that the adsorption of these antigens was reversible.

РАЗДЕЛ ШЕСТОЙ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ
РАЗРАБОТКА ВОПРОСОВ ИММУНОЛОГИИ
РЕПРОДУКЦИИ

О НЕКОТОРЫХ ВОПРОСАХ ИММУНОЛОГИИ ПРОЦЕССА РАЗМНОЖЕНИЯ

К. БРАТАНОВ, В. ДИКОВ

Институт биологии и патологии сельско-хоз. животных, Сельско-хозяйственная академия
им. Г. Димитрова, София, Болгария

Размножение — одно из основных свойств живых организмов, обеспечивающее существование видов растительного и животного мира. Самым важным моментом этого сложного биологического процесса является оплодотворение. Поэтому научно-исследовательская деятельность многих институтов и лабораторий в ряде стран посвящена проблемам иммунологии оплодотворения и иммунологии размножения в целом. В этом отношении за последние годы достигнуты заметные успехи. Не будет преувеличением, если сказать, что в мировом масштабе указанные исследования стали одними из самых актуальных в этой области, а достигнутые успехи раскрыли и поставили новые проблемы в изучении сложного и разнообразного процесса размножения.

Более 70 лет тому назад, одновременно, но независимо друг от друга, Мечников (1899) и Landsteiner (1899) положили начало исследованиям в этой области. Особенно ценный вклад в исследования «сперматотоксинов» внес после этого Метальников (1900). Однако потребовался длительный период времени для того, чтобы на эти исследования обратили должное внимание. Лишь за последние 10—15 лет были проведены многочисленные исследования по иммунологии половых клеток и, главным образом, исследования спермоиммунизации (аутоспермоиммунизацией у мужских индивидов и изоспермоиммунизацией у женских), играющей роль в этнопатогенезе «беспричинного» бесплодия.

Иммунологический аспект бесплодия домашних животных и человека имеет огромное значение, как с практической, так и с теоретической точек зрения. Наряду с установлением морфологически и функционально обусловленных нарушений систем воспроизводства, нарушений в нервно-гормональной корреляции организма, недостаточности некоторых микро- и макроэлементов, ошибок в организации кормления и разведения (у животных), микробной, вирусной, паразитической инвазии и пр. выявлена также и роль иммунных факторов в некоторых случаях бесплодия. В этом отношении необходима раз-

работка методов профилактики и терапии иммунологических нарушений в процессе размножения.

Проведение исследования в этой области создало новую отрасль в биологии размножения — иммунобиологию процесса размножения. Большое число теоретических и практических научных фактов, раскрывает широкую перспективу в решении не только узкого круга вопросов, связанных непосредственно с разными формами бесплодия, но и в освещении некоторых кардинальных проблем общепроизводственного значения.

Решение всех этих вопросов требует широкого и всестороннего исследования всех факторов, связанных с иммунологической активностью некоторых продуктов половой системы самцов и самок.

Исследовательская работа в области иммунологии процесса размножения охватывает несколько основных вопросов, а именно:

1. Антигенные свойства сперматозоидов и спермальной плазмы.
2. Специфичность, действие спермоантител и сущность механизмов ауто- и изоспермоиммунизации в организмах.

3. Значение и характер иммунных и иммуноподобных реакций при взаимодействии мужских и женских гамет в процессе оплодотворения.

4. Иммунологические взаимоотношения между материнским организмом и плодом и факторы, нарушающие их динамическое равновесие или их регуляторные системы.

5. Роль групповых факторов и несовместимости по группе крови в процессе размножения.

6. Условия, при которых может наступить сенсibilизация и аллергия женского организма против некоторых компонентов консервантов спермы, и последствия этого.

7. Иммуногенная активность некоторых гонадотропных гормонов.

8. Иммуногенные свойства некоторых компонентов молока.

При оценке значения ауто- или изоиммунизации сперматозоидами и спермальной плазмой, представляет интерес выяснение вопроса о существовании «естественных» спермоантител в организме и определение их роли.

Исследуя наличие изоспермоантител (спермоагглютининов) у бесплодных коров в 1949 г., мы установили, что в 8—12% случаев спермоагглютинины (низких титров) обнаруживаются и в сыворотке здоровых нетельных коров, которые никогда не были в контакте со сперматозоидами (Братанов, Геров, Тодоров, 1949). Через десять лет Alfonso и Perez (1959) сообщили, что в сыворотках у 12% исследованных здоровых кроликов содержались спермоагглютинины низкого титра. По данным Edwards (1960), методами агглютинации, смешанного клеточного антиглобулинового теста, иммунофлуоресценции, реакции связывания комплемента, иммуноприлипания, тестов спермоиммобилизации, спермолиза и пр., в нормальной сыворотке «всех взрослых животных» выявлен «фактор», который реагировал специфически с аутологичными сперматозоидами, причем наиболее выраженной была реакция с антигенами акросомы (установленная методом иммунофлуоресценции). Этот «фактор» отсутствует в сыворотке у молодых животных и появля-

ется, как и другие естественно существующие аутоантитела, на определенных стадиях роста самцов и самок, а его титр варьирует в границах от 1 : 10 до 1 : 60 (Beck, Edwards и Yong, 1962, Edwards, 1967). Тот же спермоагглютинирующий фактор, который обладает свойствами аутоспермоопсонина (антитело антиакросомы) и играет роль при элиминировании посредством фагоцитоза остаточных сперматозоидов после оплодотворения, установлен и в сыворотке телят и телок (Братанов, Диков, 1963; Диков, 1965; Торньов, 1967). Иммуноэлектрофоретически этот фактор охарактеризован как JgG₂ (Johnson, 1968).

Вопрос об антигенных свойствах сперматозоидов и спермальной плазмы можно рассматривать в нескольких аспектах. Во-первых, следует отметить их органныю специфичность.

Богатую информацию в этом отношении дают результаты разработки модели экспериментального аутоиммунного асперматогенного орхита (Voisin и сотр., 1951, Vojtiškova и сотр., 1962, Райцина и сотр., 1969) и особенно самые новые исследования этой модели (Voisin и Touillet, 1968, 1968, 1969, 1971), в которых доказано наличие аутоантигенов S, P, Z и T, проведено их химическое выделение и даны физико-химические характеристики. Важно отметить, что эта органныя специфичность яичек и сперматозоидов, которая выходит за границы биологического вида, не абсолютна: напр. известна антигенная общность яичка (и яичника) с мозгом (Lewis, 1934, 1941; Katsh и Bishop, 1958, Bishop и Karlson, 1965). Доказана, кроме того, антигенная общность сперматозоидов и ряда органов у человека и у кроликов в условиях изоиммунизации (Попиванов и Вылчанов, 1965) и гетероиммунизации (Вылчанов и Попиванов, 1969), сперматозоидов и клеток культуры ТЖ₃₃ и пр. (Трибулев и сотр., 1965, 1969). Данные об антигенной общности сперматозоидов с некоторыми органами у кроликов подтверждаются и нашими исследованиями (Братанов, Диков, Колинкоева, 1967). Органную специфичность сперматозоидов, семенной плазмы и всего полового тракта (вместе с придаточными половыми железами) выявили также Shulman и сотр., 1966, 1967; Dikov и Torgnev 1968; Торньова, 1967.

Для общей иммунологии и иммунопатологии сперматозоидов важное значение имеет вопрос об их видовой специфичности.

В этой области проводили мало исследований. Группа авторов (Nestoen и Manly, 1923, Розанов, 1927, Mudd и Mudd, 1929) считает, что видовая специфичность сперматозоидов четко выражена. Другие авторы придерживаются мнения о том, что эта видовая специфичность проявляется только на уровне кросс-реакции между антигенами сперматозоидов и соответствующими иммунными сыворотками против сперматозоидов некоторых близких видов животных (Guyer, 1922, Henle, 1938, Smith, 1949 и пр.).

Наличие видоспецифических антигенов в сперматозоидах доказал впервые Moxter (1900). Он установил, что кроличьи антисыворотки против сперматозоидов барана содержат гемолизины по отношению к эритроцитам этого животного. Подобные результаты получены и Rosenthal (1912). В человеческих сперматозоидах присутствие видо-

специфических антигенов доказано Попивановым и Вылчановым (1961), которые выявили перекрестные реакции антисыворотки против человеческих эритроцитов со сперматозоидами. Edwards и соотр. (1964) тоже установили видоспецифические антигены в человеческих сперматозоидах, а Baldo и Boettcher (1971), исходя из результатов Попиванова и Вылчанова (1961, 1962), изучали химическую природу этих антигенов и показали, что наблюдаемая у человека и барана видовая антигенная специфичность сперматозоидов и эритроцитов встречается и у кролика, опоссума и крысы. Кроме этого, Baldo и Boettcher доказали наличие и видового антигена в человеческой семенной плазме.

На третье место следует поставить групповую специфичность сперматозоидов. Если о наличии такой специфичности в сперматозоидах секреторов уже не спорят, то вопрос о том, являются ли эти факторы группы крови собственными (принадлежащими антигенной мозаике сперматозоидов) или это дополнительно приобретенные антигены, широко обсуждается. Существенное значение для выяснения этого вопроса имеет изучение групповых антигенов у человека. Здесь главную роль сыграли труды Landsteiner и Levine (1926), Краинской-Игнатъевой (1929), Gullbring (1957), Behrman и соотр. (1960), Попиванова и соотр. (1959, 1962, 1965, 1968, 1969), Shahani и Southam (1962), Трибулева и соотр. (1965), Krieg (1967), Boettcher (1965). В этом направлении проведены исследования и на животных Podliachouk и Wroblewsky (1958), Schmidt и соотр. (1964), Братанова, Дикова (1963), Дикова (1965, 1967), Дикова, Подлящук (1968) и пр.

Большой интерес представляет изучение антигенной структуры половых клеток в процессе их образования и роста, особенно в связи с проявлением аутоантигенности сперматозоидов. Для экспериментальной разработки этого вопроса существенное значение имеют опыты по моделированию аутоиммунного асперматогенного орхита. Эти опыты способствовали не только теоретическому освещению ряда моментов в сфере половой способности самца, но и раскрыли перспективность этих исследований для клинической практики. Особую заслугу в этом отношении имеют исследования Voisin и соотр.

В наших исследованиях (Братанов, Диков, Попова, 1964) были выяснены как некоторые предпосылки проявления аутоантигенной активности сперматозоидов, динамики образования и накопления спермоантител, так и некоторые особенности действия аутоантител у животных (Братанов, Диков, Попов, 1967). Установлено, что при поражении яичка аутоспермоантитела образуются раньше, чем в тех случаях, когда семявыносящие протоки лигированы. Однако, агглютинабельность аутоспермоантител у животных с лигированными семявыводящими протоками выше и действие ее продолжительнее. Мы допускаем, что причиной реакции организма различным способом на один и тот же антиген (собственные сперматозоиды) являются разные дозы антигена, поступающего в кровообращение при ранении или резорбирующегося при лигировании.

Другая актуальная проблема в области иммунологии размножения это проблема иммунных реакций при самом процессе оплодотворения.

На основании экспериментальных данных ныне принимается, что при процессе оплодотворения возникают типические иммунные или иммуноподобные процессы, причем развивающаяся зигота, а затем и эмбрион, относятся как толерируемый трансплантат в материнском организме. В свете этого существенный интерес представляет иммунологический аспект имплантации зародыша, роль трофобласта и разных протеолитических ферментных систем в образовании иммунологической толерантности материнского организма и плода в осуществлении плацентации и нормального вынашивания плода. Большой интерес представляют опыты по искусственному созреванию гамет, оплодотворению и культивированию зиготы и эмбриона *in vitro*, по иммунологической толерантности при алло- и ксенотрансплантации оплодотворенных яйцеклеток и т. п.

Следует отметить, что изучение вопросов иммунологических отношений материнского организма, имплантации зиготы и формирования эмбриона и особенно реактивности материнского организма внесли вклад в выяснение вопросов патогенеза некоторых форм выкидышей и эмбриональной смертности и для поиска способов и возможностей преодоления иммунологического конфликта между материнским организмом и плодом. В этом отношении надо особо подчеркнуть вклад Волковой (1967, 1970) в изучение этого вопроса у человека, и Соколовской и Решетниковой (1969) — у домашних животных. Здесь возникает и вопрос о роли изоспермоантител как факторов неоплодотворения.

В последнее время совершенно справедливо уделяется большое внимание исследованиям, посвященным антигенной структуре гонадотропных гормонов, компоненты которых могут вызвать в организме появление антител, являющихся антагонистами генеза и биологического действия собственных гормонов. В ряде случаев, особенно в ветеринарной практике, в организме наблюдается состояние конфликта между биологической и антигенной активностью половых гормонов. В результате этого элиминируется их действие. Исследование вопроса осветит динамику действия половых гормонов в связи с этиологией гормональных нарушений в процессе размножения и увеличит эффективность действия различных гормональных препаратов. В этой связи находят свое место и некоторые иммунологические тесты диагноза беременности.

Другим важным направлением в иммунологии размножения является изучение роли иммунных факторов в процессе лактации. Эти факторы можно исследовать в соответствии с их проявлениями, в трех направлениях:

а. Роль переходящих в организм новорожденного иммунных тел матери через ее молоко и особенно через молозиво и создание пассивного иммунитета.

б. Действие молока в возникновении аллергической реактивности в организме, играющей известную роль в случаях маститов, заболеваний половых органов и некоторых заболеваний новорожденного (у домашних животных).

в. Антигенная активность лактотропных гормонов, которая в некоторых случаях может привести к образованию антилактотропинов.

Вопросы антигенного действия молока и переноса иммунных антител из молозива в организм новорожденного являются особо важными в выяснении этиологии некоторых форм маститов.

Наряду с достигнутыми успехами иммунологии размножения все еще предстоит проведение широких работ по ряду других нерешенных вопросов, а также становление новых, возникающих из практики, проблем. Например, необходимо установить более точные и объективные методы определения иммунологического состояния самцов и самок и учета иммунотерапевтических воздействий на их состояние с целью правильного протекания и регулирования процесса размножения. Недостаточно выяснены еще сложные биохимические отношения между энзимными системами в организме, антигенами и возникающими против них антителами. Перед нами со всей остротой возникают вопросы новой области клеточной иммунологии — энзимоиммунопатологии. Предстоит выяснение ряда вопросов в области иммуногенетики. Необходимо продолжать исследования, связанные с дальнейшим выявлением механизмов действия ауто- и изоспермоантител, их влияния на развитие эмбриона и плода. Проблема трансплантации зигот имеет также большое значение и не только теоретическую, но и практическую перспективу.

Все это указывает на огромную предстоящую работу в области иммунологии размножения, для того чтобы изучить процесс размножения в целом, для разработки методов его направления, для того, чтобы полученные результаты использовать в практике сельского хозяйства и здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Братанов, К., К. Геров и Т. Тодоров. — Год. ССА «Г. Димитров», *Ветер. Мед. ф-т* 1949/1950, 321—334.
2. Братанов, К. и В. Диков. — *Изв. ИБПР, АСН*, 4, 1968, 15—24.
3. Братанов, К. и В. Диков. В кн.: Иммунология сперматозондов и оплодотворения. С., БАН, 41—45.
4. Братанов, К., В. Диков, и Ю. Попова. — *Ветер. мед науки*, 1, 1964, 6, 31—42.
5. Братанов, К., В. Диков, А. Колинкова. — *Ветер. мед. науки*, 4, 1967, 6, 7—12.
6. Братанов, К., В. Диков, Ю. Василева-Попова. В кн.: Иммунология сперматозондов и оплодотворения С., БАН, 1969. 167—178.
7. Волкова, Л. С. — Труды VII междунар. конгресса антропологических и этнографических наук. М., 1967.
8. Волкова, Л. С. Иммунобиологические взаимоотношения организмов матери и плода. М., Медицина 1970. 264.
9. Диков, В. Проучвания върху кръвните групи на животните. Диссертация. С., 1968, 187.
10. Диков, В. и Л. Подлящук. — *Ветер. мед. науки*, 5, 1968, 10, 71—76.
11. Красицкая-Игнатова, В. Н. — *Врачебное дело*, 8, 1929.

12. Попиванов, Р. и Л. Ерменкова. — *Изв. Инст. физиол. БАН*, IV, 1961, 141—145.
13. Попиванов, Р. и В. х. Вълчанов. — *Изв. Микробиол. и-т. БАН*, 13, 1962, 81—88.
14. Попиванов, Р. и В. х. Вълчанов. — *Изв. Микробиол. и-т. БАН*, 17, 1965, 245—251.
15. Попиванова, Р. и В. х. Вълчанов. — *Бюлл. exper. биол. и мед.* 1965, 2, 110—114.
16. Попиванов, Р. П., В. х. Вълчанов, Г. П. Трибулев, И. И. Подоплелов, Т. Ю. Александян и В. Т. Тимофеев. В кн.: Материали II научной конференции (13—14 июля 1968) Инст. exper. биол. Акад. Наук Арм. ССР, Ереван, 1968, 32—34.
17. Райцнна, С. С. и М. Нилевский. — *Вестник АМН СССР*, 22, 1967, 2, 40.
18. Розанов, Н. И. — *Мед. журнал*, 1927, 5.
19. Торньов, А. П. — *Вет. мед. науки IV*, 1967, 6, 83—91.
20. Торньов, А. П. — Проучване върху антителата срещу спермата на бик. Дисертация. С., 1968, 226.
21. Трибулев Г. И., И. И. Подоплелов, Р. Попиванов, В. Х. Вълчанов. — *Морфол. и exper. мед.*, 4, 1965, 157—166.
22. Трибулев, Г. П., И. И. Подоплелов, Р. П. Попиванов, Л. С. Наков С. М. Живков и В. х. Вълчанов В кн.: Иммунология сперматозондов и оплодотворения. С., БАН, 1969, 35—39.
23. Alfono, C. G., F. Perez. — *Ann. Inst. Invest. et Veterinarias, Madrid*, 9, 1959.
24. Baldo, B. A., B. Boettcher. — *J. Reprod. Fert.* 24, 1971, 391—401.
25. Beck, J. S., R. G., Edwards. M. R. Young, — *J. Reprod. Fert.* 4, 1963, 103—110.
26. Behrman, S. J., J. Beutner-Janusch, R. Heglal, H. Gershovitz, W. L. Tew. — *Am. J. Obstetr. Gynec.* 79, 1960, 847.
27. Bishop, D. W., G. L. Carlson. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 124, 1965, 246—266.
28. Boettcher, B. — *J. Reprod. Fert.* 1965, a. 267.
29. Dikov, V. and A. Торньов. — VI Congrès Reprod. Insem. Artif. Paris, 1968 vol. I, 529—532.
30. Docton F. V., A. Ferguson, M. Barber. — *Ann. Inst. Pasteur.* 81, 1951, 48.
31. Edwards, R. G. — *J. Reprod. Fert.* 1, 1960, 268—282.
32. Edwards, R. G., L. C. Ferguson, R. R. A. Coombs. — *J. Reprod. Fert.* 7, 1964, 153—161.
33. Edwards, R. G. In: *Immunology of Spermatozoa and Fertilization*. Sofia, BAS, 1969, 27—34.
34. Gullbring, M. — *Acta med. Scand.*, 159, 1957, 3, 169.
35. Guyer, M. F. — *J. Exper. Zool.* 35, 1922, 207.
36. Hectoen, L. and L. S. Manly. — *J. Infect. Dis.* 22, 1923, 167.
37. Henle, W. — *J. Immunol.*, 34, 1938, 325.
38. Johnson, M. H. — *J. Reprod. Fert.* 16, 1968, 503—506.
39. Katsh, S., Bishop D. W. — *J. Embryol. Exp. Morph.*, 6, 1958, 94—104.
40. Krieg, H. In: *Immunol. of Spermatozoa and Fertilization*. Sofia, BAS, 1969, 237—241.
41. Landsteiner, K. — *Zentrbl. Bakt. Paras. Kde*, 25, 1899, 546—549.
42. Landsteiner, K. and P. Levine — *J. Immunol.*, 12, 1926, 415.
43. Lewis, J. H. — *J. Immunol.*, 27, 1934, 473.
44. Lewis, J. H. — *Am. J. Pathol.* 17, 1941, 725.
45. Metalnikoff, S. — *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 14, 1900, 577—589.
46. Metchnikoff, E. — *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 13, 1899, 737—770.
47. Moxter, D. — *Dtsch. Med. Wschr.* 26, 1900, 61.
48. Mudd, S., E. B. Mudd — *J. Immunol.*, 17, 1929, 39.

49. Podliachouk, L., H. Wioblewsky — *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 94, 1958, 748.
50. Popivanov, R. and V. H. Vulchanov. — *Compt. rend. Acad. Bulg. Sci.*, 17, 1964, 865—868.
51. Popivanov, R. and V. H. Vulchanov In: *Immunology and Reproduction*. London, IPPF 1969, 155.
52. Rosenthal, L. — *Proceedings Soc. Exper. Biol. Med.*, 28, 1931, 827.
53. Schmid, D. O., P. O. Conkortly, W. H. Stone. — *J. Anim. Sci.* 23, 1964, 4, 1198.
54. Shahani, S. and A. L. Southam. — *Am. J. Obstetr, Gynec.* 84, 1962, 660—666.
55. Smith, A. V. — *Proc. Roy. Soc. Lond, S. B.* 136, 1949, 46.
56. Shulman, S., C. Yautorno, W. A. Soanes, M. J. Gonder and E. Witebsky — *J. Immunol.* 10, 1966, 99—113.
57. Shulman, S., C. Yautorno and P. Bronson. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126, 1967, 658—661.
58. Sokolovskaya, I. I. and N. M. Reshetnikova In: *Immunology and Reproduction*. London, IPPF, 1969, 192—208.
59. Tribulev, G. P., I. I. Podoplelov, R. P. Popivanov and V. H. Vulchanov. — *Compt. rend. Acad. Bulg. Sci.* 18, 1965, 887—890.
60. Vojtiškova, M., V. Viklicky, A. Jiosakova, K. Nouza, Z. Pokorna. — *Folia biol (Praha)* XI, 1965, 5, 364.
61. Voisin, G. A. Delaunay, A., Barber, M. — *Compt. rend. Acad. Sci. Paris*, 232, 1951, 1264—1266.
62. Voisin, G. A., F. Toullet. In: *Immunology of Spermatozoa and Fertilization*. Sofia, BAS, 1969. 149—171.
63. Voisin, G. A., F. Toullet. — *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 144, 1968, 727—755.
64. Vulchanov, V. H., R. Popivanov In: *Immunology of Spermatozoa and Fertilization*. Sofia, BAS, 1969. 73—79.

ON SOME ASPECTS OF THE IMMUNOLOGY OF REPRODUCTION

K. Bratanov, V. Dikov

Institute of Biology and Pathology of Reproduction and Noninfectious Diseases,
G. Dimitrov Agricultural Academy, Sofia, Bulgaria

SUMMARY

This paper summarizes some of the authors' studies on the immunology of reproduction and the relevant data in the literature on this subject. The problems concerning the antigenicity of spermatozoa and seminal plasma, the nature and the mechanism of autosperm- and isosperm-immunization of the organism and others are discussed. In this respect the authors examine the immunologic relationship between the mother's organism and the foetus, as well as the conditions favouring sensitization and allergization of the mother's organism to some components of the sperm conservants. The significance of the antigenic activity of some hormones and certain milk components is also emphasized.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РАЗРАБОТКА НЕКОТОРЫХ ВОПРОСОВ ИММУНОЛОГИИ РЕПРОДУКЦИИ

Л. С. ВОЛКОВА, М. И. КУКСОВА, А. В. АНДРЕЕВА, В. В. МАЛЬЦЕВА,
И. С. ГВАЗАВА, Н. К. ГОЛОВКИНА

НИЛ Экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва
Институт экспериментальной патологии и терапии АМН СССР, Сухуми

Известно, что главной областью постоянных научных интересов и изысканий Г. П. Трибулева было изучение изоантигенной дифференцировки крови и тканей человека (Г. П. Трибулев, П. Н. Косяков, 1938; Г. П. Трибулев, 1944, 1949; П. Н. Косяков, Г. П. Трибулев, 1939). Эта область исследований, составляя ядро классического направления изосерологии и иммуногематологии, приобрела в последние годы особо важное значение в связи с широким развертыванием работ по изучению проблем гомотрансплантации тканей и иммунологии репродукции.

Наши исследования, проводимые в течение ряда последних лет при непосредственной помощи Г. П. Трибулева, касаются вопросов иммунологии эмбриогенеза. По существу, это один из разделов изо-иммуносерологии и наша работа является, таким образом, прямым продолжением исследований по изучению антигенной специфичности крови и тканей плодов человека, которые успешно проводились в нашей стране Г. П. Трибулевым (совместно с П. Н. Косяковым) еще в тридцатые — сороковые годы.

В настоящем сообщении мы кратко излагаем результаты экспериментальной работы в области иммунологии размножения, начатой нами в Институте экспериментальной биологии Академии медицинских наук СССР, где Г. П. Трибулев осуществлял научное руководство, как заместитель директора института по науке. Всем, что может быть одобрено и оценено в этих исследованиях, мы в значительной мере обязаны Григорию Поликарповичу, — нашему замечательному ученому, прекрасному человеку и внимательному руководителю.

В серии клинических исследований, проведенных нами ранее (Л. С. Волкова, 1956), удалось установить особенности иммунологического взаимодействия между организмом матери и плодом. Показано, что ткани плаценты и внезародышевых образований (плодные оболочки, околоплодные воды) осуществляют важнейшую функцию иммунного ба-

рьера, который обеспечивает взаимозащиту матери и плода при гетерологической беременности. В последующем возникла необходимость в экспериментальном моделировании иммунопатологических реакций между матерью и плодом, поскольку целый ряд практически важных вопросов не мог быть решен в клинических условиях.

Нами проведены соответствующие опыты на низших обезьянах (панганы-гамадрилы): изучались группы крови; получены от самок, имевших отягощенный акушерский анамнез, изоиммунные сыворотки 9-и типов; с помощью сывороток проведена идентификация изоантигенной дифференцировки крови этих обезьян и осуществляется подбор пар производителей для моделирования иммуноконфликтной беременности и нарушения эмбрионального развития. Нам впервые удалось разработать на обезьянах модель гемолитической болезни новорожденных, которая по своему патогенезу и клинической характеристике ничем не отличается от врожденного иммуно-гемолитического заболевания у детей (Л. С. Волкова, А. В. Андреева, М. И. Куксова и др., 1964, 1965, 1966, 1967). В связи с этим открылась реальная возможность широкого испытания новых средств и методов антенатальной профилактики и лечения названной болезни. В настоящее время специфические методы профилактики гемолитической болезни новорожденных у женщин, с симптомами изосенсибилизации, отсутствуют.

Нами в свое время (Л. С. Волкова, 1957) были теоретически обоснованы испытания на животных двух новых методов, представляющих реальный интерес в рассматриваемом плане: метод усиления околозародышевого иммунного барьера и метод, основанный на выработке у матери состояния иммунологической толерантности к изоантигенам крови плода.

В клинических исследованиях Witebsky а. Mohn (1945) и в наших последующих наблюдениях (Л. С. Волкова, 1956, 1967) было установлено, что обеспечение нормального развития плода при иммуно-несовместимой беременности связано с наличием в околоплодных водах достаточного количества изоантигенов, свойственных зародышевым антигенам. Отсюда был сделан вывод о возможности искусственного усиления барьерной функции плодных вод путем введения в них соответствующих антигенных (или гаптенных) фракций.

В опытах, проведенных нами на изоиммунизированных беременных обезьянах, такая возможность была показана (Л. С. Волкова с соавторами, 1969, 1972). В ряде случаев у самок, имевших крайне отягощенный акушерский анамнез, после трансабдоминального введения в воды раствора эритрофосфатида, обладающего свойствами специфического гаптена (способного связывать иммунные материнские антитела), рождались вполне жизнеспособные доношенные детеныши. Картина крови у таких новорожденных сходна с кровью детенышей, перенесших легкую анемическую или клинически стертую форму гемолитической болезни новорожденных (М. И. Куксова с соавт. 1968, 1971). В настоящее время этот метод передан на испытание в акушерские клиники. Необходимо, однако, подчеркнуть, что многие стороны изучаемых при этом реакций и механизмов требуют еще детального исследования.

Опыты по выработке у матери состояния иммунологической толерантности к изоантигенам крови плода мы вели на двух линиях инбредных крыс, отличающихся по B_1 -изоантигену крови. В первой серии опытов самок с B_1 -негативной кровью ($B-/-$) спаривали с B_1 -позитивными ($B\pm/+$) самцами. До спаривания и во время беременности самок иммунизировали B_1 -позитивной кровью, в результате они вырабатывали анти- B_1 -гемагглютинины в высоком титре ($1 : 128—1 : 1024$), а их детеныши были поражены гемолитической болезнью (мертворождения, выкидыши, отеки тела и выраженная степень анемии у новорожденных). Во второй серии опытов использованы самки той же линии ($B_1-/-$), но они предварительно — в первые дни их жизни были иммунизированы эритроцитами B_1 -позитивной крови. В последующем (перед спариванием и во время беременности) этим животным тоже проведены повторные инъекции несовместимой крови, однако они проявляли выраженную толерантность к B_1 -изоантигенам плодов: образование анти- B_1 -антител наблюдалось лишь у единичных животных этой группы, причем, в крайне низком титре (до $1 : 4$); их потомство было клинически здоровым, — без признаков гемолитической болезни.

В опытах, проведенных на обезьянах (павианы—гамадрилы), получены результаты, подтверждающие реальную возможность резкого подавления у толерируемых особей реакции специфического антителообразования. Экспериментальные исследования продолжаются. Важно отметить, что данные гематологического обследования детенышей обезьян, систематически «толерируемых» иногруппной кровью, позволяют убедиться в отсутствии вредного влияния таких иммунизаций на состав периферической крови и костного мозга реципиентов (М. И. Куксова с соавт. 1972).

Есть основания надеяться, что изучаемые методы специфической иммунопрофилактики осложнений репродуктивных процессов перспективны в плане возможности будущего использования их в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова Л. С. В кн.: Вопросы иммунологии нормальных и злокачественных тканей, М., 1956, 227.
2. Волкова Л. С. В кн.: Тезисы докл. XI отчетной научной конференции НИИ акуш. и гинекологии Мин. здр. РСФСР, М., 1957, 23.
3. Волкова Л. С. Иммунобиологические взаимоотношения плода и материнского организма. Докт. дисс., М., 1967.
4. Волкова Л. С. Иммунобиологические взаимоотношения организмов матери и плода, «Медицина», М., 1970.
5. Волкова Л. С., М. И. Куксова, Б. А. Лапин. В кн.: Материалы докладов XII Международного конгресса по переливанию крови, М., 1969, 134.
6. Волкова Л. С., А. В. Куксова, В. В. Мальцева, А. В. Андреева, И. С. Гвазава, Н. К. Головкина. В кн.: Сборник научных трудов «Вопросы изосерологии и иммуногематологии», Ленинград, 1972, 57.

7. Косяков П. Н., Г. П. Трибулев. — *ЖМЭИ*, 1937, 18, 2, 270 и *ЖМЭИ*, 1939, 9—10, 128.
8. Куксова М. И. — *Вопр. антропол.*, 1968, № 30, 134.
9. Куксова М. И., А. В. Андреева. В кн.: 10-я научная конференция по возрастной морфологии, физиологии и биохимии, М., 1971, 372.
10. Куксова М. И., Б. А. Лапин, Л. С. Персанинов, Л. С. Волкова, А. В. Андреева. В кн.: Проблемы современной иммунологии, Медицина, М., 1972, 235.
11. Трибулев Г. П. — *ЖМЭИ*, 1944, 12, 49.
12. Трибулев Г. П. Типоспецифические М- и N-антигены человека. Дисс. канд., М., 1949.
13. Трибулев Г. П., П. Н. Косяков. — *ЖМЭИ*, 1938, 31, 6, 105.
14. Witebsky, E., J. Mohn. *J. Exp. Med.*, 1945, 82, 2, 143.

EXPERIMENTAL STUDIES ON SOME PROBLEMS OF THE REPRODUCTION IMMUNOLOGY

*L. S. Volkova, M. I. Kouksova, A. V. Andreyeva, V. V. Maltseva,
I. S. Gvasava, N. K. Golovkina*

Research Laboratory of Experimental Immunobiology (Moscow)
and Institute of Experimental Pathology and Therapy (Soukhoumi),
USSR Academy of Medical Sciences, Moscow, USSR

S U M M A R Y

The authors report experiments with inbred rats and monkeys carried out with the purpose to elucidate some aspects of the immunopathology of intrauterine development. An adequate model of hereditary immune hemolytic disease in monkeys was elaborated for the first time. The results of the trials of new methods for the prophylaxis of hemolytic disease in newborn are described: the barrier method and the method based on the induction of (in the mother's organism) immunologic tolerance to the isoantigens of the foetus' blood.

КЛИНИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ВОПРОСОВ ДИАГНОСТИКИ, ПРОГНОЗА, ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИММУНОКОНФЛИКТНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Л. С. ПЕРСИАНИНОВ, Л. С. ВОЛКОВА, В. М. СИДЕЛЬНИКОВА,
Д. В. УМБРУМЯНЦ, И. П. ИВАНОВ, А. И. ЛЮБИМОВА, О. В. НАДЕИНА

Всесоюзный научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии
Минздрава СССР; НИЛ экспериментальной иммунологии, АМН СССР, Москва

Вопросы иммунологии беременности и родов составляют важнейшую часть общей проблемы репродукции здорового потомства. Успехи, достигнутые в последние десятилетия в области иммуносерологии и генетики, позволяют сейчас по-новому решать целый ряд вопросов практического акушерства (Л. С. Персианинов с соавт., 1970).

В частности, открылись новые возможности в решении задач ранней антенатальной диагностики и специфической профилактики иммуноконфликтной беременности.

В настоящем сообщении изложены результаты собственных исследований, проводимых авторами в течение ряда лет по единому тематическому плану.

Нами, с применением иммунологических методик, изучены физиология и патология внутриутробного развития (Л. С. Волкова, 1970), а также вопросы этиопатогенеза, профилактики и лечения при таких формах осложнений беременности, как изосенсибилизация женщин, поздние токсикозы беременных и повторные невынашивания (Л. С. Персианинов и др., 1971; Л. С. Волкова и др., 1971; Д. В. Умбрумьянц, В. М. Сидельникова и др., 1972; И. П. Иванов и др., 1972). Вопрос о ведении беременности и родов в указанных случаях решается на основании данных комплексного клинико-лабораторного, серологического, иммуногенетического и биохимического анализа.

Хорошо известно, что в настоящее время не имеется еще радикальных и специфических методов предупреждения иммуноконфликтных осложнений в развитии плода у изосенсибилизированных (к резус-АВО и другим изоантигенам) беременных.

Однако во многих случаях положительный эффект достигается благодаря применению мер неспецифического характера, таких, как общеукрепляющая терапия, досрочное родоразрешение и заменная ге-

мотрансфузия новорожденному. Учитывая возможность неблагоприятного влияния преждевременных родов на плод, вопрос о ведении беременности и родов в каждом случае должен решаться индивидуально. В этих целях важнейшую роль приобретают данные оценки общего состояния внутриутробного плода и антенатальная диагностика изоантигенной несовместимости и развития иммуноконфликтных осложнений. Решение последнего вопроса тесно связано с иммуногенетическим анализом крови родителей ожидаемого ребенка, который позволяет еще до беременности или задолго до родов предвидеть возможность возникновения сенсибилизации у матери и развития гемолитической болезни у плода (Д. В. Умбрумянц с соавт., 1972). Вероятность развития иммуноконфликтной беременности у женщин становится реальной при нарушении плацентарного барьера. В связи с этим большое значение имеет применение более точных методов исследования проницаемости плаценты для элементов фетальной крови.

Наша клинико-диагностическая тактика при ведении беременных с ожидаемым развитием иммунного конфликта, в частности, — в отношении женщин с резус-негативным типом крови и имевших отягощенный акушерский анамнез, основана, учитывая вышеуказанное, на комплексном проведении соответствующих исследований. Вопрос о досрочном родоразрешении ставится, как правило, при следующих показаниях: а) анализ генотипа крови родителей позволяет ожидать рождение несовместимого с матерью ребенка; б) повышенное содержание в крови беременной эритроцитов с фетальным гемоглобином, что указывает на повышенную проницаемость плаценты для элементов крови плода; в) в крови матери, исследуемой *in vitro* непрямой реакцией Кумбса, обнаруживаются гемагглютинаты, что может указывать на антигенную несовместимость крови плода с материнской (дородовое определение резус-принадлежности плода по методу Ю. Д. Баллика и Д. В. Умбрумянц); г) частая смена подъемов и спадов титра иммунных антител в крови беременной («скачущий» титр — по определению Л. С. Волковой), что подтверждает предположение о несовместимых сочетаниях крови матери и плода и о нарушениях плацентарного барьера; д) повторные неблагоприятные показатели электрофонокардиограмм плода, что свидетельствуют о нарушении его сердечной деятельности, возникающей в связи с развитием анемической гипоксии миокарда при иммуногемолитической болезни (Л. С. Персианинов, В. М. Сидельникова, 1971); е) данные повторного антенатального биохимического анализа околоплодных вод: повышение оптической плотности билирубина, концентрации общего протеина и глюкозы при одновременном снижении концентрации креатинина, — говорят о выраженных нарушениях в жизнедеятельности плода (В. М. Сидельникова, Р. З. Шпакова, 1972); ж) данные иммуносерологического и генетического анализа околоплодных вод: наличие в водах противорезусных антител при резус-позитивной крови у плода; наличие в водах А-, В-изоантигенов при групповой сенсибилизации матери (Л. С. Волкова, 1970); пол плода — мужской (выживаемость мальчиков намного меньше, чем девочек), — комплекс этих показателей является решающим основа-

нием для постановки вопроса о досрочном родоразрешении изосенсибилизированной женщины и о необходимости подготовки к заменному переливанию крови новорожденному.

Опыт показал, что одновременное использование перечисленных методов исследования позволяет устанавливать возможность развития иммуноконфликтной беременности с точностью до 100% и значительно повышает прогностическую ценность данных такого анализа.

В нашем исследовании впервые поставлен, и в известной мере получил разрешение, вопрос о связи между степенью гетерогенности изоантигенов матери и плода и частотой возникновения иммуноконфликтных реакций во время беременности. Проведено иммуногенетическое обследование родителей, плодов и новорожденных с учетом анализа их крови по 8 изосерологическим системам, включающим 23 антигенных фактора. Показано, что чем больше степень гетерогенности в сочетании изоантигенов крови матери и плода, тем меньше вероятность развития иммунного конфликта между ними. При таких осложнениях беременности, как развитие гемолитической болезни новорожденных, поздние токсикозы беременных или повторные невынашивания различной этиологии, — несовместимость между матерью и плодом была по наименьшему (по одному-двум, до трех) числу изоантигенов.

В качестве профилактических мер при угрозе возникновения гемолитической болезни новорожденных нами используются, кроме общепринятых неспецифических средств, — введения роженицам антирезус иммуноглобулина (при отсутствии симптомов сенсибилизации) и подсадка беременным лоскутов кожи, бравшихся от их супругов (женщинам с выраженной сенсибилизацией). Одновременно назначали небольшие, индивидуально рассчитываемые, дозы преднизолона (Л. С. Персианинов с соавт., 1972).

Впервые в клинической практике метод трансплантации кожного лоскута с успехом используется и в системе комплексного лечения привычного невынашивания беременности у женщин, содержащих в крови гемолизины и иммунные гемагглютинины (А. И. Любимова, О. В. Надеина, 1972 г.). Одновременно было показано сравнительно быстрое исчезновение симптомов заболевания у женщин поздним токсикозом беременных.

Есть основания полагать, что перспективная разработка радикальных методов профилактики иммуноконфликтной беременности найдет положительное разрешение в правильном сочетании и своевременном применении средств специфического и неспецифического характера. Опыт нашей работы подтверждает справедливость этого положения.

Следует, однако, подчеркнуть, что целый ряд вопросов научно-теоретического плана, возникших в связи с описанными клиническими наблюдениями, остается еще нерешенным. Требуют глубокого изучения в частности, вопросы, связанные с механизмом, лежащим в основе положительного влияния подсадки кожи беременным при различных формах патологии. Значительную помощь в успешном изучении этих вопросов, — как мы надеемся, принесет экспериментальное моделирование, к которому мы приступаем в настоящее время и которое будем выполнять в комплексе с болгарскими учеными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова Л. С. Иммунобиологические взаимоотношения организмов матери и плода, Медицина, М., 1970.
2. Волкова Л. С., Л. С. Персианинов, В. М. Сидельникова, Д. В. Умбрумянц. В кн.: Материалы I съезда акушеров-гинекологов Еревана, Ереван, 1971, 323.
3. Иванов И. П., Д. В. Умбрумянц, Л. С. Волкова, А. С. Маслова. В кн.: Проблемы современной иммунологии, Медицина, М., 1972, 245.
4. Любимова А. И., О. В. Надеина. — *Акушерство и гинекология*, 1972 (в печати).
5. Персианинов Л. С., Л. С. Волкова, И. А. Николаевич, В. М. Сидельникова, Д. В. Умбрумянц, А. С. Маслова. В кн.: Проблемы иммунологии и эндокринологии в акушерстве и гинекологии, Каунас, 1970, 48.
6. Персианинов Л. С., В. М. Сидельникова. *Медицинская газета*, 1971, № 54 (3049).
7. Персианинов Л. С., В. М. Сидельникова. В кн.: Тезисы докладов II Международного симпозиума по иммунологии размножения, Варна, Болгария, 1971, 98.
8. Персианинов Л. С., В. М. Сидельникова, Д. В. Умбрумянц. В кн.: Вопросы изосерологии и иммуногематологии, Ленинград, 1972, 74.
9. Умбрумянц Д. В., В. М. Сидельникова, Л. С. Волкова, В. Е. Карташева. В кн. Современные проблемы иммунобиологии, М., Медицина, 1972, 247.
10. Умбрумянц Д. В., Ю. Д. Балика. — *Акушерство и гинекология*, 1969, № 6, 25.

A CLINICAL APPROACH TO THE PROBLEMS OF DIAGNOSIS, PROGNOSIS, PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF IMMUNOCONFLICTING PREGNANCY

L. S. Persianinov, L. S. Volkova, V. M. Sidelnikova, D. B. Umbroumyants, I. P. Ivanov, A. I. Lyubimova, C. V. Nadeina

Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Ministry of Public Health, Moscow and Research Laboratory of Experimental Immunobiology, USSR, Academy of Medical Sciences, Moscow

SUMMARY

The authors describe methods of specific and non-specific immunodiagnosis, prophylaxis and treatment of isosensitized pregnant women and puerpera. The data of the complex examination of the women including consideration of the indices of the immunogenetic, biochemical, electrophysiologic and serologic analyses make possible the diagnosis of the developing immunoconflicting pregnancy practically in all examined women. It was demonstrated for the first time that the higher the degree of heterogeneity of the isoantigens in the blood of the mother and the foetus, the lower the probability of developing an immune conflict between them. In sensitized pregnancies when there is a danger of hemolytic disease of the newborn, the authors recommend repeated skin grafts of the father's allotype; if the mother is sensitized, the infusion of anti-Rh immunoglobulin is recommended.

СПЕРМОАНТИТЕЛА С АНТИЭНЗИМНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Р. П. ПОПИВАНОВ, Т. И. ЕВРЕВ, С. М. ЖИВКОВ, И. Д. БУЛАНОВ

Кафедра общей биологии Медицинской Академии, София, Болгария

В начале нашего века Мечниковым (9), Ландштейнером (6) и Метальниковым (8) были обнаружены антитела против сперматозоидов, названные спермотоксинами. Позднее было доказано существование и других видов спермоантител (спермоагглютинины, спермопреципитины, спермоопсонины, спермолизины и пр.), которые и по сей день являются объектом исследований.

В 1964 г. нами установлено, что нормальные анти-А и анти-В-гем-агглютинины снижают фруктолитическую активность соответственно А и В человеческих сперматозоидов (10). Два года спустя подобные результаты сообщил Акерман (1).

Это позволило нам исследовать влияние спермоантител на процессы обмена сперматозоидов. С этой целью живые сперматозоиды нормальных доноров после трехкратного промывания физиологическим раствором инкубировали в течение 90 мин в кроличьих гетероиммунных антисперматозоидных сыворотках, после чего исследовали потребление кислорода и фруктолитическую активность сперматозоидов. В ходе экспериментов установлено, что спермоантитела не изменяют или повышают на 6—10% потребление кислорода, однако всегда понижают фруктолитическую активность сперматозоидов. Это дало нам основание считать, что исследованные антитела блокируют некоторые ферменты анаэробной фазы дыхания, не влияя на ферменты, участвующие в окислительном расщеплении углеводов.

Так как лактатдегидрогеназа — ЛДГ (в соматических клетках человека обнаружены 5 ЛДГ-изоэнзимов) играет важную роль в переходе сперматозоидов от аэробного к анаэробному дыханию, и наоборот, в связи с тем, что в сперматозоидах содержится и шестой, специфический для них изоэнзим ЛДГ-Х (2,5), в дальнейших исследованиях мы изучали действие гетероиммунных спермоантител на активность лактатдегидрогеназных изоэнзимов сперматозоидов. В этих условиях активность ЛДГ-Х снижается на 28%, а активность ЛДГ-2, 3, 4 и 5 — соответственно на 7%, 14%, 26% и 34%. Это свидетельствует о том, что при гетероиммунизации образуются антитела не только про-

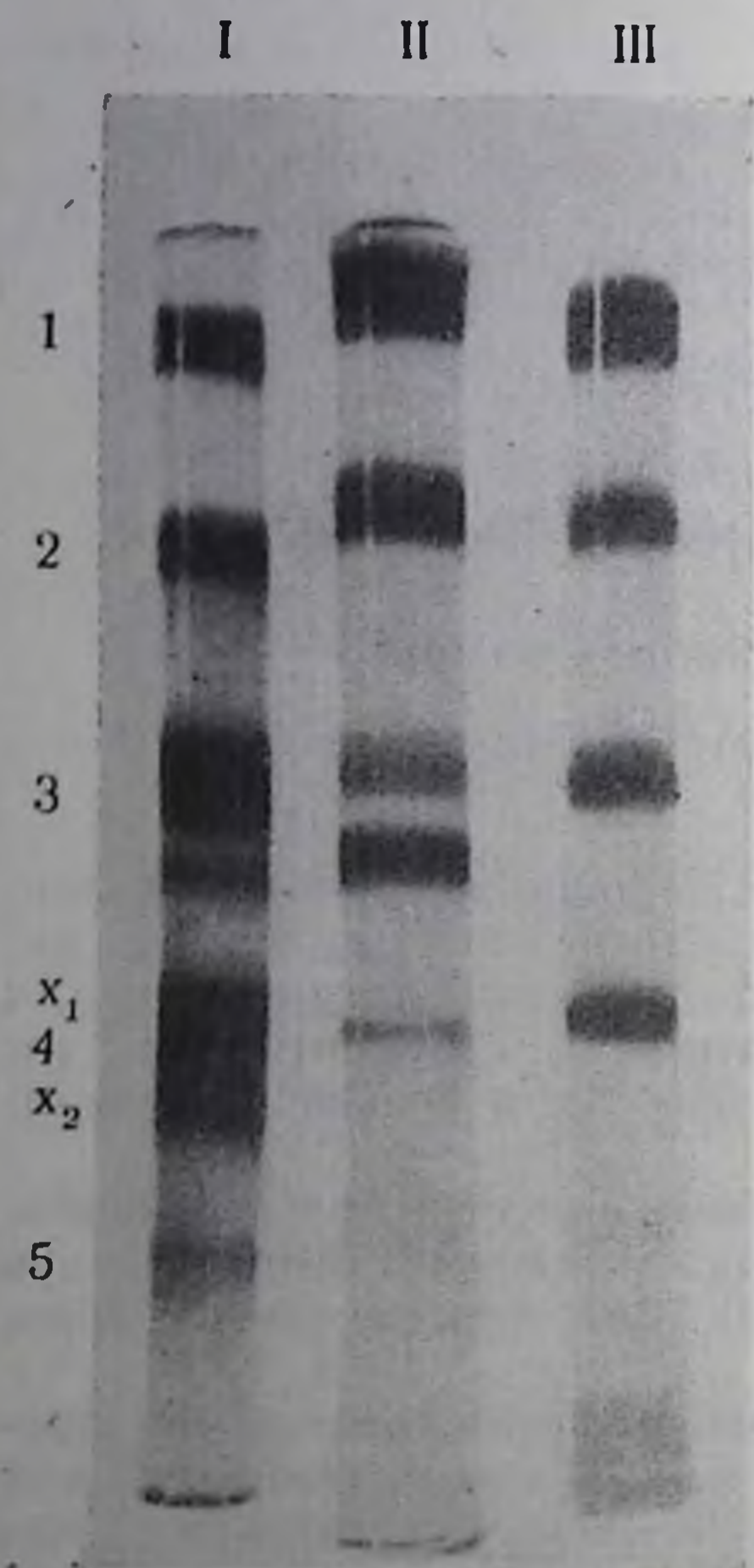


Рис. 1. Лактатдегидрогеназные изоэнзимы, исследованные путем электрофореза на полиакриламидном геле и специфического окрашивания:

1) гомогенат яичка половозрелой морской свинки; по обе стороны изоэнзима ЛДГ-4 расположены специфические для сперматозоидов и сперматогенных клеток изоэнзимы ЛДГ- X_1 и ЛДГ- X_2 . 2) тот же гомогенат после обработки сывороткой; полное ингибирование изоэнзимов ЛДГ- X_1 и ЛДГ- X_2 . 3) ЛДГ изоэнзимы иммунной сыворотки (контроль).

тив ЛДГ-Х, но и против ЛДГ-2, 3, 4 и 5. То обстоятельство, что гетероиммунные антисперматозоидные сыворотки не ингибируют ЛДГ-1 и что их ингибирующее действие нарастает от ЛДГ-2 к ЛДГ-5, в соответствии с теорией о тетрамерной структуре ЛДГ-изоэнзимов (7), позволяет считать, что полученные нами гетероиммунные сыворотки содержат антитела с антиэнзимным действием, направленным против А и С субъединиц ЛДГ, но не против В субъединицы.

Тот факт, что ЛДГ-Х изоэнзим характерен только для спермиев и для сперматогенных клеток в фазе мейоза (3) и что он является антигеном, позволяет высказать предположение об аутоантигенных свойствах ЛДГ-Х. Для проверки этого предположения мы исследовали действие ауто- и изоиммунных антисывороток к тестису на ЛДГ-изоэнзимы, содержащиеся в яичках половозрелых морских свинок. Результаты исследований подтвердили наше предположение — ауто- и изоиммунные антисыворотки полностью ингибируют ЛДГ- X_1 и X_2 изоэнзимы, не изменяя активности остальных ЛДГ изоэнзимов* (рис. 1) (4).

Вышеописанные результаты дают нам основание считать, что использованные в ходе наших исследований антитела блокируют специфические звенья метаболизма сперматозоидов и, следовательно, оказывают антиэнзимное действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аскерман D. — *Nature*. 219, 40, 1968.
2. Влансо А. and W. H. Zinkham. *Science*. 139, 601, 1963.

* Для яичек половозрелых морских свинок характерны два ЛДГ-Х изоэнзима: X_1 и X_2 .

3. Еврев Т., S. Zhivkov and L. Russev. — *Human Heredity*. 20, 70, 1970.
4. Еврев Т., R. Popivanov, I. Podopellov, S. Zhivkov — *Compt. rend Acad. Bulgar. Sci.* 24, 11, 1571, 1971.
5. Goldberg E. — *Science*. 139, 602, 1963.
6. Landsteiner K. — *Centralbl. f. Bakt.*, 25, 546, 1899.
7. Markert C. L., A. Appella — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 103, 915, 1963.
8. Metalnikoff S. — *Ann. Inst. Pasteur*, 14, 1, 1900.
9. Metchnikoff E. — *Ann. Inst. Pasteur*, 13, 1, 1900.
10. Попиванов, Р., Т. Еврев. — *Експ. мед. и морфол.* 1, 16, 1964.

SPERM ANTIBODIES WITH ANTIENZYME ACTIVITY

R. P. Popivanov, T. I. Evrev, S. M. Zhivkov, I. D. Boulanov

Department of General Biology, Medical Academy, Sofia, Bulgaria

S U M M A R Y

It is established that the heteroimmune sperm antibodies block certain enzymes, involved in the phase of anaerobic respiration of the spermatozoa, but do not interfere with the enzymes, which participate in the oxydative degradation of carbohydrates. While heterosperm antibodies inhibit the lactatedehydrogenases (LDH) X, 2, 3, 4 and 5, the auto- and isoantisperm immune antibodies inhibit completely only the LDH-X without changing the activity of the remaining lactatedehydrogenase isoenzymes.

On this ground an inference is made that the hetero- and autosperm antibodies possess an antienzyme activity and that antigenically LDH-X isoenzymes differ from the remaining LDH isoenzymes.

ПРЕНАТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ Rh₀(D) ФЕНОТИПА ПЛОДА ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА КЛЕТОК АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

В. ИЛИЕВА, Р. ВИТАНОВА, И. ПЕНЕВА, А. КУЦЛОВ

Лаборатория иммуногематологии и переливания крови Медицинской академии, София

Состояние плода у Rh-иммунизированной беременной женщины определяется в первую очередь, его Rh-принадлежностью. Возможность рождения здорового ребенка, неповрежденного материнскими антителами, зависит от гомо- или гетерозиготности отца. Если генотип отца Dd, то у 50% детей есть шанс быть Rh-отрицательными. Так как не существует анти-d сыворотки, определение Rh₀(D)-генотипа отца можно осуществить путем фенотипического исследования его родителей, братьев, сестер — т. е. после генеалогического изучения (Jouvenpeaux и Michaud, 1961; Mollison, 1967; Илиева, 1968; Wassilewa и Ilieva, 1971). Однако это не всегда возможно и результаты не всегда однозначны. Даже в случае доказанной гетерозиготности отца остается неизвестной антигенная принадлежность плода. Исследование динамики титра Rh-антител в крови матери во время беременности также не дает надежных данных о Rh-принадлежности плода (Pinon, 1969). Ввиду этого, особое значение приобретает разработка методов прямого доказательства наличия Rh-фактора у плода. Известные возможности в этом отношении представляет широко применяемый в акушерской практике амниоцентез. Кроме исследования содержания билирубина, энзимной характеристики и возможного поиска Rh-антител в околоплодной жидкости (Usalegui—Gomez и Stearns, 1969; Muggay, 1969), стоит вопрос о возможности изучения клеток для прямого определения Rh₀(D)-принадлежности плода. С этой целью используется главным образом абсорбционный метод: амниальные клетки инкубируют с соответствующей антисывороткой и по истечении определенного периода определяют количество поглощенных антител. При помощи такого метода Docos и сотр. (1966) правильно определили Rh-принадлежность 78-из 111 исследованных плодов. Hartemann и сотр. (1967) этим же методом определили Rh-фактор в 45 из 51 исследованных проб амниотической жидкости. Seigneurin и сотр. (1967) посредством непрямой флюоресцентной методики успешно определили Rh-фактор в 90%

исследованных образцов жидкости. Однако Ramesh и соотр. (1970) не удалось определить Rh-принадлежность плода путем исследования клеточного состава амниотической жидкости.

Противоречивые сообщения по этому вопросу и большое теоретическое и практическое значение возможности пренатального прямого определения Rh-принадлежности плода вызвало необходимость проведения настоящего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами обследованы 3 группы беременных: 11 Rh-иммунизированных женщин, у которых амниотическую жидкость брали путем трансабдоминального амниоцентеза в период 34—36 недель беременности; 15 неиммунизированных женщин в период 20—26 недель беременности, у которых были показания для прерывания беременности по разным причинам, 28 рожениц, у которых околоплодную жидкость брали после искусственного вскрытия плодного пузыря или после естественного изгнания плода, на 38—40 неделях.

Получаемую жидкость содержали в стерильной стеклянной посуде при 4° С до начала исследования, проводимого в кратчайший срок. Мы работали по методу A. Jouvenceaux (1970): амниотическую жидкость разливали в 2 пробирки по 5 мл в каждую. После центрифугирования надосадочную жидкость отсасывали, а к клеточным осадкам в каждую пробирку добавляли по 6 капель анти-Rh-сывороток с высоким титром (не ниже 1 : 128). Пробирки взбалтывали и помещали в термостат при 37° С. Через 5 часов, в течение которых смесь периодически помешивали, осажденную клеточную массу промывали 5-кратно 0,9% физиологическим раствором. После последнего промывания физиологический раствор отсасывали, удаляли и в обе пробирки добавляли по 2 капли нормальной человеческой сыворотки AP₀ (IV) группы. Смесь размешивали и элюировали при 56° С в течение 10 мин, после чего пробирки помещали в подогретые до 60° С гнезда центрифуги и центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 3500—4000 об/мин. После центрифугирования элюат быстро брали тонкой пастеровской пипеткой и по 2 капли наливали в резусные пробирки. В одну пробирку добавляли каплю 5% взвеси Rh₀(D)-папаинизированных тест-эритроцитов 0 (I) группы, а в другую — каплю сде папаинизированных тест-эритроцитов, той же группы. Пробирки центрифугировали в течение одной минуты при 750 об/мин. Результаты учитывали при помощи увеличительного стекла (×5) или при слабом увеличении микроскопа. Агглютинация в пробирке с 0, Rh₀(D)-тест-эритроцитами и отсутствие агглютинации в пробирке с сде тест-эритроцитами указывали на Rh₀(D)-принадлежность плода. Для получения точного и надежного результата очень важным является количество исследуемых клеток и достаточный объем получаемой жидкости (необходимо брать для исследования более 10 мл амниальной жидкости).

Результаты исследования околоплодной жидкости сравнивали во всех случаях с результатами определения Rh-принадлежности эритроцитов плода (получаемых путем интракардиальной пункции — в случаях искусственного прерывания беременности) и новорожденного (из пуповинной крови). Определение Rh-фактора эритроцитов проводили по классическому методу — анти-D тест-сывороткой, на стекле.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты наших исследований представлены в следующей таблице.

Т а б л и ц а 1

Определение резус-фактора в клетках амниальной жидкости

Принадлежность эритроцитов плодов (новорожденных)	Число плодов (новорожденных)	Результаты исследования жидкости			Процент совпадений
		Rh+	Rh-	сомнительные	
Rh-отрицательные	4	—	4		100
Rh-положительные	50	45	4	1	90
В том числе от резус-иммунизированных матерей	11	10	1	—	91

Как видно из таблицы, надежность результатов в отношении Rh-положительных плодов высока. Единственный сомнительный результат при исследовании амниотической жидкости мы объясняем недостаточным количеством исследуемого клеточного материала, а может быть и техническими погрешностями при постановке этой чувствительной пробы. Для обеспечения надежности такого результата необходимо провести контрольное (повторное) исследование через определенное время. В наших наблюдениях у Rh-иммунизированных женщин не было детей с Rh-отрицательной кровью, что отчетливо указывает на важное практическое значение такого исследования для акушеров. Все Rh-положительные дети родились с гемолитической болезнью. Только у двух новорожденных болезнь протекла в сравнительно легкой форме и замедленная гемотрансфузия не требовалась. Остальным детям проведено от 2 до 5 обменных переливаний крови.

Амниотическая жидкость, обновляющаяся каждые 3 часа, является важной биологической средой, в которой протекают обменные процессы между матерью и плодом; она содержит важные компоненты метаболизма и другие вещества, характеризующие состояние плода. Не случайно, что после введения в акушерскую практику операции трансабдоминального амниоцентеза, околоплодная жидкость и ее форменные элементы стали объектом всесторонних биохимических, иммуногематологических, цитогенетических, энзимных и гормональных исследований.

В области неонатальной патологии, обусловленной фето-материнским иммунным конфликтом (особенно конфликт на почве Rhesus-несовместимости), спектрофотометрическая оценка уровня билирубина в амниотической жидкости имеет важное диагностическое и прогностическое значение. Однако, на результаты такого исследования нельзя полагаться полностью. Кроме технических и иных причин возможных ошибочных ответов, повышение уровня билирубина в амниотической жидкости может быть вызвано некоторыми заболеваниями матери или другими нарушениями, возникающими у плода. Опыт работы показывает, что гораздо более надежное выявление подозреваемой гемолитической фенопатии обеспечивается одновременным определением в водах и уровня билирубина, и содержания Rh-антигена.

Возможность определения Rh-фактора в клеточном субстрате амниотической жидкости вызывает другой интересный и все еще недостаточно выясненный вопрос — о времени формирования указанного антигена в фетальных тканях. Rh₀(D)-антиген в эмбриональном периоде развития определяется рано. Stratton (1943) обнаруживал этот антиген в эритроцитах эмбриона длиной 48 см, а П. Н. Косяков и Муравьева (1962) определяли хорошо выраженные cde-антигены на 10—14 неделе внутриутробного развития. Furuhashi и сопр. (1954) показали, что Rh-антиген 5—6-месячного плода обуславливает способность эритроцитов к агглютинации в 300 раз сильнее, чем у взрослого индивида. Наблюдения Л. Н. Лемановой (1964) также указывают на значительно повышенную агглютинабельность антенатальных эритроцитов, содержащих C-, D- и E- антигены, по сравнению с эритроцитами послеродового периода. Может быть в этой особенности следует искать объяснение факта, что Rh-антиген обнаруживается в клетках амниальной жидкости, несмотря на то, что он не выявлен в эпителиальных клетках взрослого человека (Ashhurst и сопр., 1956). Следует отметить, однако, что некоторые исследователи смогли доказать наличие Rh-антигена в различных органах — в печени, почках, селезенке, мышце, плаценте. П. Н. Косяков (1952) обнаружил Rh-антиген в злокачественных и доброкачественных опухолях человека.

Наши исследования, подтверждая при помощи другой методики наблюдения Ducos и сопр. (1966), Hartemann и сопр. (1967) и Seignepin и сопр. (1967), позволили получить новые доказательства наличия Rh₀(D)-фактора в клеточном составе околоплодной жидкости.

АДРЕСА АВТОРОВ СТАТЕЙ СБОРНИКА

- АЙРАПЕТЬЯН, Г. П., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- АЛЕКСАНИЯН, Ю. Т., ст. науч. сотр., канд. мед. наук., Ереванский медицинский институт, Ереван, Арм. ССР.
- АНДРЕЕВА, Л. Т., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- АНИСКИН, Е. Д., ст. науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- АНТОНОВ, Л., науч. сотр., Лаборатория иммуногематологии и переливания крови Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски 1, Болгария.
- БОТЕВ, Б. А., профессор, Кафедра общей биологии Медицинской академии, директор Института зоологии Болг. АН, София, бул. Руски 1, Болгария.
- БОЧКО, Г. М., науч. сотр., канд. мед. наук — НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- БРАТАНОВ, К. Ц., академик Болг. АН, иностр. чл. ВАСХНИЛ, директор Ин-та биологии и патологии сельско-хоз. животных Сельско-хозяйственная академия им. Г. Димитрова, София 13, бул. Ленина 67, Болгария.
- БУЛАВА, Г. В., ст. лаборант, Всесоюз. НИ Институт акушерства и гинекологии, Москва Г-435, ул. Еланского, 2.
- БУЛАНОВ, И. Д., ст. ассистент, Кафедра общей биологии Медицинской академии София 31, ул. Г. Софийски 1, Болгария.
- ВАСИЛЕВ, Б., доцент, Кафедра акушерства и гинекологии Медицинской академии, София, ул. Бр. Миладиновци 112, София.
- ВАСИЛЕВА, Л., ст. ассистент, Кафедра вирусологии Медицинской академии, ул. Бяло море 8, София, Болгария.
- ВИТАНОВА, Р., ординатор, Центр охраны материнства и детства Медицинской академии, София, ул. М. Ташев 2, Болгария.
- ВОЛКОВ, М. Н., профессор, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН, СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ВОЛКОВА, Л. С., профессор, доктор мед. наук, зав. Лаборатории иммунологии Всесоюз. НИ Ин-та акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Еланского 2.
- ВЫЛЧАНОВ, В. Х., профессор, доктор биол. наук, Лаборатория клеточной иммунологии Института зоологии Болг. АН, София, бул. Руски 1, Болгария.
- ГВАЗОВА, И. С., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, Всесоюз. НИ Ин-т акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Еланского 2.
- ГЕОРГИЕВ, И., профессор, зав. Кафедрой гистологии и эмбриологии Высшего медицинского института, Пловдив, Болгария.
- ГОНЧАРЕНКО, И. М., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, Москва А-130, Морская ул., д. 9 кв. 25.
- ГЛИНСКИЙ, И. А., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН, СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ГОЛОВКИНА, Н. К., науч. сотр., Всесоюз. НИ Ин-т акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Еланского 2.
- ГУБЕНКО, С. Н., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.

- ГУДКОВА, Р. Б., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ДАХИНА, Н. Н., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ДИКОВ, В. В., ст. науч. сотр., канд. биол. наук, Институт биологии и патологии размножения сх. животных СХА, София 13, бул. Ленина 67 (Болгария).
- ДУДУНКОВ, З., науч. сотр. Центр. онкологии и болезней крови Медицинской академии, София, Дървенишко шосе 8 (Болгария).
- ЕВРЕВ, Т. И., гл. ассистент, Кафедра общей биологии Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски 1 (Болгария).
- ЖИВКОВ, С. М., гл. ассистент, Кафедра общей биологии Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски 1 (Болгария).
- ЖУКОВ-ВЕРЕЖНИКОВ, Н. Н., академик АМН СССР, профессор, директор НИ Лаборатории экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ЖУКОВ, Г. Н., науч. сотр. НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ЗЫКОВ, Ю. В., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ИВАНОВ, И. И., профессор, доктор мед. наук, Всесоюз. Ин-т акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Еланского 2.
- ИЛИЕВА, В. А., ст. науч. сотр. канд. мед. наук, зав. Центра иммуногематологии и переливания крови Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски 1 (Болгария).
- КАЦУЛОВ, А., ст. ассистент, Кафедра акушерства и гинекологии Медицинской академии, София 31, Г. Софийски 1 (Болгария).
- КАПИЧНИКОВ, М. М., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, руководитель группы при НИ Лаборатории экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- КЕХАПОВ, И. Р., ст. науч. сотр., канд. биол. наук, Лаборатория клеточной иммунологии Института зоологии Болг. АН., София, бул. Руски 1 (Болгария)
- КИРОВ, К. И., доцент, Кафедра общей биологии Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски 1 (Болгария).
- КЛИМОВ, В. Ю., ст. науч. сотр. НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- КЛИМОВА, М. Ю., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8
- КОВАЛИЕВА, В. М., доцент, канд. мед. наук, 2-МОЛМИ, Кафедра физики, Москва, ул. Пироговская, 1.
- КОЗЛОВ, В. К., ст. науч. сотр., доктор биол. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- КОЗЛОВСКАЯ, З. П., науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- КОНСТАНТИНОВ, П. А., науч. сотр., канд. мед. наук, Физико-технический институт Московской обл., ст. Долгопрудная, Савеловской жел. дороги.
- КОРОСТЕЛЕВА, В. С., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, Институт вирусологии АМН СССР им. Д. И. Ивановского, Лаборатория иммунологии, Москва Д-98, 1-Щукинский пр., 24.
- КОСОВА, П. И., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- КОСЯКОВ, П. Н., член-корр. АМН СССР, профессор, Институт вирусологии АМН СССР им. Д. И. Ивановского, Лаборатория иммунологии, Москва Д-98, 1-Щукинский пр., 24.
- КОЧЕРГИНА, Н. И., науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315 Балтийская ул., 8
- КРЮКОВ, В. Г., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- КРЮКОВА, Г. В., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- КУЗНЕЦОВА, Н. И., ст. науч. сотр., доктор мед. наук, зав. Лаборатории иммунологии ЦНИ института судебной психиатрии им В. П. Сербского Москва Г-34, Кропоткинский пер., 23.
- КУКЦОВА, М. И., ст. науч. сотр. канд. биол. наук, Всесоюз. НИ Институт акушерства и гинекологии, Москва Г-435, ул. Еланского 2.

- КУЛАГИН, А. Н., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ЛАЗАРЕНКО, Л. Ф., ассистент, канд. мед. наук, г. Краснодар 27, поселок Паншовский, ул. Криничная, д. 102.
- ЛОМАКИН, М. С., ст. науч. сотр., докт. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ЛЮБИМОВА, А. И., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, Всесоюз. НИ Институт акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Еланского 2.
- МАЗИНА, Н. М., ст. науч. сотр., доктор мед. наук, Институт ревматизма, Москва К-31, Петровка 25.
- МАЙСКИЙ, И. Н. профессор, доктор мед. наук, руководитель группы НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- МАЛЬЦЕВА, В. В., науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- МАРХОЛЕВ, Л. Х., ст. ассистент, Кафедра общей биологии Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски 1 (Болгария).
- МОИСЕЕВ, З. А., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- НАДЕИНА, О. В., врач, Всесоюз. НИ Институт акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Еланского 2.
- НАКОВ, Л. С., доцент, Кафедра общей биологии Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски 1 (Болгария).
- НАСТОЯЩАЯ, Н. Н., науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ПЕНЕВ, Д., доцент, канд. мед. наук, Кафедра анатомии Медицинской академии, София 31 ул. Г. Софийски 1 (Болгария).
- ПЕНЕВ, И., ст. науч. сотр., Центр охраны материнства и детства, София 30, ул. М. Ташев, 2 (Болгария).
- ПЕРСИАНИНОВ, Л. С., академик АМН СССР, профессор, директор Всесоюз. НИ Ин-та акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Елагина 2.
- ПЕТРЯШИНА, М. П., ст. лаб., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ПОДОПЛЕЛОВ, И. И., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, руководитель группы НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ПОЗДНЯКОВ, В. И., ассистент, 2-МОЛМИ, Кафедра физики, Москва, ул. Пироговская, 1.
- ПОКРОВСКАЯ, Т. А., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- ПОПИВАНОВ, Р. П., член-корр. Болг. АН, профессор, зав. Кафедрой общей биологии Медицинской академии, София 31, ул. Г. Софийски (Болгария).
- ПОТАПОВ, М. И., профессор, доктор мед. наук, Госуд. НИ Институт судебной медицины, Москва К-6, Садово-Триумфальная ул., 13.
- РУМЕНОВ, И., Начальник Хирургического отделения, Окръжен онкологичен диспансер, София (Болгария)
- РУСЕВ, Л. Н., зав. отделом патологической анатомии III городской больницы София (Болгария).
- РЫБАКОВ, Н. И., ст. науч. сотр., доктор мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- СААКОВ, А. К., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- САМОЙЛЕНКО, А. С., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- СИДЕЛЬНИКОВА, В. М., науч. сотр., канд. мед. наук, Всесоюз. НИ Институт акушерства и гинекологии МЗ СССР, Москва Г-435, ул. Елагина 2.
- СОКОЛОВА, Е. В., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- СУВОРОВА, Г. В., ст. науч. сотр., докт. мед. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.
- СУХОВ, Ю. Н., науч. сотр., НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул., 8.

- СЫРНЕВА, Ц. Н., науч. сотр., канд. мед. наук, Республиканский НИИ Институт скорой медицинской помощи им. Н. И. Пирогова, Отдел переливания крови и тканевой совместимости, София (Болгария).
- ТИМОФЕЕВ, В. Т., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, Москва И-740, Кленовый бульвар, д. 9, кв. 87.
- ТУМАНОВ, А. К., профессор, доктор мед. наук, Гос НИ институт судебной медицины, Москва К-6, Садово-Триумфальная ул., 13.
- УМБРУМЯНЦ, Д. В., науч. сотр., канд. мед. наук, Всесоюз. НИ Институт акушерства и гинекологии, Москва Г-435, ул. Еланского, 2.
- ФЕЙГЕЛЬМАН, С. С., ст. науч. сотр., канд. мед. наук, Больница № 62, Московская область, Красногорский р-он, п/о Степановское.
- ЧИМИРОВ, О. Б., науч. сотр., г. Алма Ата 74, Заводская 14.
- ШАДРИН, Б. П., науч. сотр. Московский городской ОТКЗ НИ институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Лаборатория иммунологии, Москва И-10, Б. Колхозная пл., 3.
- ШАРЫЙ, Н. И., науч. сотр., канд. биол. наук, НИ Лаборатория экспериментальной иммунологии АМН СССР, Москва А-315, Балтийская ул. 8.
- ШИВАЧЕВ, Х., ст. ординатор, Онкологический диспансер, Окружная больница, София (Болгария).
- ШИНДАРОВ, Л., профессор, директор Центра заразных и паразитарных болезней Медицинской академии, София (Болгария).

