

672.014
4923

И.Я. УЧИТЕЛЬ

МАКРОФАГИ В ИММУНИТЕТЕ

612.014

У923

И.Я. УЧИТЕЛЬ

МАКРОФАГИ В ИММУНИТЕТЕ

612.017
У 923

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

И. Я. УЧИТЕЛЬ

МАКРОФАГИ В ИММУНИТЕТЕ



МОСКВА • «МЕДИЦИНА» • 1978

ИЗДАНИЕ ОДОБРЕНО И РЕКОМЕНДОВАНО К ПЕЧАТИ
НАУЧНО-ИЗДАТЕЛЬСКИМ СОВЕТОМ ПРЕЗИДИУМА АМН СССР

Макрофаги в иммунитете. И. Я. УЧИТЕЛЬ. М., «Медицина», 1978, 200 с., ил.

В монографии рассмотрен широкий спектр функций макрофагов, которые играют важную роль в естественном и приобретенном иммунитете и поддержании гомеостаза организма. На основании критического разбора большого теоретического материала и собственных экспериментальных данных оценивается участие макрофагов в естественном иммунитете, распознавании, превращении (детоксикации) и выделении чужеродных агентов, в индукции антителообразования и регуляции гомеостаза организма. Излагаются также данные о происхождении, дифференциации, классификации и структуре клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы, о функции лизосомного аппарата клеток этой системы, его наследственных аномалий и роли в иммунитете и патологии. Подробно рассматриваются данные об участии макрофагов в кооперативных взаимодействиях клеток при иммуногенезе и их способности к синтезу ряда растворимых факторов, выделяемых во время клеточных взаимодействий, а также к синтезу защитных белков типа интерферона, лизоцима, некоторых компонентов комплемента и т. д. Освещаются методические приемы, позволяющие регулировать функцию макрофагов и их лизосомного аппарата, а также анализируется роль в сохранении гомеостаза клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы и центральные механизмы регуляции их функции. Подробно описаны методические приемы изучения макрофагов и их лизосомного аппарата.

Монография предназначена для иммунологов.

В книге 29 рис., 2 табл., библиография — 198 названий.

Macrophages in the Immunity. I. Ya. UCHITEL. M., «Meditsina», 1978, 200 pp., Ill

A wide spectrum of macrophages functions permitting them to play an important role in the natural and acquired immunity and in maintaining constant homeostasis of the organism is described in the monograph. On the basis of a critical analysis of a volumetrical theoretical material and the author's experimental data an evaluation is given of the macrophages participation in the natural immunity, recognition, processing, detoxication and excretion of foreign agents, in the induction of the antibody formation and in the organism homeostasis control. Data are given on the origin, differentiation, classification and structure of the cells of the monocytic phagocytosing system (MPS). Special sections are devoted to the function of the lysosomal apparatus of the MPhS cells, its hereditary anomalies and its role in the immunity and pathology. Data on the macrophages participation in the cooperative interactions of cells in immunogenesis and their ability to synthesize a number of soluble factors secreted during the cell interactions as well as to synthesize protective proteins of interferon and lysozyme type and some components of complement are described in detail. Methods permitting control of the macrophages function and their lysosomal apparatus are elucidated. The role of MPhS cells in the maintaining of homeostasis and the central mechanism of their function control is analysed. A special chapter contains a detailed description of the methods used for investigation of macrophage and their lysosomal apparatus.

У 51000—252 188—78
039(01)—78

ВВЕДЕНИЕ

Еще до классических работ И. И. Мечникова публиковались наблюдения многих натуралистов о поглощении красителей, эритроцитов и позднее бактерий лейкоцитами простейших, земноводных и высших животных и даже высказывались предположения о значении этого явления для защиты организма от инфекции. Однако истинное понимание и блестящее обоснование громадной роли фагоцитов в защитных реакциях высших животных началось с исследований И. И. Мечникова (1905), который не только описал эти клетки и захват ими различных веществ у разных видов животных, начиная от червей и актиний и кончая млекопитающими, но и в течение почти 30 лет накапливал факты для доказательства общеприродного значения этого процесса, названного им фагоцитозом. Он показал, что клетки, способные захватывать чужеродные агенты выполняют у низших животных пищеварительную функцию. В ходе филогенеза это примитивное пищеварение заменяется пищеварительной системой, в которой специальные клетки секретируют разнообразные ферменты, переваривающие пищу. Тем не менее и у высших животных макрофаги сохраняют свои пищеварительные способности, которые играют важную роль в защите от агентов, попадающих в организм парентеральным путем.

И. И. Мечникову удалось проследить изменения спирохеты возвратного тифа в лейкоцитах обезьяны, переваривание вибриона птичьей септицемии в лейкоцитах невосприимчивой свинки, стрептококков, вызывающих рожу, в лейкоцитах человека.

Фагоцитарная теория И. И. Мечникова является до настоящего времени основой наших представлений о естественном иммунитете. В последние годы накапливаются сведения о роли фагоцитов и в специфическом иммунитете.

Хорошо известная дискуссия между И. И. Мечниковым и противниками его теории, считавшими, что фундаментом иммунитета являются механизмы специфической защиты, продолжается на новом уровне и в наши дни.

В силу того, что антителообразование и клеточные феномены специфического иммунитета оказались удобной моделью для исследования, они привлекли внимание большого числа исследователей разных специальностей. В настоящее время многие стороны механизма специфического иммунитета и, в частности, биосинтеза антител можно считать расшифрованными.

Совсем иначе обстоит дело с естественным иммунитетом.

Следует признать, что понимание механизмов, лежащих в его основе, ненамного продвинулось вперед со времен И. И. Мечникова.

Несомненным остается факт, что в естественном (врожденном) иммунитете фагоцитоз играет первостепенную роль. В некоторых случаях фагоцитарная реакция полностью обеспечивает естественную устойчивость организма к определенным возбудителям, классическим примером чего может служить врожденный видовой иммунитет к сибирской язве у лягушек или кур, который обеспечивается у них энергичным фагоцитозом палочки сибирской язвы. Стоит понизить активность фагоцитов (снижением температуры тела курицы), как животное тут же заболевает.

Практически все основные факторы естественного иммунитета, начиная от большого числа пищеварительных ферментов, компонентов системы комплемента, фагоцитина, лизоцима (мурамидазы), интерферона и кончая эндогенным пирогеном и разнообразными медиаторами, участвующие в межклеточных взаимодействиях, необходимых для осуществления защитных реакций, синтезируются в фагоцитах. Вместе с тем защитная роль фагоцитов бесспорна не только при естественном, но и при специфическом иммунитете, хотя последнему в течение ряда лет не уделяли достаточного внимания.

А. М. Безредка (1929) заметил, что фагоцитарная теория обязана наиболее выдающимися победами своим противникам. Каждый раз, когда им удавалось, по их мнению, доказать ее несостоятельность, они в действительности высказывали новый довод в ее подтверждение.

По мере того как клонально-селекционная теория Барнета (1971) стала приобретать господствующее положение, фагоцитам, в том числе и макрофагам, стали отводить все более скромную роль в феноменах иммунитета.

Высказывались мнения о том, что роль макрофагов в приобретенном иммунитете сводится к пассивной подаче или передаче ими антигена иммунокомпетентным клеткам. Иммунологические феномены часто рассматривали как результат взаимодействия двухклеточной системы — Т- и В-лимфоцитов. Не учитывали роль макрофагов в распознавании чужеродности и, следовательно, в сохранении гомеостаза. Однако по мере совершенствования приемов исследования при работе с суспензиями Т- и В-лимфоцитов, максимально очищенными от макрофагов, стало очевидным обязательное участие последних (или особого субкласса их) в индукции специфического ответа как на тимусзависимые, так и на тимуснезависимые антигены вне связи с физико-химической природой антигенов (растворимые или корпускулярные).

Принципиально новым и имеющим общебиологическое значение следует считать высказанное в последние годы предположение об участии макрофагов в осуществлении неспецифического гомеостатического контроля над размножением в организме клеток с измененными параметрами роста.

Этот неиммунологический механизм надзора может играть важную роль в гомеостатическом контроле нарушений клеточного роста в нормальном организме и, в частности, в развитии опухолей.

Все изложенное выше свидетельствует не только о важной роли функции фагоцитов в механизмах иммунитета, но и о необходимости тщательного их изучения, поскольку здесь могут крыться подходы к познанию механизмов естественного иммунитета.

Поскольку знания в области клеточных основ иммунитета накапливаются в последние годы с возрастающей быстротой, нам представляется интересным систематизировать имеющиеся в настоящее время сведения о роли и функции макрофагов в иммунитете, в том числе и данные, полученные в нашей лаборатории, и проанализировать возможное участие макрофагов в сохранении гомеостаза, невосприимчивости вообще и специфическом иммунитете в частности.

Глава I

КЛЕТКИ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФАГОЦИТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

Происхождение, созревание и классификация

Мононуклеарные фагоциты представляют собой большую, широко распространенную и морфологически гетерогенную группу клеток мезодермального происхождения. Они имеются практически во всех тканях и полостях. Особенно много их в костном мозге, печени, селезенке, соединительной ткани и крови.

Макрофаги найдены у всех животных. У большинства примитивных беспозвоночных они выполняют функцию пищеварения. У высших животных макрофаги сохраняют способность к перевариванию чужеродных агентов, что лежит в основе их защитной функции. У млекопитающих макрофаги появляются на ранних стадиях онтогенеза. Они широко распространены в эмбриональных тканях. На ранних этапах эмбриогенеза клетки, способные к фагоцитозу, можно обнаружить внутри сосудов и в периваскулярной ткани. Они никогда не встречаются в бессосудистой мезенхиме, что дало основание считать эти клетки потомками «примитивных лейкоцитов» (Andersen, Matthiessen, 1966).

Несмотря на то что функциональное развитие клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы (МФС) происходит в период внутриутробной жизни плода, оно никогда не достигает уровня, наблюдающегося у взрослых животных (Reade, 1968). Тем не менее способность к синтезу появляется у макрофагов уже на ранних этапах онтогенеза: эмбриональные макрофаги способны синтезировать различные компоненты комплемента и гидролитические ферменты (Propp, Alper, 1968). У мышей эмбриональные макрофаги встречаются в трех формах, каждая из которых содержит значительные количества кислой фосфатазы в цитоплазме, подобно перитонеальным макрофагам взрослых животных, что позволяет отнести их к макрофагам (Evans, 1970).

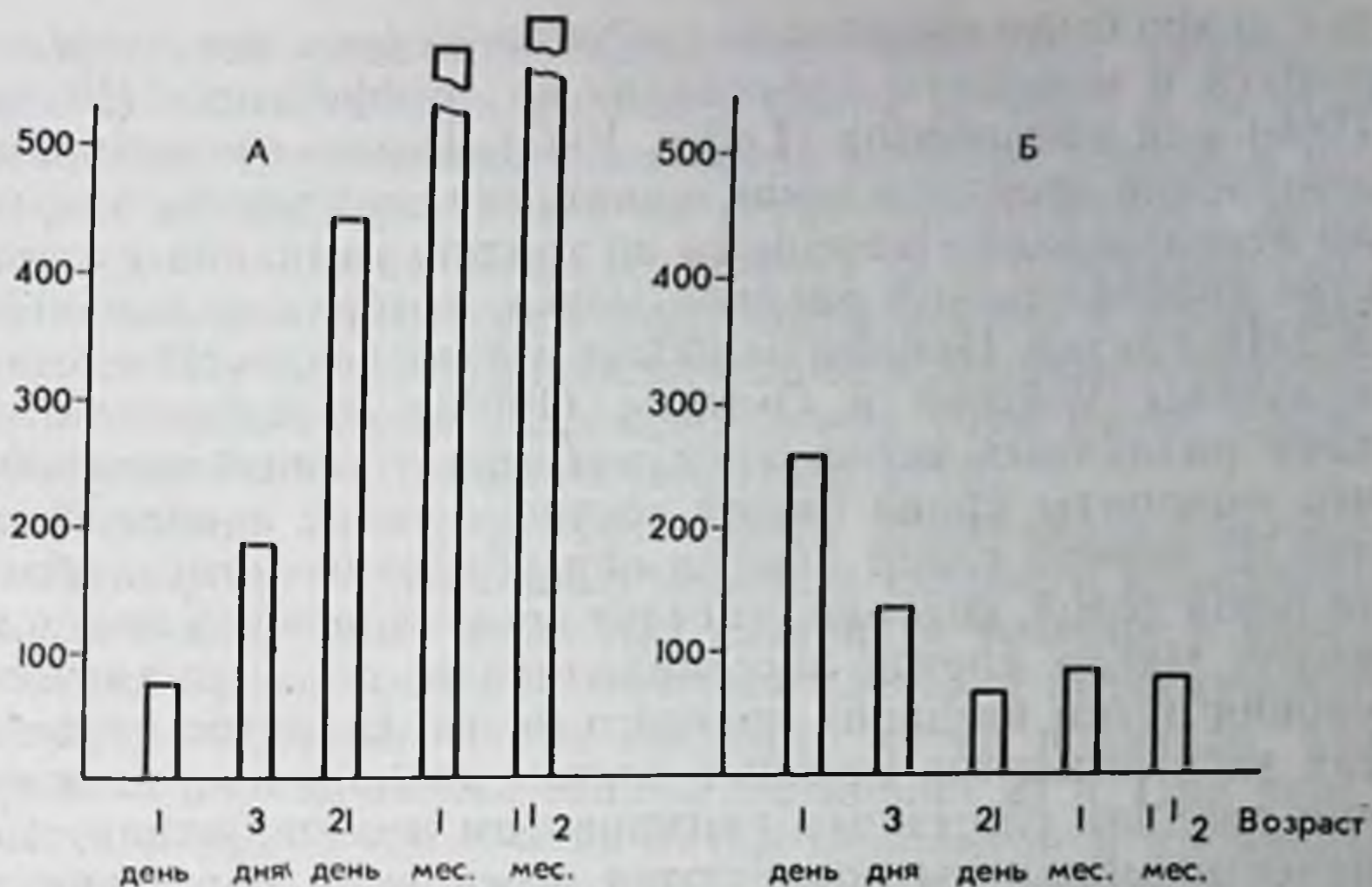


Рис. 1. Возрастные изменения активности катепсина D в клетках перитонеального экссудата (А) и в клетках селезенки (Б) у мышей линии СВА.

На оси ординат — мкг тирозина на 1 мг белка; на оси абсцисс — возраст.

В опытах, проведенных в нашей лаборатории Л. Г. Зайцевой (1976), была обнаружена интересная закономерность. Результаты определения активности катепсина D в клетках перитонеального экссудата (КПЭ) и в клетках селезенки в различные сроки после рождения у мышей линии СВА, выраженные в микрограммах тирозина на 1 мг белка, представлены на рис. 1.

Как видно из данных, приведенных на рис. 1, в первые сутки после рождения активность катепсина в КПЭ была низкой и неуклонно возрастала с возрастом животного. В клетках селезенки, наоборот, самую высокую активность этого фермента наблюдали в первые сутки жизни, затем она несколько понижалась. Забегая вперед, следует отметить, что при различных условиях опытов мы часто обнаруживали обратную зависимость между активностью лизосомных ферментов в КПЭ и клетках селезенки.

Несмотря на то что мононуклеарные фагоциты исследуются в течение многих лет и свойства их установлены, до последнего времени их не рассматривали как единую систему, имеющую общий источник происхождения. Не

так давно были высказаны предположения о том, что макрофаги и моноциты происходят из лимфоцитов (Elves, 1966) или миелоцитов (Leder, 1967). Новые возможности в изучении происхождения и кинетики этих клеток открыло использование меченого по тритию тимидина в качестве специфической ядерной метки, которая включается в ДНК клетки. Первые наиболее четкие результаты были получены Vokman и Gowans (1965). Экспериментами двух различных типов этим авторам удалось показать, что моноциты крови имеют костномозговое происхождение. В первой серии опытов они облучали крыс сублетальной дозой, которая угнетает кроветворение в костном мозге. Число клеток восстанавливали до нормального уровня путем введения костного мозга. В других вариантах экспериментов меченые клетки разного происхождения вводили сингенным реципиентам и обнаружили, что меченые моноциты появляются в основном после введения меченых клеток костного мозга и в очень небольшой степени — клеток селезенки.

Мононуклеарные фагоциты костномозгового происхождения являются пролиферирующими клетками, так как 30% их включает меченый тимидин *in vitro*, в то время как моноциты крови и тканей практически не способны к его включению в этих условиях. Ряду исследователей удалось показать, что среди мононуклеарных фагоцитов костного мозга можно выделить два отличающихся друг от друга типа клеток. Оба они прилипают к стеклу и способны к фагоцитозу, однако отличаются по морфологии и количеству. 80—85% клеток являются моноцитами, правда, отличающимися по величине и морфологии от моноцитов крови. Остальные 15—20% клеток с диаметром от 14 до 20 мкм имеют базофильную цитоплазму и большие ядра. Они дают положительную реакцию на пероксидазу.

По степени зрелости эти клетки относят к промоноцитам (van Furth, Cohn, 1968; van Furth et al., 1970) или предшественникам моноцитов. Они отличаются и по способности включать ^3H -тимидин *in vitro*; после инкубации в течение суток метка включается не более чем в 2% моноцитов и около 50% промоноцитов.

При импульсной метке *in vivo* количество меченых промоноцитов остается постоянным в течение суток, в то время как индекс метки в моноцитах возрастает за это время до 33%.

Изучение динамики включения меченого тимидина при культивировании костного мозга *in vitro* и *in vivo* показало, что максимальное число меченых клеток в пуле клеток костного мозга на сутки предшествует пику метки в моноцитах. Эти наблюдения дали основание считать, что мононуклеарные фагоциты костного мозга являются быстроделющимися клетками и предшественниками моноцитов любого происхождения (van Furth, Cohn, 1968; van Furth, Dieselhoff-Den Dulk, 1970).

Изучение кинетики круговорота циркулирующих моноцитов у крыс с помощью подсчета скорости выведения заранее длительно меченных клеток (в течение 8 дней) и определения процента меченых клеток в последующие 10 дней после окончания введения метки показало, что средний период их полужизни составляет 22 ч. При пересчете на абсолютное количество моноцитов в кровяном русле, основанном на подсчете клеток с пероксидазной активностью, круговорот моноцитов равен примерно $3,6 \times 10^6$ клеток в день (Cohn, 1968). Предполагают, что пул предшественников моноцитов обновляется трижды до того, как зрелые моноциты поступают в кровяное русло. По данным van Furth, средний период полужизни циркулирующих в крови моноцитов у мышей равен 1 сут и транзитное время, за которое они поступают в ткани, равно приблизительно 32 ч.

Скорость обмена в тканях мала (примерно от 1 до 2 мес), а в брюшной полости она превышает 0,1% в 1 ч (van Furth, Cohn, 1968). На рис. 2¹ схематично приведено происхождение тканевых макрофагов по представлению van Furth.

Пул зрелых моноцитов в костном мозге очень невелик и моноциты выходят в кровяное русло сразу после образования. Это видно из того, что тимидиновая метка включается в моноциты крови за тот отрезок времени, за который не успевает включиться в остальные лейкоциты крови.

Не все исследователи согласны с тем, что единственным источником макрофагов брюшной полости являются моноциты крови. При повторном введении ³H-тимидина все моноциты и большие лимфоциты крови включают метку, в то время как в экссудате число меченых макро-

¹ По Международной гистологической номенклатуре клетки Купфера называются звездчатыми эндотелиоцитами.

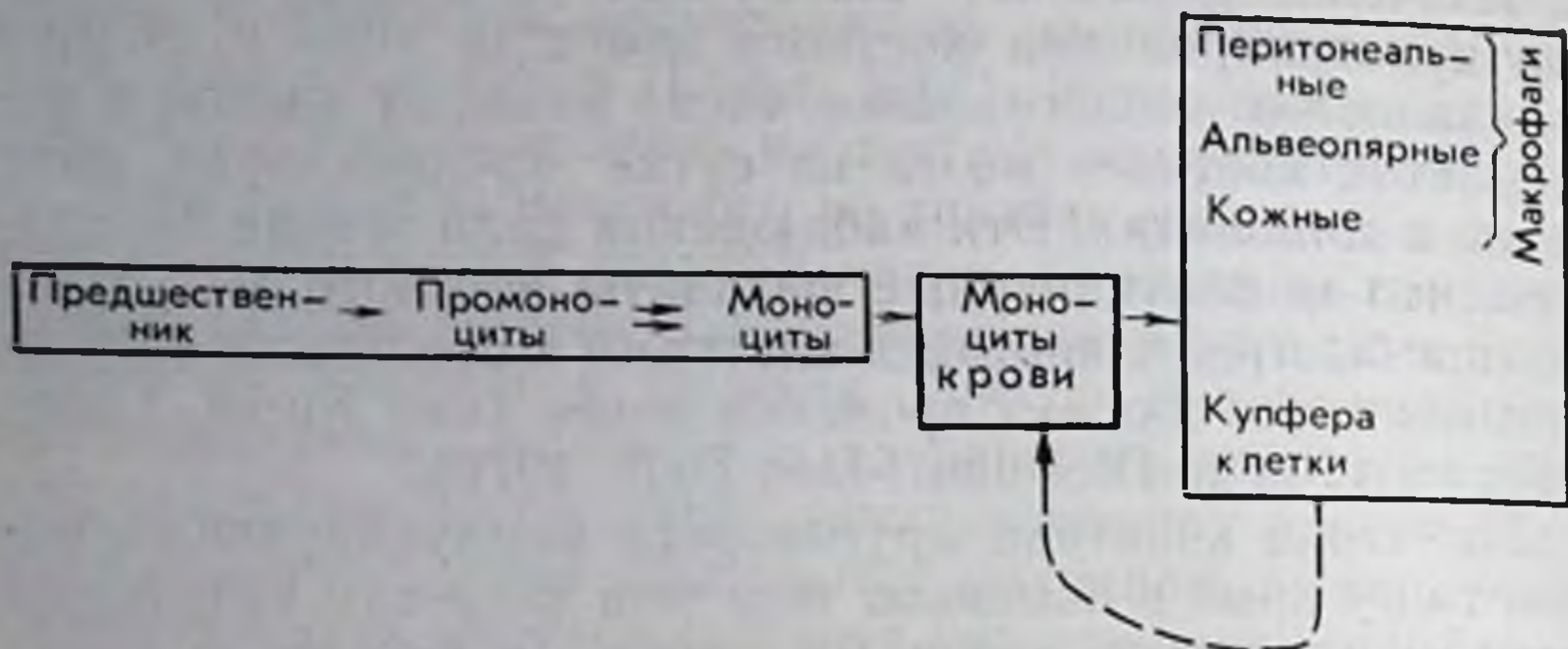


Рис. 2. Происхождение тканевых макрофагов (по van Furth, Thompson, 1971).

фагов никогда не превышает 90%. Анализ поступления и митотической активности клеток в очаге воспаления с помощью метки позволяет предполагать, что макрофаги в нем происходят не только за счет моноцитов крови, но, возможно, и за счет имеющихся в различных тканях недифференцированных предшественников их или недифференцированных клеток с морфологической характеристикой малых лимфоцитов. Высказано мнение, что малые лимфоциты могут быть предшественниками не только местно пролиферирующих макрофагов, но и моноцитов крови (Hess et al., 1971). В зависимости от локализации мононуклеарные клетки, происходящие из костного мозга, приобретают различные морфологические и функциональные свойства.

Характерной особенностью промоноцитов является наличие пероксидазы, в то время как в моноцитах крови ее гораздо меньше, а в макрофагах она вообще отсутствует (van Furth et. al., 1970).

Моноциты крови являются, как уже упоминалось, относительно незрелыми клетками, которые по мере созревания становятся макрофагами и приобретают специфический макрофагальный антиген, являющийся, по-видимому, антигеном дифференциации (Virolainen, 1971). Feldman и соавт. (1972) с помощью меченой антисыворотки к перитонеальным макрофагам выявили этот антиген на поверхности мембран у 85—100% перитонеальных макрофагов, 80—90% альвеолярных макрофагов, 35—50% селезеночных макрофагов и только у 10% циркулирующих в крови моноцитов.

С помощью высокоспецифичной и тщательно адсорбированной тимоцитами и эритроцитами мышей кроличьей сывороткой против макрофагов мышей обнаружили антиген, специфичный для макрофагов мышей практически любого происхождения и функционального состояния. Этот антиген дает перекрестные реакции с перитонеальными макрофагами крыс и хомяков, его не обнаружили в неприлипающих клетках перитонеального экссудата, эритроцитах, тимоцитах и клетках костного мозга. (Stinnett et al., 1976).

На основании результатов собственных исследований и данных ряда других авторов van Furth и Thompson (1971) пришли к заключению, что мононуклеарные фагоциты представляют собой особую клеточную линию костномозгового происхождения. Поведение мононуклеарных фагоцитов в норме, при воспалении и при обработке глюкокортикоидами отличается от поведения гранулоцитов и их предшественников. Поэтому предложено выделить их в особую МФС, включающую в себя ранние распознающие клетки в костном мозге (промоноциты), циркулирующие в крови мононуклеарные фагоциты (моноциты) и тканевые макрофаги (фиксированные и свободные).

Основными критериями принадлежности клеток к МФС авторы этой классификации считают способность к фагоцитозу, пиноцитозу и прикреплению к стеклу, общность происхождения и морфологию. Они не включают в МФС ретикулярные, эндотелиальные, дендритные клетки и фибробласты, полагая, что их происхождение от моноцитов не доказано и они не обладают типичными для клеток МФС свойствами. Однако, несмотря на то что происхождение остеобластов и микроглии также точно не установлено, по основным функциональным критериям они могут быть предположительно отнесены к клеткам МФС.

Несколько позже были получены данные о том, что макрофаги могут переходить в фибробласты, поскольку при длительной инкубации культуры макрофагов, поглотивших неперевариваемый ими зимозан, число фибробластов, содержащих зимозан, прогрессивно увеличивалось (Hirt, Bonventre, 1973). Весьма возможно, что по мере накопления фактических сведений понятие о принадлежности клеток к МФС будет расширено, пока же при дальнейшем изложении материала мы будем придерживаться классификации van Furth.

Структура и функция

Клетки МФС отличаются большим полиморфизмом, который зависит от степени зрелости (моноцит или макрофаг), локализации и фазы функциональной активности. В настоящее время эти клетки достаточно подробно изучены с помощью световых и фазово-контрастных электронных и сканирующих микроскопов. Особенности их структуры освещены в ряде обзоров и монографий (Cohn, 1968; Pearsall, Weiser, 1970). Несмотря на это не всегда можно с уверенностью определить принадлежность клеток к определенному виду. Для уточнения и выяснения различий между разными видами моноцитарных клеток прибегают к ряду вспомогательных приемов и методов, начиная с определения их способности прикрепляться к стеклу и кончая использованием гистохимических методов, позволяющих выявить ряд органелл или ферментов, присущих определенным видам клеток. Так, например, окраска на пероксидазу позволяет отличить моноциты от больших лимфоцитов, а определение кислой фосфатазы служит лизосомным маркером, что также облегчает дифференциацию клеток лимфоидного и фагоцитирующего ряда. Истинная принадлежность клетки может быть установлена только с учетом данных, полученных различными методами исследования.

Периферическая кровь. Уже более 50 лет назад были представлены доказательства, что макрофаги в тканях и воспалительных очагах представляют собой высокодифференцированные моноциты крови. Позднее это было подтверждено многими исследователями, причем с помощью фазово-контрастной микроскопии с микрокиносъемкой была получена отчетливая картина последовательной (в течение недели) трансформации моноцитов крови в зрелые макрофаги (Rabinowitz, Schrek, 1962).

Моноциты периферической крови представляют собой юную популяцию клеток, поступающую в кровяное русло из костного мозга, вероятно, сразу же после образования, так как в костном мозге содержится не более 1,5% зрелых моноцитов. Из кровяного русла моноциты довольно быстро попадают через капилляры в различные ткани (для мышей и крыс половина их жизни в крови не превышает 2 сут), где дифференцируются в зрелые макрофаги с резко выраженной способностью к фагоцитозу. Число клеток МФС в тканях намного превышает их со-

держание в крови. У человека, например, их соотношение составляет 400:1. Моноциты крови в норме составляют не более 8% от всех циркулирующих лейкоцитов. По подвижности моноциты сходны с тканевыми макрофагами. Они представляют собой округлые клетки, превосходящие по величине гранулоциты, с диаметром 10—11 мкм. Их шероховатая гребенчатая мембрана постоянно находится в движении и включается в образование фагосом. Клетки имеют округлое ядро с изрезанными краями, значительно более обильную базофильную цитоплазму и более многочисленные и нежные митохондрии, чем у лимфоцитов. Форма ядра зависит от степени зрелости моноцита. У зрелых клеток ядра более вытянуты, с зернистым расположенным на периферии хроматином. Цитоплазматическая сеть (эндоплазматический ретикулум) более обильна, чем у лимфоцитов. Хорошо выражен пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи). В цитоплазме всегда можно обнаружить умеренное количество гранул, идентичных лизосомам.

Тканевые макрофаги. Судьба тканевых макрофагов точно не установлена. опыты с макрофагами, мечеными радиоактивным золотом, позволяют считать, что популяция их в тканях относительно постоянна в течение 2 мес (Rose, 1970). На основании данных, полученных с помощью введения животным различными путями макрофагов различного происхождения, полагают, что подвижные макрофаги брюшной полости, лимфатических узлов и селезенки в определенных условиях могут выходить в кровяное русло и переходить в другие органы (van Furth, Thompson, 1971).

В норме тканевые макрофаги, как и макрофаги полостей, практически не делятся. Однако макрофаги, скапливающиеся в очаге воспаления, способны к делению, так как около 14% макрофагов при воспалении брюшной полости, вызванном разными агентами, синтезируют ДНК (North, 1969). Макрофаги тканей очень гетерогенны по своей структуре. По величине они больше моноцитов (диаметр их достигает 20—50 мкм), но в основном строение их подобно моноцитам. У них сильнее развит пластинчатый комплекс и много цитоплазматических гранул, представляющих собой первичные и главным образом вторичные лизосомы.

Макрофаги печени (по Международной гистологической номенклатуре, звездчатые эндотелиоциты, или клет-

ки Купфера). Эти макрофаги оставляют около 30% всех ядерных клеток печени. По своему строению они не отличаются от макрофагов из других источников, хотя и обладают более липкой поверхностью, чем свободные макрофаги экссудатов. Различными методами исследования с использованием облучения, меченого тимидина, парабноза, стимуляции эстрогенами и др. было доказано, что звездчатые эндотелиоциты происходят также от клеток-предшественников в костном мозге (Kinsky et al., 1969).

Альвеолярные макрофаги. У животных различных видов альвеолярные макрофаги по своему строению отличаются от макрофагов, локализующихся в других областях, что может быть связано с более частыми и длительными контактами их с чужеродными агентами. Даже у безмикробных животных альвеолярные макрофаги активнее перитонеальных, но и это может зависеть от стимуляции вдыхаемыми газами (Leake, Heise, 1967). Источником альвеолярных макрофагов служат также моноциты периферической крови. В нормальных условиях они делятся крайне редко, так как не более 2% клеток синтезирует ДНК. Время кругооборота альвеолярных макрофагов составляет около 50 дней (van Furth, Thompson, 1971).

При попадании в легкие кислорода наблюдается так называемый феномен макрофагальной конгрегации, при котором несколько макрофагов как бы распластываются по одной эпителиальной клетке. С этой конгрегацией связывают определенные поражения легочной ткани. Возможно, что подобные механизмы действуют и при курении. Во всяком случае сигаретный дым угнетает антибактериальную активность альвеолярных макрофагов (Green, Carolin, 1967).

Макрофаги селезенки и лимфоидной ткани. Эти макрофаги очень близки по структуре макрофагам брюшной полости. Это активно фагоцитирующие клетки, что отражается и на их строении. У них имеется хорошо развитый пластинчатый комплекс и много лизосомных гранул и фаголизосом, содержащих остатки эритроцитов и других клеток, в том числе и плазматических.

В лимфатических узлах встречается гораздо большее разнообразие форм макрофагов, начиная от типичных и кончая ретикулярными клетками с длинными дендритами, обладающими определенными характеристиками макрофагов и способными удерживать антиген на своей

поверхности (Ada et al., 1967). Макрофаги в синусах лимфатических узлов обычно имеют широкую цитоплазму и содержат фагосомы с фагоцитированным материалом. В тимусе¹ тоже имеется значительное количество макрофагов, не отличающихся резко по морфологии от локализующихся в лимфатических узлах. Вероятно, основная часть макрофагов этих органов представляет собой дифференцированные в тканях моноциты периферической крови.

Макрофаги центральной нервной системы (ЦНС). В норме эти макрофаги представляют собой покоящиеся клетки микроглии, поскольку гемато-энцефалический барьер защищает ЦНС от чужеродных агентов. При нарушении этого барьера в результате травмы или инфекции клетки микроглии активизируются и превращаются в типичные фагоцитирующие клетки, содержащие много лизосомных гранул и вакуолей. Покоящиеся клетки микроглии иногда имеют многоугольные ядра и благодаря отходящим отросткам сами клетки имеют звездчатую форму.

В очаге воспаления в коже скапливается большое количество макрофагов, главным образом за счет поступающих в очаг моноцитов из периферической крови. При образовании гранулем, вызванном разными причинами, обнаруживают эпителиоидные и гигантские клетки, которые, вероятно, являются результатом трансформации и созревания макрофагов. Эти клетки обладают большим числом митохондрий, лизосом и других органелл.

В очаге воспаления любой локализации скопление макрофагов осуществляется преимущественно за счет моноцитов, мигрирующих в очаг из кровяного русла. Однако происходит мобилизация и тканевых гистоцитов, а сами макрофаги в очаге приобретают способность к делению. В то время как в норме делится не более 1% перитонеальных макрофагов, у животных с гиперчувствительностью замедленного типа через сутки после контакта со специфическим агентом не менее 50% перитонеальных мононуклеарных клеток начинают синтезировать ДНК (Forbes, MacKanness, 1963). Помимо этого, макрофаги, возможно, способны мигрировать из органа в орган. Так, было показано, что уголь и красители могут хранить-

¹ Более принятое в иммунологии название вилочковой, или зубной, железы.

ся в звездчатых эндотелиоцитах печени в течение нескольких недель или даже месяцев, причем число их постепенно уменьшается. За это время часть содержащих красители макрофагов появляется в легких, из которых частично выделяется с мокротой и т. д. (Nicol, Cordingley, 1967). Однако нельзя считать доказанным, что звездчатые эндотелиоциты, альвеолярные и перитонеальные макрофаги могут меняться местами, потому что они довольно резко отличаются друг от друга как по способности прилипать к стеклу, так и по митотической и метаболической активности (Bennett, 1967).

Принципиальное значение имеет вопрос о том, могут ли лимфоциты трансформироваться в макрофаги. Начиная еще с работ А. А. Максимова (1903), который, используя имплантацию целлулондных камер, пришел к заключению, что макрофаги образуются частично в результате трансформации лимфоцитов крови, это предположение поддерживали многие авторы. Хотя вопрос до сих пор еще окончательно не решен, накопившиеся данные весьма убедительно свидетельствуют в пользу такой возможности.

Исследования на сингенных радиационных химерах показали, что источником макрофагов могут являться клетки грудного протока, представляющие собой главным образом малые лимфоциты. Предполагают, что далеко не все лимфоциты способны трансформироваться в макрофаги; некоторые из них под влиянием стимуляции дают бласттрансформацию, в то время как другие в присутствии зернистых (полиморфноядерных) лейкоцитов трансформируются в макрофаги (Elves, 1967). Конечно, для окончательного решения этого вопроса необходимо уточнение номенклатуры разных клеточных типов.

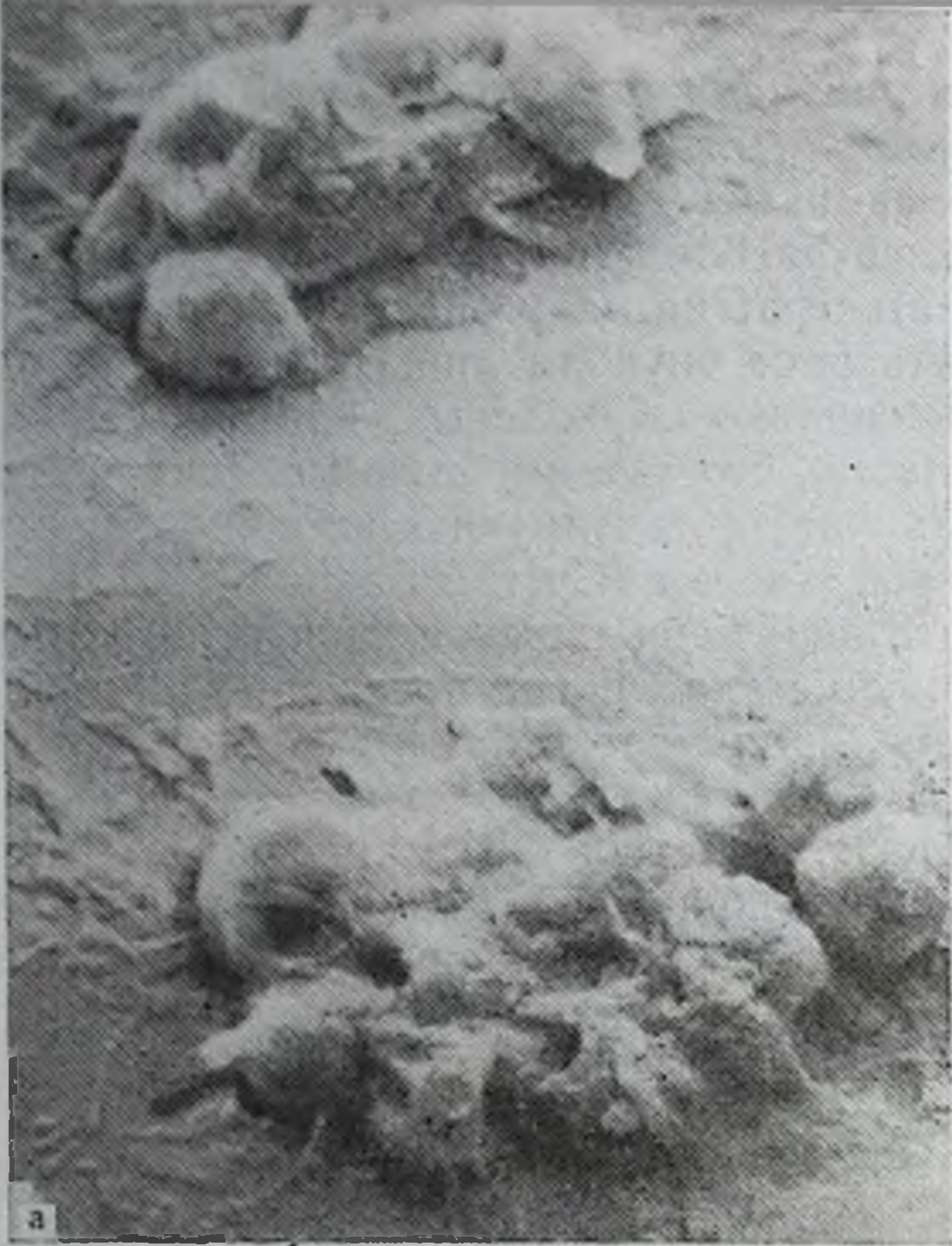
Брюшная полость представляет собой наиболее удобный для экспериментирования источник макрофагов. В нормальных условиях в брюшной полости содержится относительно небольшое количество макрофагов. Депонируются они главным образом в сальнике. При попадании в брюшную полость инфекции или при асептическом воспалении, вызываемом введением бульона или других агентов (чем обычно и пользуются в эксперименте), в ней появляется много макрофагов, часть из которых поступает из сальника или мигрирует из кровяного русла. Небольшая часть макрофагов начинает делиться. В этих условиях они проявляют большую активность,

в них резко увеличивается лизосомный аппарат и усиливается способность к фагоцитозу. Имеются наблюдения, что перитонеальные макрофаги могут убивать опухолевые клетки, не фагоцитируя их, полностью при соотношении один макрофаг на одну опухолевую клетку и заметно замедлять рост опухоли при соотношении один макрофаг на несколько опухолевых клеток (Tsoi, Weiser, 1968). Показано, что активированные макрофаги способны выделять фактор, лизирующий только опухолевые, но не нормальные клетки (Curgie, Basham, 1975). Скорость кругооборота перитонеальных макрофагов, как уже упоминалось, очень мала: она не превышает 0,1—0,2% в 1 ч. Общая популяция восстанавливается примерно за 1½ мес.

Разнообразие в строении макрофагов зависит не столько от их источника, сколько от их функционального состояния. На рис. 3 представлены перитонеальные макрофаги в различное время после фагоцитоза ими эритроцитов барана. Снимки сделаны при помощи сканирующего микроскопа сотрудницей нашей лаборатории Ю. Н. Фаворской (1975). Сверху (рис. 3, а) представлен монослой макрофагов в первые 30—60 мин фагоцитоза. Видна истонченная цитоплазма с бахромчатым краем, покрывающая тонким слоем эритроциты. Внизу (рис. 3, б) представлены макрофаги из того же экссудата через 6 ч после начала фагоцитоза эритроцитов барана. Они представляют собой четко отграниченную клетку. Ясно виден край цитоплазмы. Все вакуоли, образовавшиеся на месте фагосом, поглотивших эритроциты, локализируются в центральной области клетки. Там же виден еще не полностью переваренный эритроцит. Естественно, что при изучении структуры таких клеток в световом или электронном микроскопе обнаруживают существенные различия.

Рядом авторов указывалось, что с помощью градиентного центрифугирования из популяции кроличьих перитонеальных макрофагов можно выделить несколько слоев или субклассов. Независимо от того, пользовались ли разделением в прерывистом фиколловом (Walker, 1973) или альбуминовом (Rice, Fishman, 1973) градиенте плотности, получали 4—5 субклассов перитонеальных макрофагов кроликов, отличающихся по своим свойствам.

Различия в функциональной активности субклассов будут рассмотрены несколько позже. Поскольку функция связана со структурой клетки, то необходимо указать, что,



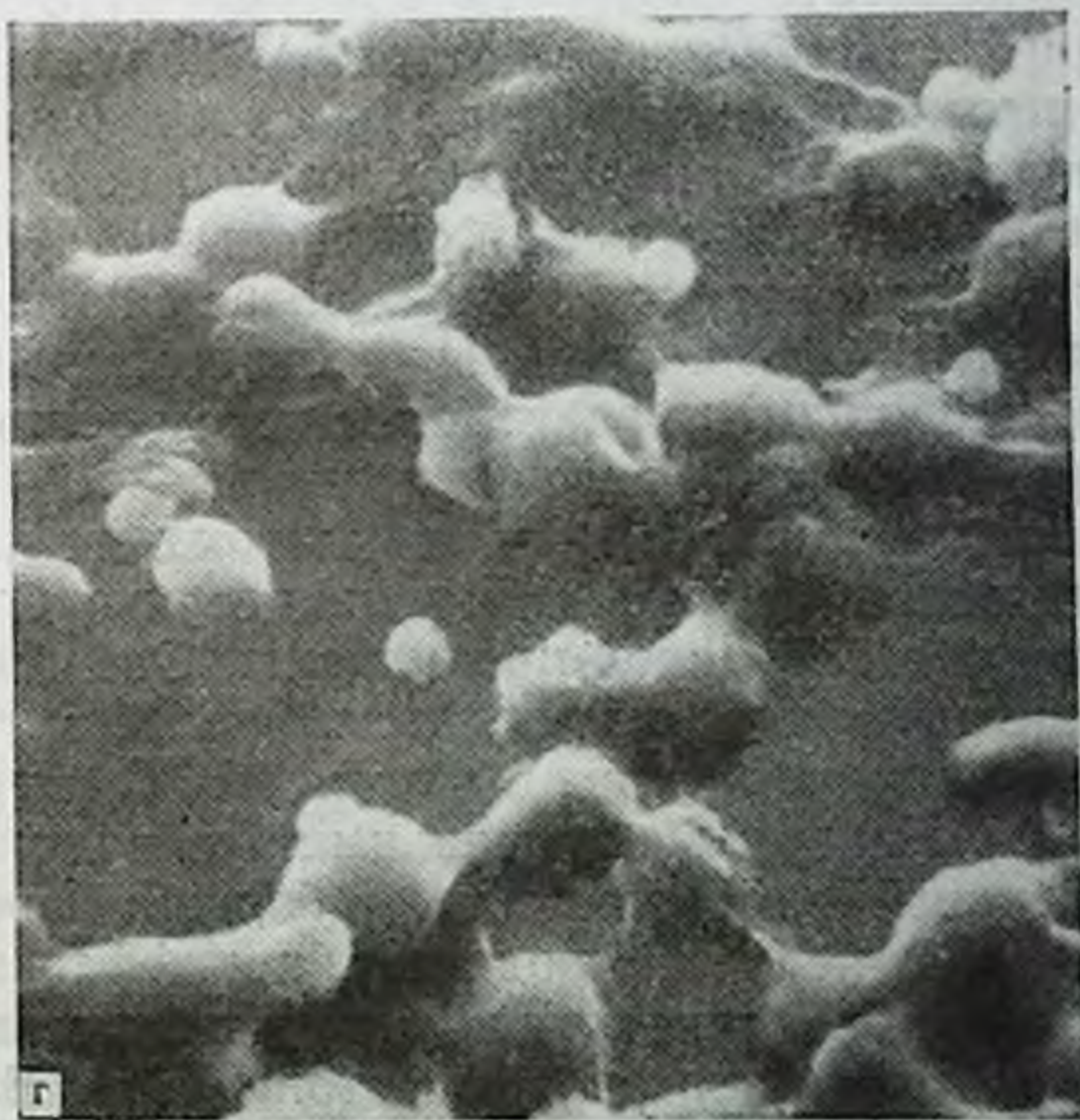
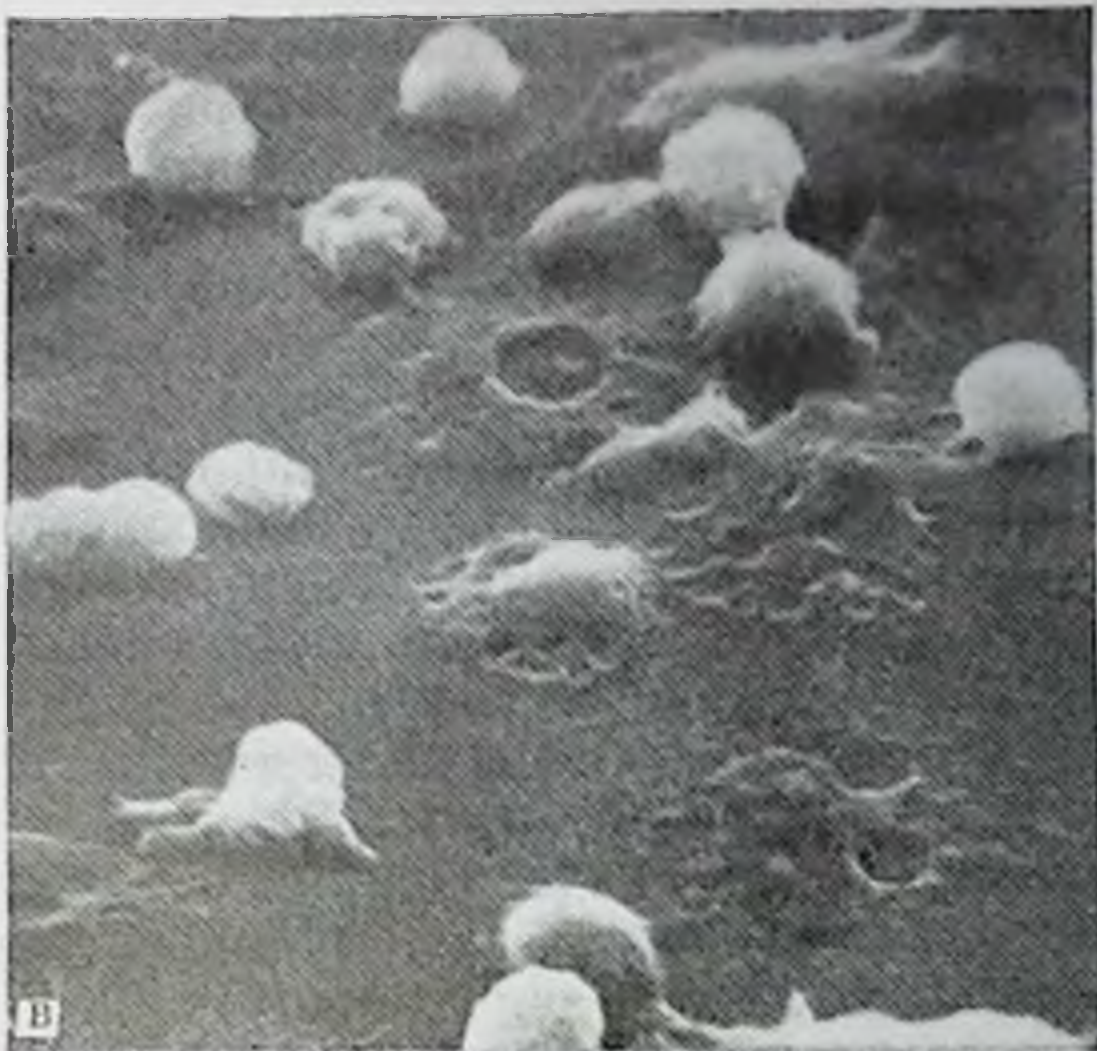


Рис. 3. Перитонеальные макрофаги мышей (растровая микроскопия).
 а — макрофаг в начальной стадии фагоцитоза (30 мин). $\times 3000$; б — макрофаг
 в поздней стадии фагоцитоза (6 ч). $\times 3000$.
 в — клетки в слое 11% бычьего сывороточного альбумина (II). $\times 2000$; г — клет-
 ки в слое 20% бычьего сывороточного альбумина (IV).

по мнению Rice и Fishman, исследовавших клетки разных субклассов с помощью фазово-контрастной и электронной микроскопии, типичные макрофаги имеют относительно плотные ядра и цитоплазму, складчатую плазматическую мембрану и содержат большие вакуоли с фагоцитированным материалом, окруженные двойной мембраной. Они локализуются обычно в двух слоях (В и С). Однако в этих же слоях содержится до 40% мононуклеарных клеток другого вида. Этот субкласс был назван авторами А-клетками. У них имеется центрально расположенное круглое или овальное ядро с дисперсным хроматином, часто выступающими ядрышками или ядерной мембраной, цитоплазмой, содержащей плотные митохондрии; они не имеют складчатой мембраны. Вакуоли их обычно свободны от фагоцитированных объектов. Среди А-клеток митозы встречаются чаще по сравнению с другими слоями клеток.

В наших совместных исследованиях с Э. Л. Хасман и Ю. Н. Фаворской (1976) при центрифугировании в прерывистом градиенте плотности альбумина (5, 8, 11, 15 и 20%) при 12 000 об/мин на роторе SW-25 ультрацентрифуги «Spinco» клеток перитонеальных макрофагов мышей мы получали обычно 4 слоя клеток и осадок на дне, в котором находились обломки различных структур.

При изучении клеток из разных слоев с помощью сканирующего микроскопа в слое II (соответствующем слою В по Rice и Fishman) встречалось много расплавленных фагоцитирующих макрофагов, в нижнем слое — IV (слой D) наблюдалось гораздо меньше клеток в стадии активного фагоцитоза. Клетки были значительно более мелкими, почти без свободной цитоплазмы. Они были похожими на интактную популяцию (см. рис. 3, в, г).

При изучении морфологии клеток МФС, выращиваемых *in vitro*, необходимо всегда иметь в виду длительность культивирования, так как при большом сроке культивирования (2 нед) наблюдается дедифференцировка макрофагов в нефагоцитирующие клетки, имеющие морфологические признаки фибробластов (Hirt, Bonventre, 1973). Функция макрофагов тесно связана с особенностями их структуры, поэтому некоторые из этих особенностей должны быть освещены подробно.

Наружная клеточная мембрана клеток МФС является не просто внешней оболочкой клетки, а играет основную роль в осуществлении фагоцитоза и в организации

внутренней структуры клетки. По представлению Дж. Робертсона (1964), большая часть клеточных органелл образуется за счет элементарной мембраны, окружающей каждую клетку. Цитоплазматическая сеть и пластинчатый комплекс являются как бы продолжением наружной цитоплазматической мембраны, которая участвует в образовании внутренних мембран и, вероятно, лизосом. Поверхностная цитоплазматическая мембрана макрофагов часто снабжена псевдоподиями, которые обволакивают микроорганизмы, и последние вместе с участками этой мембраны погружаются в цитоплазму клетки, отделяясь от ее поверхности. В других случаях наружная цитоплазматическая мембрана фагоцита инвагинируется в месте соприкосновения его поверхности с объектом фагоцитоза. Этот участок погружается в глубь цитоплазмы клетки до тех пор, пока свободные края клеточной оболочки не сольются, а внедрившаяся часть мембраны, окружающая фагоцитируемый объект, не обособится от поверхности клетки. Таким образом, и в этом случае фагосома оказывается свободно расположенной в цитоплазме фагоцита.

Необходимая для осуществления фагоцитоза энергия обеспечивается главным образом благодаря гликолизу (И. А. Алов, А. И. Брауде, М. Е. Аспиз, 1969).

В случае положительного хемотаксиса образование псевдоподий происходит вследствие ослабления сцепления между молекулами поверхностных слоев и уменьшения поверхностного натяжения в этом месте (А. Д. Адо, 1971). Природа и молекулярный механизм хемотаксиса до сих пор не установлены. Были предложены различные объяснения, начиная от изменения концентрации водородных ионов и кончая специальным ферментом, найденным в лизосомах лейкоцитов кроликов и способным оказывать хемотаксическое действие за счет разложения C_3 и C_5 -компонентов комплемента на малые фрагменты (Ward, Hill, 1970).

В настоящее время можно считать доказанным, что моноциты и макрофаги имеют на поверхностной мембране рецепторы для IgG третьей фракции комплемента и ее ингибитора C_3b (А. Я. Кульберг, 1975; Wellek et al., 1975). Частота обнаружения этих рецепторов зависит от функционального состояния клетки. В 90% случаев рецепторы на фагоцитирующих клетках перестают обнаруживаться уже через 10 мин после инкубации моноцитов человека

с латексом или обработанными формалином эритроцитами барана. Через 6 ч наблюдали восстановление от 78 до 84% рецепторов для IgG на моноцитах. Schmidt, Douglas, 1972). Остается пока невыясненным, как долго могут сохраняться молекулы иммуноглобулина на поверхности макрофагов, не подвергаясь фагоцитозу. Определенная часть антигена также остается на наружной цитоплазматической мембране макрофагов. Некоторые авторы считают, что поверхностью макрофагов связывается большая часть растворимых антигенов и этот связанный с мембраной антиген сохраняется независимо от антигенного материала, содержащегося внутри клеток (Упанье, Сегаттини, 1970; Schmidtke, Упанье, 1971). Эти же авторы полагают, что рецепторы для антител и антигена, расположенные на наружной цитоплазматической мембране макрофагов, различны по химической природе, поскольку антигенсвязывающие рецепторы чувствительны к действию трипсина, а рецепторы для IgG устойчивы к нему. Вероятно, различные рецепторы наружной цитоплазматической мембраны макрофагов структурно изолированы друг от друга и взаимодействие антител, антигенов и компонента на поверхности макрофагов может зависеть от их пространственного расположения (А. Я. Кульберг, 1975).

Поверхность макрофагов способна также связывать цитофильные антитела, которые, например, при добавлении эритроцитов вызывают образование типичных розеток вокруг макрофага. Интересно, что цитофильные антитела связываются только с поверхностью макрофагов и не присоединяются к поверхности зернистых лейкоцитов (Berken, Venasagat, 1966).

Повышение иммуногенности связанного с мембраной антигена происходит только при его фиксации на макрофагах. Связывание антигена с лимфоцитами или тимоцитами не сказывается на его иммуногенности (Seeger, Oppenheim, 1972). Это ставит под сомнение пассивную роль макрофагов в повышении иммуногенности связанных с мембраной клетки растворимых антигенов.

Иммуногенная часть корпускулярных антигенов может связаться с наружной цитоплазматической мембраной только после фагоцитоза и переваривания их макрофагами, так что активная роль последних при этом несомненна.

Для выяснения динамики пиноцитоза и переваривания макрофагами растворимых антигенов нами было проведе-

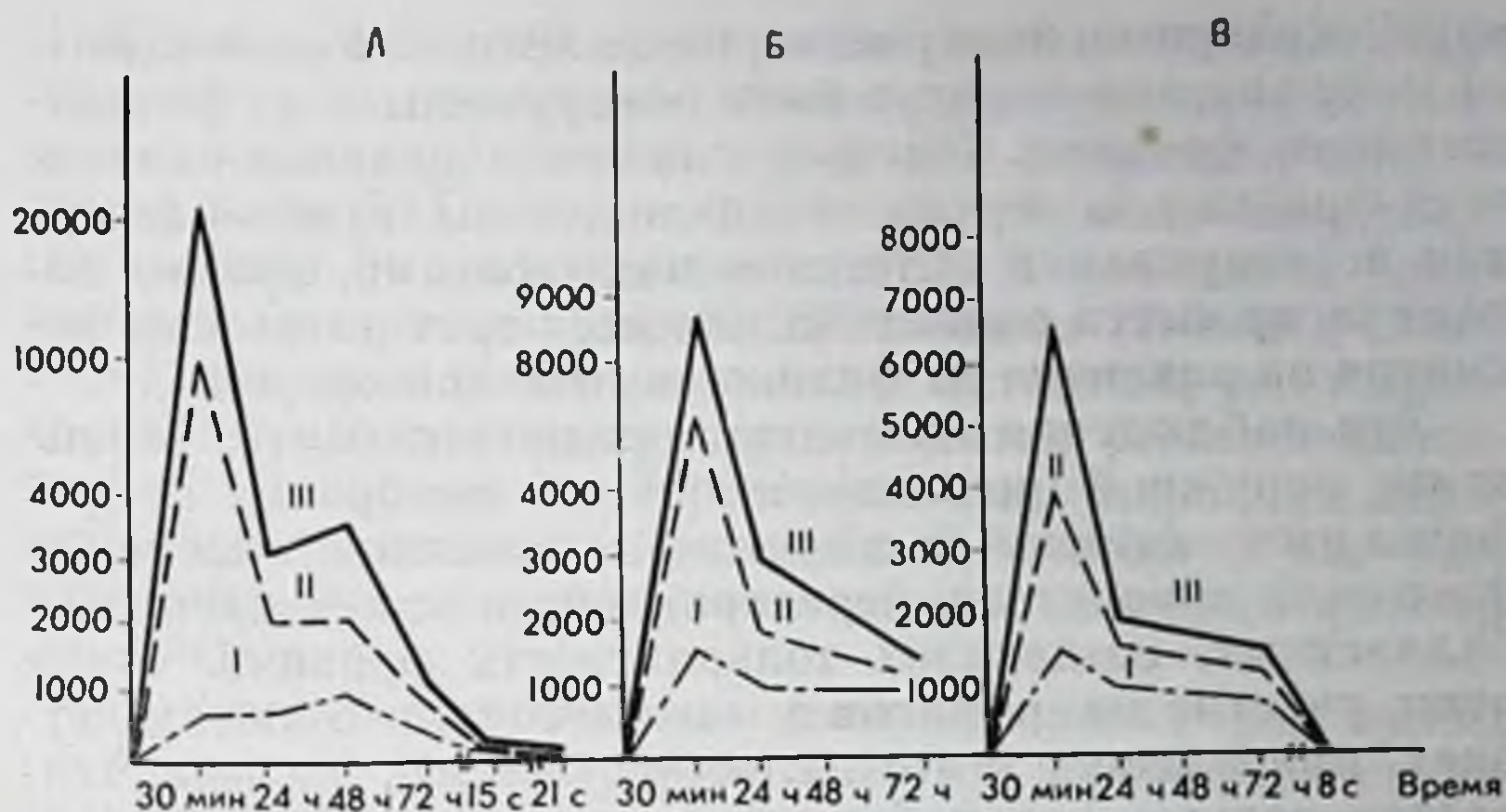


Рис. 4. Динамика захвата и выведения клетками перитонеального экссудата мышей антигенов различной физико-химической природы. А — ^{14}C -тифозная вакцина; Б — ^{51}Cr -эритроциты барана; В — ^{14}C -альбумин. На оси ординат — имп/мин/мг белка; на оси абсцисс — время; I — цитоплазма клетки; II — лизосомная фракция; III — целая клетка.

по сравнительное изучение захвата и выделения перитонеальными макрофагами мышей разных по физико-химической природе антигенов (И. Я. Учитель и др., 1976). Клетки перитонеального экссудата получали от животных в разные сроки после введения им меченых антигенов — ^{51}Cr -эритроцитов барана, ^{14}C -тифозной вакцины и ^{14}C -альбумина. Клетки отмывали, гомогенизировали и выделяли фаголизосомную фракцию. Радиоактивность определяли как в целых клетках, так и в их фаголизосомной фракции с помощью сцинтилляционного счетчика. Результаты этих экспериментов, представленные на рис. 4¹, свидетельствуют о том, что динамика захвата и выведения макрофагами тифозной вакцины (А), эритроцитов барана (Б) и растворимого антигена — альбумина (В) однотипна. Максимум захвата наблюдали через 30 мин после их введения. За первые сутки выводилась основная масса радиоактивного материала, который, однако, еще через 72 ч можно было обнаружить в макрофагах в определяемых количествах. Все 3 антигена скапливались в фаголизосомной фракции. Следовательно, не только

¹ Результаты не приведены в соответствие с Международной системой единиц (распадов в секунду) из-за отсутствия данных об эффективности счетчиков.

корпускулярные, но и растворимые антигены поглощаются макрофагами и могут быть обнаружены в их фазолизомной фракции. Быстрое снижение радиоактивности этой фракции за первые сутки свидетельствует об активном переваривании антигенов макрофагами, причем динамика процесса одинакова для всех трех антигенов, несмотря на различия их физико-химической природы.

Эти наблюдения позволяют предполагать, что связывание наружной цитоплазматической мембраной макрофагов иммуногенной части антигена происходит после его фаго- или пиноцитоза, переваривания и освобождения от балластных, создающих толерантность фракций. Вероятно, участие макрофагов в межклеточных взаимодействиях, приводящих к антителиобразованию, не ограничивается только переработкой антигенов и подачей их иммуногенных фракций наиболее удобным путем к Т- и В-лимфоцитам.

Макрофаги активно перерабатывают антиген, хранят его иммуногенные части длительное время и вырабатывают ряд факторов, о чем будет сказано в главе VI, влияющих на скопление, пролиферацию и дифференциацию иммунокомпетентных клеток (Waldman, Gottlieb, 1973; Kishimoto et al., 1975; Gemsa et al., 1975).

Макрофаги выделяют в культуральную среду активные вещества, среди которых обнаружены низкомолекулярный ингибитор и недиализуемый стабилизатор (Calderon, Upanue, 1975).

Регуляторная роль макрофагов в иммунном ответе осуществляется не только с помощью выделяемых ими в процессе жизнедеятельности растворимых факторов. Показано, что добавление к культуре *in vitro* убитых нагреванием макрофагов приводит к угнетению первичного иммунного ответа. Действие это специфично для макрофагов, так как прибавление убитых лимфоцитов или опухолевых клеток не оказывает такого влияния.

Обработка макрофагов агентами, инактивирующими рецепторы для цитофильных антител, лишала их возможности угнетать иммунный ответ *in vitro*. Вероятно, свойство убитых макрофагов тормозить антителиобразование зависит от способности их наружной цитомембраны адсорбировать факторы, необходимые для кооперации лимфоцитов (Plak, Gershon, 1975). Помимо этого, показано, что клетки МФС способны распознавать друг друга и связываться (Kersey, Booth, 1975) между собой.

Клетки МФС обладают интенсивным обменом. Они содержат ряд ферментов, обеспечивающих возможность использования различных путей для получения необходимой энергии. Преимущественный путь получения энергии зависит от локализации клеток. В моноцитах крови наблюдали активный аэробный гликолиз (Bennett, Cohn, 1966), при этом значительно более активный, чем наблюдаемый в нейтрофильных гранулоцитах (нейтрофилоцитах) или лимфоцитах. Перитонеальные макрофаги являются факультативными анаэробами, в то время как альвеолярные — скорее факультативными аэробами (Ogencetal, 1963).

Помимо окислительно-восстановительных ферментов, необходимых для получения энергии, макрофаги синтезируют большое количество лизосомных ферментов, используемых для переваривания фагоцитируемого материала, и ряд других ферментов и белков, принимающих участие в защите организма от чужеродных агентов. Среди различных ферментов (пептидил-пептидогидролазы, липаз и др.) особого внимания заслуживает лизоцим, или мурамидаза, являющийся одним из важнейших факторов неспецифической резистентности организма (О. В. Бухарин, 1973; Dannenberg, 1968).

В большинстве клеток МФС, получаемых из серозных полостей, наблюдали активный синтез РНК (Gottlieb et al., 1971). Рядом исследователей было доказано, что макрофаги *in vivo* и *in vitro* вырабатывают большие количества интерферона, независимо от источника макрофагов и вида животного. Возможно, что интерферон, вырабатываемый КПЭ, отличается от большинства сывороточных интерферонов, продуцируемых в ответ на вирусную инфекцию (Smith, Wagner, 1967).

Перитонеальные макрофаги синтезируют ряд сывороточных белков, таких, как трансферрин, компоненты комплемента и даже большие количества эндогенного пирогена (Attkins et al., 1967).

Глава II

ЛИЗОСОМНЫЙ АППАРАТ МАКРОФАГОВ

Структура и функция

Лизосомный аппарат клеток, сравнительно недавно открытый А. Новиковым (1955) и К. де Дювом (1964), выполняет важную роль в различных функциях организма в целом и отдельной клетки в частности.

Основной функцией лизосом является клеточное пищеварение и этим определяется большая доля их участия в важных для жизнедеятельности организма процессах. Лизосомы имеют большое значение в защите организма от чужеродных агентов (естественный и специфический иммунитет), в лизисе и резорбции тканей и органов как в процессе метаморфоза, так и при удалении функционально непригодных или отживших клеток. Они участвуют в процессе дифференцировки клеток, их делении и старении. Наконец, появились указания, что лизосомы связаны с процессами синтеза и секреции некоторых белков и экскретов организма (А. А. Покровский, В. А. Тутельян, 1969, 1976; И. Я. Учитель, 1970, 1973; Н. Т. Рахлин, 1971).

Использование разнообразных сочетаний методов исследования позволило выявить лизосомы практически во всех тканях позвоночных, за исключением эритроцитов. Они обнаружены также у высших растений, грибов, простейших, насекомых. Эти находки свидетельствуют о важной общебиологической функции лизосом.

Наиболее богаты лизосомами клетки МФС, специализированные для захвата и переваривания чужеродных агентов. По мнению de Duve (1969), лизосомы являются частью системы с определенными физиологическими функциями, которую следует рассматривать в целом. Отдельные лизосомы в клетках представляют собой гранулы, окруженные однослойной мембраной и содержащие до 36 различных пищеварительных ферментов. Ферментный набор лизосом с указанием субстратов, на которые они действуют, подробно освещен в обзорах В. Г. Пинчу-

ка и Л. А. Зотикова (1969), А. А. Покровского и В. А. Тутельяна (1969, 1976). Большая часть ферментов лизосом относится к гидролизам с оптимумом активности при pH 5.

В процессе расщепления белка участвует по крайней мере 7 типов лизосомных протеиназ и пептидаз. В расщеплении гликопротеидов участвуют не только различные гликозиды, но и протеиназы (А. А. Покровский, В. А. Тутельян, 1976).

Лизосомы разных тканей отличаются по содержанию ферментов. Например, в лизосомах лейкоцитов и почек содержится лизоцим, которого нет в лизосомах печени; содержание кислой фосфатазы и β -глюкуронидазы также варьирует от органа к органу. Лизосомы лимфоидной ткани отличаются от печеночных более медленным освобождением ферментов в условиях инкубации их при 37°С и pH 5,2. Активность кислых гидролаз в клетках МФС и селезенке выше, чем в печени и почках, особенно за счет высокого содержания в них кислых нуклеаз и катепсина D.

Описаны различия в пищеварительной функции лизосом разных клеток ретикулоэндотелиальной системы. В зернистых лейкоцитах поглощенные бактерии полностью разрушаются и быстро перевариваются, в то время как в макрофагах этот же материал обнаруживается в течение длительного времени в высокомолекулярной форме (Cohn, 1963).

Гистохимическими методами показано, что наивысшей ферментативной активностью обладают клетки в красной пульпе селезенки, в мозговом веществе тимуса и, возможно, в мягкотном тяже и краевых синусах лимфатического узла. Наиболее богаты ферментами макрофаги и ретикулярные клетки. В лимфоцитах лизосом мало и последние слабо окрашиваются.

Лизосомная фракция в лимфоидной ткани состоит из трех больших субфракций, различающихся по плотности при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы: L₁₉, L₁₅ и L₃₀.

В селезенке основная активность ферментов связана с лизосомами, относящимися к фракции L₁₉. Эта фракция находится в основном в макрофагах красной пульпы. Она богата кислыми гидролазами и играет основную роль в захвате и хранении различных веществ. Присутствие лизосом фракции L₁₉ в тимусе и лимфатических узлах

указывает на наличие макрофагов в этих тканях. Фракция L_{30} резко отличаются от L_{19} высокой способностью аккумулировать декстран. Предполагают, что лизосомы макрофагов, содержащие декстран, являются более поздней стадией в их жизненном цикле. Их большая плотность объясняется повышенным содержанием продуктов распада железа, которые часто встречаются в макрофагах красной пульпы селезенки, участвующих в переваривании эритроцитов (Bowers, 1969). В селезенке имеются обе эти фракции лизосом. Фракция лизосом, идентифицированная как L_{15} , происходит из лимфоцитов. Эта фракция богата катепсином D и бедна всеми другими лизосомными ферментами. В опытах с использованием лимфолитических средств фракция L_{15} исчезает и одновременно резко снижается активность катепсина D. Это дает основание считать, что L_{15} является фракцией лимфоцитарного происхождения. Она обнаружена в селезенке, тимусе, лимфатических узлах и, вероятно, является общей для лимфоцитов всех лимфоидных тканей.

Существование лизосомного аппарата почти во всех клетках, литические свойства лизосомных ферментов и их выделение при самых различных воздействиях и условиях наводят на мысль, что первоочередной функцией этого приспособления является аутолиз тканей. В норме клетка редко погибает от своих ферментов. Чаще или перевариваются клетки, погибшие в результате физиологического некробиоза или от других причин.

Электронно-микроскопические исследования показали, что макрофаги и их лизосомы принимают участие в определенных физиологических процессах. В лизосомах макрофагов красной пульпы селезенки часто обнаруживают эритроциты в разных стадиях переваривания. Постоянно фагоцитирующие клетки участвуют в обмене лимфоцитов тимуса. Общая популяция лимфоцитов в корковом веществе тимуса обновляется каждые 3—4 дня (Metcalf, 1966), и большая часть этих клеток не мигрирует из него. Следовательно, большое их число разрушается макрофагами этого органа. Обнаружение в макрофагах лимфоидной ткани зародышевых центров плазматических клеток указывает на их роль также в разрушении плазматических клеток, которые исчезают после антителообразования, минуя кровоток.

Во всех клетках в норме, а еще чаще при патологии в лизосомах можно обнаружить компоненты собственных

клеток, чаще всего митохондрии, так как деструкция частей живых клеток также является, по-видимому, функцией лизосом. Возможно, что лизосомы играют роль в нормальном обмене веществ в клетке, поскольку существует определенный баланс между количеством выделяемого фермента и количеством синтезирующегося внутриклеточного материала.

Образование лизосом было исследовано при культивировании КПЭ мышей. Наряду с увеличением объема клеток при культивировании происходило увеличение числа цитоплазматических гранул и митохондрий. В течение первых 72 ч количество гранул в окооядерной зоне не возрастало и увеличивалась их плотность при окраске по Гомори. При этом возрастала активность по крайней мере нескольких ферментов. Эти изменения не сопровождалось делением клеток и содержание ДНК оставалось постоянным. В то же время при обработке культур макрофагов ингибиторами синтеза белка (пурамицин, циклогексимид) образование гранул и содержащихся в них ферментов угнеталось. Следовательно, есть все основания полагать, что лизосомный аппарат может развиваться при культивировании клеток *in vitro*.

Изучение культуры клеток с помощью электронного микроскопа позволило обнаружить существенные изменения в пластинчатом комплексе, которые свидетельствуют о его связи с образованием в макрофагах вторичных лизосом. Эксперименты с использованием импульсной метки дали возможность проследить путь вновь синтезированного белка из цитоплазматической сети в пластинчатый комплекс и оттуда — в лизосомы.

Хотя механизм образования первичных лизосом окончательно не установлен, есть основания полагать, что кислые гидролазы синтезируются на рибосомах в цистернах цитоплазматической сети, откуда они поступают в пластинчатый комплекс, где и образуются первичные лизосомы.

Остается невыясненным, как происходит в лизосомах объединение большого числа ферментов, генетически не связанных между собой (de Duve, 1969).

Судьба лизосом в макрофагах значительно сложнее, чем в гранулоцитах, поскольку макрофаги являются долгоживущими клетками, способными к синтезу лизосомных компонентов. Согласно мнению Cohn и Fedorko (1969), первичные лизосомы сливаются с пиносомами и образу-

ют вторичные лизосомы — пинолизосомы. В последующем в эти органеллы могут поступать новые агенты из вновь образованных фагосом, причем скорость поступления их обусловлена скоростью пиноцитоза. Можно предположить и поступление новых ферментов, хотя до сих пор не наблюдали слияния первичных лизосом со «зрелыми» вторичными лизосомами. При фагоцитозе больших по объему частиц предсуществующие вторичные лизосомы могут сливаться и выпускать свое содержимое в фагосому, как это наблюдается в гранулоцитах. В этом случае наблюдают образование больших вакуолей. Естественно, что *in vivo*, когда одновременно идет фаго- и пиноцитоз, встречаются вторичные лизосомы обоих видов. Интересно, что при переносе активно пиноцитирующих макрофагов в новую среду вторичные лизосомы постепенно уменьшаются в размерах и в них происходит уменьшение активности кислой фосфатазы, катепсина, β -глюкуронидазы и других ферментов. Аналогичный эффект оказывают ингибиторы синтеза белка. Эти наблюдения позволяют предположить, что лизосомные ферменты могут разрушаться внутри вторичных лизосом. Процесс завершается образованием остаточных телец.

В макрофагах неперевариваемый или высокомолекулярный материал остается внутри вторичных лизосом неопределенно длительное время, возможно, в течение всей жизни клетки. Переваренные агенты после расщепления их внутри вторичных лизосом диффундируют в цитоплазму через мембрану лизосом и включаются в метаболизм клетки.

По мнению de Duve, вакуольный аппарат клетки тесно связан с внеклеточной средой не только благодаря процессу эндоцитоза, но и путем экзоцитоза, который наблюдали многие исследователи в различных условиях. Так, описано выделение из клеток кислых гидролаз, участвующих в рассасывании кости, выделение печеночными клетками вместе с желчью предварительно введенного коллоидного золота, поступление в кровотоки под влиянием ренин-инъекции антигена его меченого аналога, введенного предварительно (Campbell, Garvey, 1963).

Большую роль как в эндоцитозе, так и в экзоцитозе играет взаимодействие соприкасающихся мембран, поэтому изучению строения биологических мембран уделяют в настоящее время очень много внимания. Оба этих процесса требуют энергии и динамического совпадения

ряда условий, что обеспечивается контролирующими механизмами, природа которых пока не установлена.

Состояние мембран лизосом определяет их функциональную активность не в меньшей степени, чем набор и состояние ферментов, содержащихся в лизосомах. Мембрана лизосом надежно предохраняет клетку от действия их гидролитических ферментов. Под влиянием различных воздействий, вызывающих повреждение мембраны или перестройку ее молекулярной структуры, состояние ее проницаемости изменяется. В ряде случаев проницаемость мембраны может меняться избирательно только для определенных ферментов или субстратов, так же как активация под влиянием каких-либо агентов может коснуться лишь отдельных ферментов лизосом.

Наблюдается параллелизм в способности различных агентов (*зимозан*, *Microsporidia faeni*, гликопептид, гликопротеидная фракция из этого микроорганизма) вызывать освобождение гидролитических ферментов из макрофагов в культуре и обуславливать развитие воспаления и активацию системы комплемента (Schorlemmer et al., 1977).

Биохимический механизм повышения проницаемости лизосомной мембраны и активации ферментов не расшифрован, тем более что некоторые из них (например, кислая фосфатаза) легко выходят в среду, другие же (нуклеазы), наоборот, с трудом. Приблизительно в 90—95% случаев активность ферментов лизосом находится в латентном состоянии, т. е. в норме не выходит за пределы гранулы, возможно, благодаря наличию связей между ферментами и гликолипидными комплексами мембраны (А. А. Покровский, В. А. Тутельян, 1969).

Лизомный аппарат имеет большое значение как в жизнедеятельности отдельной клетки, так и организма в целом. С лизосомами связаны процессы катаболизма, поэтому они играют важную роль в защите организма от чужеродных агентов и в возникновении ряда патологических процессов.

Наследственные изменения и их роль в патологии

Вследствие того что макрофаги и, естественно, их лизосомный аппарат играют важную роль в сохранении гомеостаза организма, нарушения процесса роста и жиз-

недеятельности этих клеток отражаются на функции других систем и течении различных физиологических процессов и, следовательно, могут явиться первопричиной ряда патологических состояний.

Для правильного понимания патогенеза тех или иных патологических процессов крайне важно определить первоисточник нарушений, будь то определенная клетка или ее органеллы.

Макрофаги принимают большое участие в антимикробном и антивирусном клеточном иммунитете, чему способствует относительно большая продолжительность жизни этих клеток, в то время как фагоцитирующие зернистые лейкоциты вследствие короткого периода их жизни не успевают полностью разрушить ряд живых агентов и поэтому не могут служить плацдармом для внутриклеточного паразитизма. В то же время существует определенная корреляция между деятельностью этих видов фагоцитирующих клеток, изменение которой может привести к нарушению нормального процесса защиты. Так, зернистые лейкоциты, например, снабжают макрофаги гликогеном, необходимым для нормального обмена в этих клетках (Rebuck et al., 1967). Определенные особенности воспалительных процессов при диабете зависят именно от изменений в этом звене кооперации зернистых лейкоцитов и макрофагов.

О роли макрофагов в гуморальном ответе при инфекционных болезнях будет говориться в другом разделе книги (см. главу III). Однако уровень их функциональной активности имеет большое значение для развития клеточного иммунитета, играющего важную роль при ряде хронических инфекционных заболеваний (туберкулез, лепра, интерстициальная пневмония), сопровождающихся выраженной гиперчувствительностью замедленного типа.

Активность клеток МФС может стимулироваться как неспецифическими (например, эндотоксином грамотрицательных бактерий), так и специфическими факторами (цитофильными антителами). Тем не менее в силу разных причин клетки МФС не всегда способны полностью убить и разрушить фагоцитированные ими микроорганизмы. В одних случаях это зависит от того, что микроорганизмы в процессе эволюции выработали механизмы, позволяющие им защищаться от губительного действия фагоцитов. Некоторые из них вырабатывают токсические вещества, способные убивать клетки МФС; другие, напри-

мер туберкулезная палочка, обладают восковой капсулой, достаточно надежно защищающей их от действия пищеварительных ферментов. В других случаях может быть снижена функциональная активность макрофагов под влиянием как различных внешних причин, так и внутренних (генетически детерминированная неполноценность).

Описано угнетение внутриклеточной способности макрофагов убивать стафилококки *in vitro* под влиянием табачного дыма (Green, Carolin, 1967) или освободиться *in vivo* от вирулентных штаммов *S. typhi murgium* при недостатке витаминов (Furness, Axelrod, 1959). Обнаружены наследственные заболевания, связанные с нарушением функции лизосомного аппарата макрофагов, что выражается в изменении набора и активности лизосомных ферментов или состояния проницаемости лизосомной мембраны.

Наиболее изученными наследственными нарушениями функции лизосомного аппарата клеток являются так называемые болезни накопления, обусловленные врожденным отсутствием какого-нибудь лизосомного фермента, в результате чего происходит накопление нерасщепленных молекул соответствующего субстрата в лизосомах. Вызываемая патология зависит как от самого отсутствия необходимого фермента, так и от макромолекул тех веществ, которые накапливаются, и от тканей, в которых происходит их накопление. Например, при лейкодистрофии Креббса необходимый фермент (β -галактозидаза) отсутствует во всех тканях, однако накапливающееся вещество синтезируется только в мозге и почках, поэтому клинические проявления болезни ограничиваются ЦНС (Hischhorn, Weissmann, 1976).

Среди болезней накопления условно различают несколько групп в зависимости от природы накапливаемых полимеров. Болезни, вызываемые аномальным накоплением гликогена, называются гликогенозами, гликолипидов — гликолипидозами, гликозаминогликанов (мукополисахаридов) — мукополисахаридозами, а гликопротеидов — гликопротеинозами (Е. Л. Розенфельд, 1977).

Большинство лизосомных ферментов, за исключением кислой фосфатазы, являются гликопротеидами. Предполагают, что углеводные остатки на концах их молекул являются теми маркерами, по которым ферменты «узнаются» клетками. При отсутствии этих маркеров клетки перестают «узнавать» ферменты, что затрудняет их про-

никновение в клетки и препятствует их действию, хотя в таких случаях дефекты не затрагивают активных центров ферментов. Эти нарушения тоже влекут за собой определенный вид патологических проявлений, например болезнь Хюрлера и др. (Е. Л. Розенфельд, 1977).

Первой болезнью, которую связали с отсутствием одной из лизосомных гидролаз, был II тип гликогеноза. Эта болезнь явилась учебной моделью для анализа патологических изменений, ведущих к заболеванию, потому что обмен гликогена изучен лучше других соединений, например гликозаминогликанов. Узнав основные функции кислых гидролаз лизосом, можно было предсказать возможные нарушения в организме, к которым приведет отсутствие или недостаточная активность некоторых из них.

Важным признаком врожденной лизосомной аномалии является скопление определенных веществ во внутриклеточных вакуолях. Короткоживущие клетки (зернистые лейкоциты и др.) не имеют достаточно времени для накопления нерасщепленных продуктов, в частности гликогена. Депонирование их нарастает постепенно и поэтому симптомы болезни, отсутствующие сразу после рождения, начинают проявляться в течение первых месяцев или лет жизни.

Гликогеноз II типа отличается от других форм гликогеноза тем, что больные обычно способны к нормальной мобилизации гликогена и поэтому у них не наблюдается гипогликемии. Они страдают от мышечной слабости, которая возникает в результате разрушения мышечных волокон вследствие отложения в них гликогена. В печени и других тканях обнаруживают также избыточные количества гликогена. Обычно дети, страдающие этой формой болезни, погибают в течение первого года жизни, реже — живут лет до 15 (Hess, van Hoof, 1969). В клетках этих больных имеются нормальные количества всех ферментов, необходимых для расщепления гликогена, но у них полностью отсутствует связанная с лизосомами кислая α -гликозидаза, разрушающая гликоген до глюкозы. Смерть наступает от разрушения мышечной ткани, вероятно, вследствие переваривания ее катепсином, освобождающимся после механического разрыва лизосом, переполненных гликогеном.

Наследственным нарушениям в лизосомном аппарате принадлежит большая роль в возникновении ряда физических и умственных дефектов, характеризующихся как

липохондродистрофия (синдром Харлера). При этом заболевании в ряде клеток, особенно печени и головного мозга, наблюдают скопление гликолипидов и гликозаминогликанов, избыток которых больные выделяют с мочой.

Возможные два механизма, объясняющие скопление гликозаминогликанов в лизосомном аппарате тканей. Фибробласты синтезируют избыток гликозаминогликанов, которые выделяются в окружающие ткани и выводятся с мочой или поглощаются клетками в процессе эндоцитоза. В этом случае причиной заболевания является не дефицит какого-то фермента, а нарушения биосинтеза макромолекул, накапливающихся в клетках. В культуре ткани фибробласты таких больных действительно синтезируют излишек гликозаминогликанов.

Скопление гликозаминогликанов в культуре фибробластов может также являться следствием дефекта и их способности разрушать эти вещества. При тщательном изучении активности ряда кислых гидролаз у больных были обнаружены разные виды нарушений в лизосомных ферментных системах. У определенной группы больных можно обнаружить полное отсутствие α -фукозидазы, у других — резкое увеличение лизосомных гранул бывает связано с избыточной секрецией разных ферментов. У некоторых больных наблюдали снижение в 4—5 раз активности β -галактозидазы в печени, коже и мозге. Несмотря на такое разнообразие изменений, все же считают, что в основе патогенеза этой группы болезней лежат те или иные врожденные нарушения лизосомного аппарата, так же как и при ряде других подобных заболеваний (болезнь Каушера — Пика, лейкодистрофия и др.). Негс и ван Нооф (1969) полагают, что схема возникновения этих заболеваний примерно такова: мутация определенного гена влечет за собой изменения какого-то фермента, что приводит к нарушениям переваривания одного или другого продукта обмена, в результате чего развивается его накопление, приводящее к развитию клинических симптомов болезни. Иногда однотипные проявления заболевания могут зависеть от нарушений в разных ферментных системах, так же как и один и тот же ферментный дефект может проявляться по-разному.

В последние годы заболевания, вызванные наследственными нарушениями в обмене гликоконъюгатов, интенсивно исследуются. Расшифрован ряд ферментных дефектов при различных типах мукополисахаридозов об-

мен которых изучен значительно меньше, чем других углеводсодержащих полимеров (Е. Л. Розенфельд, 1977; Hirschhorn, Weissmann, 1976).

Важно отметить, что генетические расстройства лизосомного аппарата не ограничиваются одними дефектами лизосомных ферментов. В некоторых случаях в лизосомах скапливаются вещества, образующиеся в организме в результате наследственной недостаточности нелизосомных ферментов, как это наблюдается, например, при подагре, болезни Вильсона (гепатолентикулярная дегенерация) и, возможно, цистинурии. При подагре микрокристаллы уратов, окруженные белковой оболочкой, проникают в лейкоциты и вызывают разрывы образующихся вторичных лизосом, подобно тому как частицы кремния вызывают разрывы лизосом макрофагов. Высказывались предположения, что кристаллы уратов могут первоначально образовываться в лизосоме и вызывать ее разрыв. При цистинурии (болезни Линьяка—Фанкони) цистин накапливается в лизосомах клеток МФС, лейкоцитах и фибробластах. Предполагают, что при этом заболевании нарушается интенсивность обмена дисульфидов или их транспорт. Встречаются и такие заболевания, патогенез которых объясняется нарушением функции лизосомного аппарата, а не изменением активности каких-либо ферментов. Примером таких болезней могут служить хронические гранулематозные болезни и синдром Чедиака — Хигаси. При последнем лизосомные гранулы имеют ненормально большие размеры, однако бедны ферментами, вследствие чего клетки МФС не способны убивать фагоцитированные бактерии, хотя сам процесс поглощения их при этом не изменяется. Если дети не умирают от инфекции в начале жизни, то впоследствии у них развивается гиперплазия лимфатической системы. Они погибают в детском возрасте при явлениях гепатоспленомегалии, лимфаденопатии и лимфоидной инфильтрации большинства органов. Механизм поражения функции этих оргanelл до конца не выяснен. Возможно, нарушается механизм слияния лизосомных гранул с фагосомой, вероятно, за счет нарушений в образовании мембран лизосомных гранул (Hirschhorn, Weissmann, 1976). Гигантские оргanelлы при этом заболевании встречаются не только в лейкоцитах, но и в коже больных детей.

Синдром Чедиака — Хигаси встречается и у животных (норки, мыши, лошади) и его иногда используют при вы-

ведении специальных пород, например алеутских норок, несмотря на высокую чувствительность таких животных к гнойным инфекциям.

Как уже упоминалось, нарушение лизосомных функций наблюдается и при хронических гранулематозных болезнях. Лейкоциты больных детей не способны убивать некоторые условно патогенные микроорганизмы (например, *A. aerogenes* или *Staph. aureus*), хотя другие виды (стрептококки) уничтожают обычным путем. При этом не обнаруживается особых отклонений в содержании или активности лизосомных ферментов в лейкоцитах. Последние обладают нормальным уровнем активности миелопероксидазы и фагоцитина.

В настоящее время возникновение гранулематозной реакции пытаются объяснить отсутствием одного из кофакторов в пероксидазной системе, который необходим для уничтожения некоторых видов бактерий. Определенные микроорганизмы сами вырабатывают этот кофактор (H_2O_2), необходимый для их разрушения. Другие его не продуцируют и поэтому не разрушаются в системе, где его не хватает (Hirschhorn, Weissmann, 1976).

Встречается и ясно выраженная миелопероксидазная недостаточность лейкоцитов и моноцитов, в результате чего последние не способны убивать *Candida albicans*, *Staph. aureus* и различные грамотрицательные микроорганизмы. Однако у лиц, страдающих этой формой недостаточности клеток МФС, симптомы гранулематозной болезни обычно отсутствуют.

Фибриновые и казеозные отложения, характерные для ревматических и туберкулезных артритов, свидетельствуют о недостаточности функции лизосом клеток МФС. Синовиальные оболочки суставов у животных и человека выстланы клетками, представляющими собой популяцию фиксированных макрофагов. Эти макрофаги обеспечивают в норме фагоцитоз и переваривание продуктов физиологического некролиза. При любых повреждениях суставов популяция внутрисуставных макрофагов может пополняться за счет моноцитов кровяного русла. Какие-либо нарушения этого создают своеобразную ситуацию, которая приводит к развитию артрита и даже анкилоза.

Уже давно экспериментально установлено, что внутрисуставное многократное введение экстрактов из лизосом может вызывать у кроликов развитие острого артрита. Эти наблюдения дали основания Weissmann (1964) пред-

положить, что освобождающиеся в патологических условиях гидролитические лизосомные ферменты повреждают соединительную ткань. Продукты ее распада могут вызывать продукцию аутоантител, которые в свою очередь могут реагировать как с поврежденной, так и с нормальной тканью, что и лежит в основе патогенеза артритов. В действительности патогенез болезни гораздо сложнее хотя бы потому, что происходят нарушения в распределении и выведении фибрина и связанной с этим продукции фибринстабилизирующего фактора, появление у больных ревматизмом антиплазминовых антител и другие проявления болезни. Эти соображения привели к выводу о том, что развитие болезни может вызываться недостатком лизосомных гидролаз как при возникновении этого дефицита в результате избытка патологических продуктов, так и при генетических дефектах (Lack, 1966). В ответ на раздражитель у таких больных чаще, чем в норме, наблюдаются нарушения во внутриклеточном переваривании, возможно сопровождающиеся повышенным выделением недефицитных ферментов. Возникает перегрузка макрофагов синовиальных оболочек.

Продукты распада соединительной ткани, образование ревматоидного фактора в результате разрушения гамма-глобулина внеклеточными гидролазами и другие продукты в воспалительном очаге вызывают усиленную продукцию гидролаз лизосомами, что приводит к возобновлению цикла. Начинают вырабатываться антитела к лизосомным ферментам, нейтрализующие их активность внутри фаголизосом и повреждающие ранее недефицитные ферменты. Этот процесс может охватывать и другие суставы (Thomas, 1969).

В лизосомах клеток синовиальных мембран и хрящей содержится активатор плазминогена. В норме в синовиальную жидкость элементы свертывающей системы крови не проникают, при воспалении же они могут попадать в суставы и фибринолиз происходит под влиянием плазмина, образующегося из фибриногена и плазминогена под влиянием активатора плазминогена, содержащегося в лизосомах.

Макрофаги, полученные из перитонеальной полости нормальных мышей, не синтезируют активаторы плазминогена. Однако при культивировании таких макрофагов в присутствии среды после культивирования селезеночных клеток, стимулированных конканавалином А, макро-

фаги начинают синтезировать и выделять этот фермент. Под влиянием этой среды увеличивается также продукция активатора плазминогена макрофагами мышей, обработанных эндотоксином. Эти данные позволяют предполагать, что синтез активатора плазминогена макрофагами регулируется лимфоцитами и находится под гормональным контролем (Vassalli, Reich, 1977). При нарушениях лизосомного аппарата фибринолиз может нарушаться, в результате чего отложения фибрина могут резко изменить функцию сустава.

Эти данные привели к мысли, что в патогенезе спаечного процесса, который часто развивается после обширных хирургических вмешательств в брюшной полости, может играть роль недостаточность лизосомного аппарата, будь она врожденной или приобретенной, т. е. обусловленной длительно текущим процессом.

Совместно с С. Д. Андреевым нами была проведена активность катепсина D в макрофагах перитонеальной полости человека, полученных во время операции, и в КПЭ кроликов, у которых искусственно вызывали образование спаек. В обоих случаях (всего было обследовано 9 человек и 25 кроликов) было обнаружено резкое понижение активности катепсина D. Желая восполнить количество активно действующих ферментов, предприняты эксперименты, в которых попытались предупредить развитие спаечного процесса материалом, полученным из лизосом.

В обычных условиях *in vivo* процесс переваривания идет ступенчато, т. е. одни ферменты переваривают нативную молекулу до определенных субъединиц (например, кlostридиопептидаза или коллагеназа расщепляет коллаген при нейтральном pH), которые затем разрушаются последовательно другими ферментами, уже не столь специфичными, но различными при разных значениях pH.

В лизосомах, кроме того, содержится ряд неферментных факторов, из которых только часть идентифицирована, но которые могут иметь большое патофизиологическое значение. Поэтому части кроликов, оперированных в условиях, приводящих в 100% случаев к образованию спаек, в течение 3 дней, начиная с момента операции, вводили внутрибрюшинно материал, полученный из лизосом и тестируемый по активности катепсина. В $\frac{2}{3}$ случаев такая обработка подопытных животных полностью предупреждала образование спаек, а у остальных они были

ничтожными по сравнению со спайками, наблюдавшимися у контрольных кроликов (рис. 5). Эти наблюдения свидетельствуют не только о том, что в патогенезе спаек имеет большое значение состояние лизосомного аппарата, но и позволяют надеяться на возможность предупреждения этой тяжелой патологии в клинике.

При ряде инфекций (туберкулез, бруцеллез, листериоз, сальмонеллез, туляремия и т. д.) основные защитные функции выполняют клеточные, а не гуморальные механизмы.

Сравнительное изучение макрофагов у резистентных и чувствительных к туберкулезу линий кроликов показало, что резистентность к первичному заражению определяется двумя функциями макрофагов: большей их способностью к фагоцитозу туберкулезной палочки и более полным внутриклеточным ее разрушением. При этом макрофаги резистентных к туберкулезу кроликов обладали более высоким уровнем активности ферментов (например, кислой фосфатазы), чем макрофаги чувствительных кроликов (Lurie, Daupenbergh, 1965).

Макрофаги нормальных и иммунизированных кроликов ведут себя различно при захвате и переваривании специфического агента. В КПЭ от животных, иммунизированных *L. monocytogenes*, после поглощения этой листерии обнаруживали высокоразвитый пластинчатый комплекс и большое количество цитоплазматических гранул, которые быстро сливались с фагосомой, обуславливая резкую зазубренность ее стенки. У нормальных макрофагов, инкубированных с тем же микроорганизмом, пластинчатый комплекс оставался неизмененным и стенка фагосомы очень редко имела зазубрины (North, Maekapess, 1963). Некоторые авторы связывают отличия в структуре иммунных и нормальных макрофагов с тем, что макрофаги, ранее встречавшиеся с данным объектом фагоцитоза, могут гораздо энергичнее синтезировать ключевые гидролазы при новом контакте с ним (Heise et al., 1965). Возможно также, что после иммунизации или инфекции появляется новая популяция измененных фагоцитов, поскольку наблюдается гиперплазия клеток МФС.

В настоящее время многочисленные данные свидетельствуют о том, что при системной активации макрофагов, наблюдаемой при ряде хронических инфекций или вызываемой введением адьювантов, последние не толь-

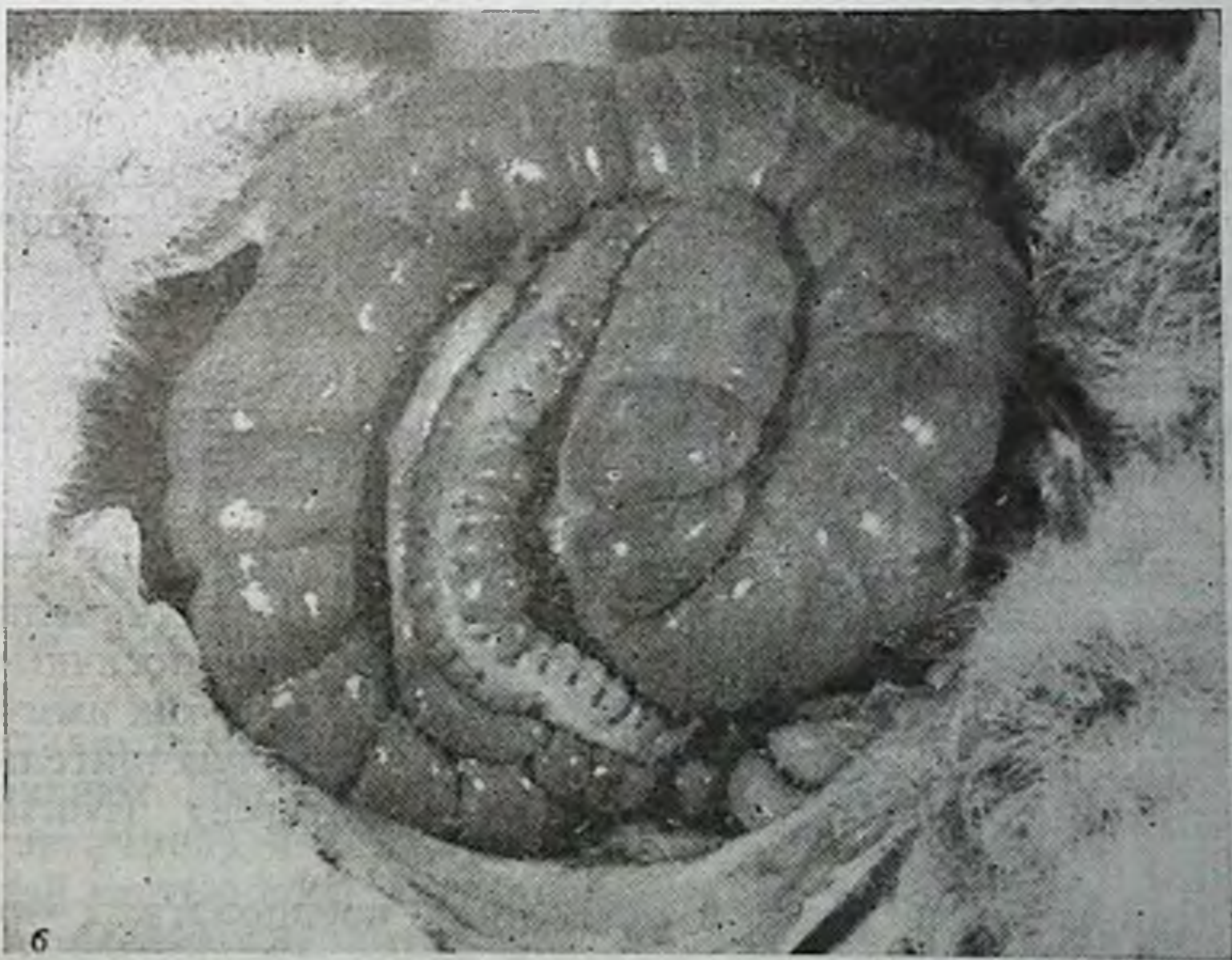
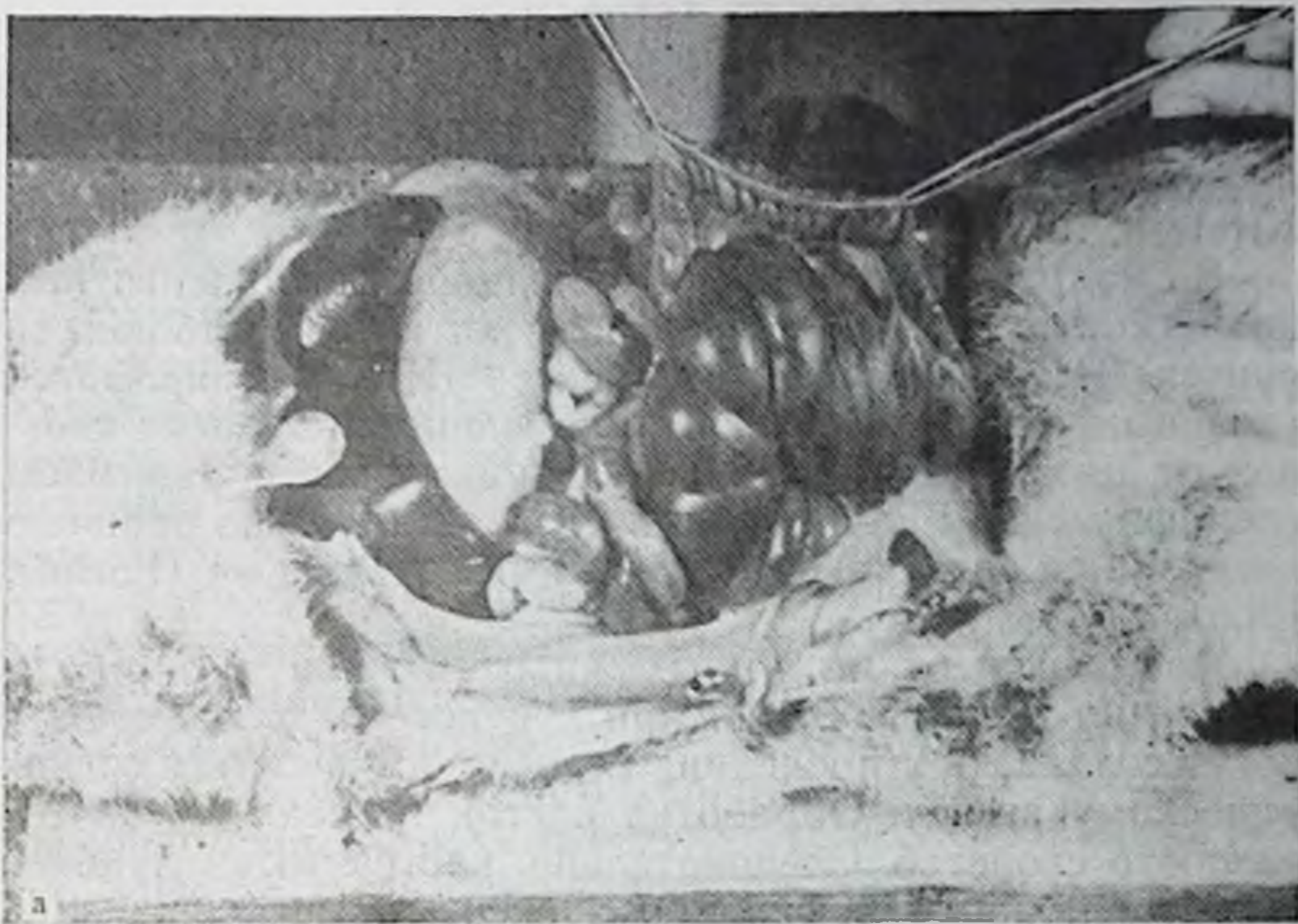


Рис. 5. Профилактика спаек введенным материалом из лизосом.
а — наличие спаек после операции; б — отсутствие спаек после введения лизосомного материала.

ко приобретают повышенную способность защищать против инфекций, но и способны неспецифически угнетать рост опухолей. Таким образом, их роль в естественном иммунитете является, по-видимому, ведущей (North, Kirstein, 1977).

В макрофагах от сенсibilизированных животных после контакта со специфическим антигеном наблюдали синтез ДНК. Вероятно, что синтез ДНК у макрофагов связан не со специфическими изменениями в самих клетках от иммунных животных, а является отображением специфической пролиферации клеток в ответ на реакцию антигена со связанными с клетками антителами (Forbes, 1966).

Макрофаги от иммунных животных или элюированный с них макроглобулин при переносе их реципиентам могут создавать у последних невосприимчивость к специфическому агенту. Обработка клеток трипсином уничтожает это свойство. Следовательно, клеточный иммунитет к бактериальным инфекциям зависит от антител, хотя в сыворотке крови защитные антитела не обнаруживаются, возможно, вследствие высокой цитотоксичности к макрофагам. Однако если повышение бактерицидных свойств макрофагов обусловлено связанными с клетками антителами, то оно должно быть специфичным, чего не наблюдается. Наоборот, имеются данные, свидетельствующие о том, что приобретенный иммунитет к микроорганизмам, способным выживать и размножаться в фагоцитах, не связан с гуморальными антителами. Он зависит от способности хозяина приобретать в процессе инфекции мононуклеарные фагоцитирующие клетки с повышенной бактерицидной активностью. Эта форма резистентности неспецифична по своим проявлениям, хотя иммунологическая специфичность связана с ней каким-то образом, потому что резистентность восстанавливается только при реинфекции хозяина гомологичным микробом, и у животных, приобретающих этот тип иммунитета, появляется одновременно и гиперчувствительность замедленного типа к данному антигену (North, 1969).

Данные ряда авторов позволяют предполагать, что разная чувствительность людей к лепре связана с генетическими особенностями макрофагов, подобно тому как генетические дефекты в зернистых лейкоцитах приводят к гранулематозной болезни. Так, было показано, что в то

время как макрофаги морских свинок способны лизировать *M. lepra* и трансформироваться в эпителиоидные клетки с образованием типичной гранулемы, крысиные клетки не способны после заражения ими ни к лизису *M. lepra*, ни к трансформации в эпителиоидные клетки (Holmes et al., 1967).

Нарушение функции макрофагов в ряде случаев способствует разрастанию соединительной ткани и образованию фиброзных узлов, по-видимому, за счет выделения фагоцитами какого-то вещества, химическая структура которого не установлена. Однако прибавление вещества, выделяемого фагоцитами, в смеси с кремнеземом к культуре фибробластов приводит к образованию в ней соединительной ткани. Возможно, что этот механизм участвует в образовании фиброзных узлов при силикозе (Э. Аллисон, 1969). Силикоз является типичным примером заболевания, обусловленного повреждением лизосомных мембран клеток МФС. В результате исследований *in vivo* и *in vitro* этому автору удалось показать, что токсичность кремнезема для клеток МФС объясняется его способностью образовывать водородные связи с лизосомными мембранами, что ведет к разрыву мембран. Гибель большого числа фагоцитов вызывает реакцию со стороны фибробластов, которые начинают синтезировать, как упоминалось выше, коллагеновые волокна, скапливающиеся в виде пучков.

Асбестовая пыль также способна вызывать в легких разрастание соединительной ткани, вероятно, таким же образом, поскольку асбест тоже концентрируется в фагосомах. Однако вещества, накапливающиеся в фагосомах (алмазная пыль, двуокись титана), но не приводящие к разрыву лизосомных мембран и гибели клетки, могут длительное время сохраняться во вторичных лизосомах, не вызывая патологического процесса. Его возникновение и развитие вызывают чаще всего преждевременный разрыв лизосомной мембраны. Это приводит к освобождению не только гидролитических ферментов, но и различных активаторов (типа активатора плазминогена, гистамина) и пирогенов. Эти факторы являются составной частью воспалительной реакции и во многих случаях определяют развитие того или иного вида патологии.

Выходу лизосомных ферментов под влиянием различных агентов (бактерии и их токсины, вирусы, ультрафиолетовые лучи, витамин А) или вследствие наследствен-

ной хрупкости мембраны лизосом придают большое значение в возникновении аутоиммунных процессов. Освобожденные гидролазы могут вызывать переваривание компонентов собственных клеток и тканей, фрагменты которых, соединившись с цитоплазматической РНК фагоцитов, делаются устойчивыми к перевариванию и могут переноситься в антителопродуцирующие клетки. При голоде, кислородном голодании и различных нарушениях обмена роль фагосом могут выполнять собственные лизосомы клеток, и эта аутофагия может также закончиться развитием аутоиммунного процесса (Weissmann, 1964). Аутоиммунизация является достаточно широко распространенным явлением, чтобы механизм ее возникновения мог объясняться только появлением «запретного клона», как это следует из теории Барнета (1971). Более правдоподобно предположение о том, что существующие в норме клетки, способные синтезировать аутоантитела, нормально разрушаются гидролитическими ферментами лизосомного аппарата клеток МФС.

Разнообразные причины, приводящие к нарушению процесса нормального аутолиза, могут привести к появлению не полностью деградированных собственных антигенов, способных вызвать появление аутоантител. Помимо обширных травм и различных агентов, служащих причиной измененной деградации собственных клеток и тканей, неполное их переваривание может быть обусловлено врожденными аномалиями лизосомного аппарата клеток МФС. Вопрос этот исследован еще недостаточно, хотя заслуживает пристального внимания, ибо известно семейное предрасположение к некоторым аутоиммунным состояниям. Особенно важны были бы эти исследования в ревматологии, тем более что потенциальная слабость лизосомной мембраны у человека может быть предупреждена уже в настоящее время или скорректирована медикаментозными средствами.

Рассматривая вопрос о роли клеток МФС и их лизосомного аппарата в патогенезе аутоиммунных процессов, нельзя не коснуться значения этих представлений для объяснения механизма старения, поскольку неоднократно высказывались предположения, что в основе старения лежат аутоиммунные реакции. Установлено, что у вышших животных с возрастом усиливаются проявления аутоиммунных феноменов. Сыворотка пожилых людей содержит обычно больше аутоантител, чем молодых. Так,

у людей старше 65 лет антинуклеарные антитела и ревматоидный фактор встречаются в 50—60% случаев и не менее чем у 20—25% людей этого возраста можно обнаружить антитела против щитовидной железы, тканей желудочно-кишечного тракта (Schwick, Becker, 1969; Walford, 1969).

Полагают, что накопление аутоантител в течение жизни происходит в процессе соматических мутаций или других изменений генов, в результате чего клетки претерпевают изменения, сопровождающиеся увеличением иммуногенетических различий, что приводит к длительным слабо выраженным реакциям гистонесовместимости или аутоиммунизации.

Пытаясь проверить эту гипотезу, авторы использовали ряд иммунологических моделей: парабноз, внутрисердечное введение новорожденным иммунокомпетентных клеток от взрослых животных или несингенных линий мышей, отличающихся по слабому Hh_1 -локусу гистосовместимости, и, наконец, использовали для продления жизни животных введение им иммунодепрессивных веществ. В результате обнаружили определенные параллели между различными проявлениями трансплантационных или аутоиммунных нарушений и нормальным старением. Все это дало основания высказать предположение, что старение вызывается накапливающимися вариантами соматических клеток и нарушениями со стороны систем, способствующих сохранению клеточного гомеостаза (Walford, 1969). Следовательно, в процессе старения немалую роль играют клетки МФС, тем более что помимо всего при нарушениях проницаемости лизосомной мембраны, часто наблюдающихся во время всего жизненного цикла, из лизосом наряду с другими ферментами освобождается и ДНК-аза. Разрывы в ДНК, вызванные лизосомной ДНК-азой, не восстанавливаются, потому что молекула этого фермента имеет два активных центра, взаимодействующих одновременно с обеими цепями ДНК. Э. Аллисон (1969) наблюдал разрывы в хромосомах в присутствии лизосомной ДНК-азы, что дало основание предположить, что факторы, способствующие выходу лизосомных ферментов, могут вызывать изменения в хромосомах.

Следовательно, клетки МФС с их хорошо развитым и чувствительным лизосомным аппаратом могут играть большую роль в возникновении соматических мутаций и

следовательно, в патогенезе аутоиммунных процессов и старения организма.

Многие ученые склоняются к мнению, что макрофаги принимают самое непосредственное участие в патогенезе опухолей. Это мнение основано на данных об их значении в приспособлениях, обеспечивающих гомеостаз организма, и в системах иммунологического надзора (Evans, Alexander, 1972; Hibbs, 1976).

Попытки найти общую точку приложения всех полиэтиологических факторов, вызывающих рак, были сделаны впервые Э. Аллисоном (1966). Поскольку все последующие поколения опухолевой клетки наследует ее способность к неограниченному росту и некоторые другие особенности, то, вероятнее всего, опухолевая клетка возникает в результате мутаций, во всяком случае в результате нарушений, возникающих в геноме клетки.

Способности лизосомных ферментов клеток МФС вызывать разрывы хромосом и увеличивать число мутаций в клетках позволяет предполагать, что нарушение функции лизосомного аппарата, независимо от вызвавшей его причины, может приводить к возникновению злокачественного перерождения тканей.

В лаборатории Э. Аллисона было показано, что избирательное повреждение лизосом эмбриональных клеток методом фотосенсибилизации приводит к тому, что при введении этих клеток сингенным животным у них в определенном числе случаев возникают опухоли.

Пока не существует достоверных доказательств участия лизосом клеток МФС в возникновении некоторых форм рака, но гипотеза Аллисона достаточно серьезно аргументирована и заслуживает тщательной проверки. Это связано с тем, что при некоторых наследственных аномалиях структуры и функции лизосом часто встречаются злокачественные опухоли селезенки и лимфатических узлов, а путем введения частиц кремния в грудную полость крыс можно вызвать злокачественную опухоль тимуса.

Постепенно накапливается все больше сведений об участии макрофагов в процессах, ведущих к малигнизации тканей, о возможности стимулировать рост опухолей при нарушении функции макрофагов и о сходных ее изменениях у больных раком, аутоиммунными болезнями или после пересадок органов и тканей (Isa, Sanders, 1975; Jülich, 1975). У детей с врожденными нарушениями лизо-

сомного аппарата чаще развиваются опухоли. Связано ли это с нарушением процесса освобождения от микроорганизмов и вирусов или с появлением хромосомных aberrаций, пока не выяснено.

После облучения или обработки мышей, имеющих рак грудных желез, цитоксаном (алкилирующий агент) у них повышаются количество и размеры лизосом и активируются лизосомные ферменты в обработанных тканях, что приводит к дегенеративным изменениям в опухолевых клетках, особенно при одновременном введении витамина А, повышающего проницаемость лизосомных мембран. Эти наблюдения позволяют предположить, что в некоторых случаях химиотерапевтический эффект достигается посредством изменения функции лизосомного аппарата клеток.

Лизосомный аппарат клеток имеет большое значение для индукции клеточного деления. Рядом исследователей было показано, что агенты, повышающие проницаемость лизосомных мембран, в том числе разнообразные антигены, вызывают бласттрансформацию лимфоцитов, которая может быть подавлена агентами, стабилизирующими лизосомную мембрану (кортизон, хлороквин и др.). Существует предположение, что обычно деление клеток подавляется каким-то белком, который разрушается лизосомными ферментами (Hirschhorn et al., 1968).

Весьма вероятно, что зернистые лейкоциты и клетки МФС, первыми встречающиеся с чужеродными агентами, воздействуя выделенными вовне лизосомными ферментами на мембраны лимфоцитов, активируют их лизосомный аппарат и тем самым индуцируют трансформацию лимфоцитов, играющую роль в клеточном и гуморальном иммунитете.

Аналогичный механизм имеет место при оплодотворении. Акросома сперматозоида содержит гиалуронат-лиазу и некоторые другие ферменты, характерные для лизосом, которые разрушают оболочку яйцеклетки, способствуют проникновению в нее головки сперматозоида и нарушают целостность кортикальных гранул яйцеклетки, являющихся по сути ее лизосомным аппаратом. Все эти факторы и индуцируют деление яйцеклетки. Естественно, что в случае ферментного дефекта акросомы сперматозоида может нарушаться процесс оплодотворения.

Как видно из изложенного выше, в последнее время достигнуты большие успехи в изучении не только отдель-

ных лизосомных ферментов и их функций, но и их расстройств. Все это дает надежду на разработку терапии ряда тяжелых болезней. Разработан ряд приемов, позволяющих в некоторых случаях ставить пренатальный диагноз болезней накопления по определению активности ферментов в культуре клеток амниотической жидкости в определенный период развития плода или выявить носителей болезней накопления по определению активности ферментов в культуре фибробластов кожи больных.

Однако лечение пока далеко не эффективно. Пытаются прибегать к заместительной терапии ферментами, как попытались и мы в своих экспериментах. В клинике пользуются внутривенным введением чистых ферментов (если они получены) или внутривенным введением свежей плазмы.

Глава III

РОЛЬ МАКРОФАГОВ И ИХ ЛИЗОСОМНОГО АППАРАТА В ИММУНИТЕТЕ Естественные механизмы защиты

В основе любой защитной реакции организма лежит его способность распознавать чужеродный агент и избавляться от него. Наиболее древней формой этой функции является пищеварение. В процессе эволюции осуществлялся переход от внутриклеточного к внеклеточному пищеварению, в результате чего клетки тканей высших животных получают большую часть питательных веществ из кровяного русла в виде молекул простых веществ, не нуждающихся в переваривании в клетке. Однако и у высших животных, особенно при парентеральном пути проникновения различных веществ или микроорганизмов, клеткам приходится поглощать крупные молекулы или другие клетки, что они осуществляют с помощью эндоцитоза. Дальнейшая судьба захваченного агента зависит от переваривающей способности ферментных систем клетки. Если клеточные ферменты способны расщепить его до простых составных частей—аминокислот или пептидов, которые могут быть использованы организмом или выведены из него, то процесс ограничивается актом клеточного пищеварения. Еще в конце прошлого века работами В. К. Высоковича и И. И. Мечникова было показано, что этот механизм, названный фагоцитозом, играет защитную роль, так как очищает организм не только от инертных частиц, но и от бактерий.

Campbell и Garvey (1963) выдвинули гипотезу, согласно которой организм распознает «свое», т. е. структурные единицы, идущие на построение собственных белков и тканей, и «чужое» при помощи имеющихся в клетках ферментов. В тех случаях, когда чужеродное вещество устойчиво к действию пищеварительных систем клетки, оно вызывает цепь реакций, в том числе и антителообразование, направленных на то, чтобы сделать чуждое вещество доступным перевариванию и удалению. В этом аспекте можно рассматривать антителообразова-

ние, как это и делали некоторые авторы, как выработку адаптивного фермента, специфически направленного против агента, вызвавшего его появление.

Та роль, которую лизосомный аппарат клеток ретикулоэндотелиальной системы играет в катаболизме антигенов, позволила предположить, что он может явиться одним из основных механизмов, при помощи которых осуществляется распознавание чужеродности. Набор пищеварительных ферментов клеток адаптирован к обычно используемым организмом веществам, в том числе и собственным белкам. Например, установлено, что катепсины расщепляют только пептиды, состоящие из L-аминокислот, из которых построен белок тканей животных. Пептиды же, содержащие D-аминокислоты, устойчивы к гидролазам лизосом и долго сохраняются в последних (Ehrensreich, Cohn, 1969; Axline, Cohn, 1970).

При изучении скорости пиноцитоза и фагоцитоза аутологичных белков и эритроцитов в нативном и денатурированном виде было показано, что лейкоциты и макрофаги могут распознавать небольшие различия в структуре функционально одинаковых макромолекул клетки (Wona et al., 1967). Имеются данные о том, что трансплантационные H-2-антигены тесно связаны с лизосомными фракциями печени и селезенки мышей (Basch, Stetson, 1963). Присутствие трансплантационных антигенов в лизосомном аппарате клеток тоже может иметь значение для распознавания ими чужеродности (Basch, Stetson, 1963).

Обнаруженная нами длительная персистенция высокоиммуногенного антигена в лизосомных фракциях клеток селезенки также свидетельствует в пользу обсуждаемой гипотезы.

П. Н. Грабар (1975), разбирая механизм образования аутоантител в свете различных иммунологических теорий, формулирует гипотезу, очень близкую к представлениям Campbell и Garvey (1963) и нашим, заставившим нас провести ряд экспериментальных исследований (И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1969; И. Я. Учитель и др., 1969). Результаты этой работы, которые будут приведены ниже, убедили нас в правомочности сделанного предположения.

Практически гипотеза П. Н. Грабара также сводится к тому, что главным способом распознавания собственных и чужеродных белков служит их ферментативнос

расщепление. Отсутствие или существование лишь в следовых количествах аутоантител в норме, по мнению П. Н. Грабара, объясняется полной деградацией собственных белков аутолитическими ферментами. В доказательство справедливости своего предположения автор приводит данные о том, что получить специфические антитела против нуклеиновых кислот можно только при иммунизации животных этими кислотами в комплексе, защищающем их от действия нуклеаз, например в комплексе с рибосомами или с метилальбумином. Необходимость использования адъюванта Фрейнда для получения у животных аутоантител П. Н. Грабар объясняет также предохранением антигена от действия фермента маслами, входящими в состав адъюванта (П. Н. Грабар, 1975).

Ранее мы уже высказывали предположение, что нечувствительность иммунокомпетентных систем к собственным антигенам может быть связана с адаптацией во время эмбриогенеза ферментных систем к присутствующим в это время антигенам, обеспечивающей в дальнейшей жизни их полное и быстрое переваривание (И. Я. Учитель, 1970).

Из изложенных данных очевидно, что открытие лизосом и изучение их функции совершенно по-новому осветили ту роль, которую могут играть клетки МФС в поддержании гомеостаза организма, в естественном и даже специфическом иммунитете.

Участие макрофагов в распознавании чужеродности

Центральным остается вопрос о роли клеток МФС и, в частности, макрофагов в распознавании чужеродности. В настоящее время не остается сомнений в том, что макрофаги способны распознавать и захватывать измененные клетки и белковые молекулы собственного организма. Именно благодаря этому свойству макрофаги способны выполнять роль «мусорщиков», удаляя из организма поврежденные или отмирающие клетки и ткани.

Установлена роль макрофагов в аутолизе, в обмене лимфоцитов тимуса (Metcalf, 1966), в резорбции тканей после воспаления и метаморфозе (Mayberg, 1964; Helminen, Ericsson, 1968). Большую роль играют макрофаги в метаболизме собственных эритроцитов (Rabinovitch, 1969), при этом экспериментально установлено, что за-

хват неизмененных клеток ничтожен, но искусственно поврежденные сингенные эритроциты усиленно фагоцитируются макрофагами (Maguta, Mizuno, 1971).

При изучении захвата макрофагами эритроцитов от животных разных видов было установлено, что степень поглощения пропорциональна видовым различиям между макрофагами и эритроцитами. Появились исследования, свидетельствующие о том, что макрофаги способны распознавать и растворимые антигены; так, было показано, что ксеногенный гемоглобин захватывается макрофагами интенсивнее, чем сингенный (Bona, Sulica, 1967). Однако единого мнения пока нет. Например, Schmidtke и Unanue (1971) считают, что аутологичный и гетерологичный альбумины равно одинаково захватываются и расщепляются макрофагами и скорость захвата и выведения прямо пропорциональны степени агрегации белка. В то же время опубликованы данные о том, что лизосомные ферменты печеночных клеток крыс расщепляют *in vitro* чужеродный сывороточный альбумин интенсивнее и в больших количествах, чем собственный, но вместе с тем чужеродный белок расщепляется только до пептидов, которые еще способны вызывать иммунный ответ, а сингенный сывороточный альбумин лизосомные ферменты расщепляют до аминокислот, используемых организмом (Curtis, Ryan, 1973).

Желая проверить высказанное Campbell и Garvey предположение, что антителообразование вызывают агенты, которые не могут быть полностью переварены в данном организме, мы сопоставили способность к антителообразованию на корпускулярные антигены с активностью катепсина D в клетках МФС у мышей разных линий (И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1969, 1972). Данные этих опытов представлены на рис. 6. Как видно из приведенных данных, активность лизосомных ферментов (катепсин D) была наибольшей у мышей линии СЗН, которые в противоположность мышам других линий плохо вырабатывали антитела на малые дозы эритроцитов барана (5×10^6) и тифозной вакцины (250 млн. микробных тел). Ни у одной из 45 мышей линии СЗН, обладающих, как было показано, наивысшей активностью катепсина D в селезенке, не было обнаружено нормальных гемагглютининов в сыворотке крови, в то время как у такого же количества мышей линии С57В1 нормальные гемагглютинины были обнаружены в $\frac{3}{4}$ всех случа-

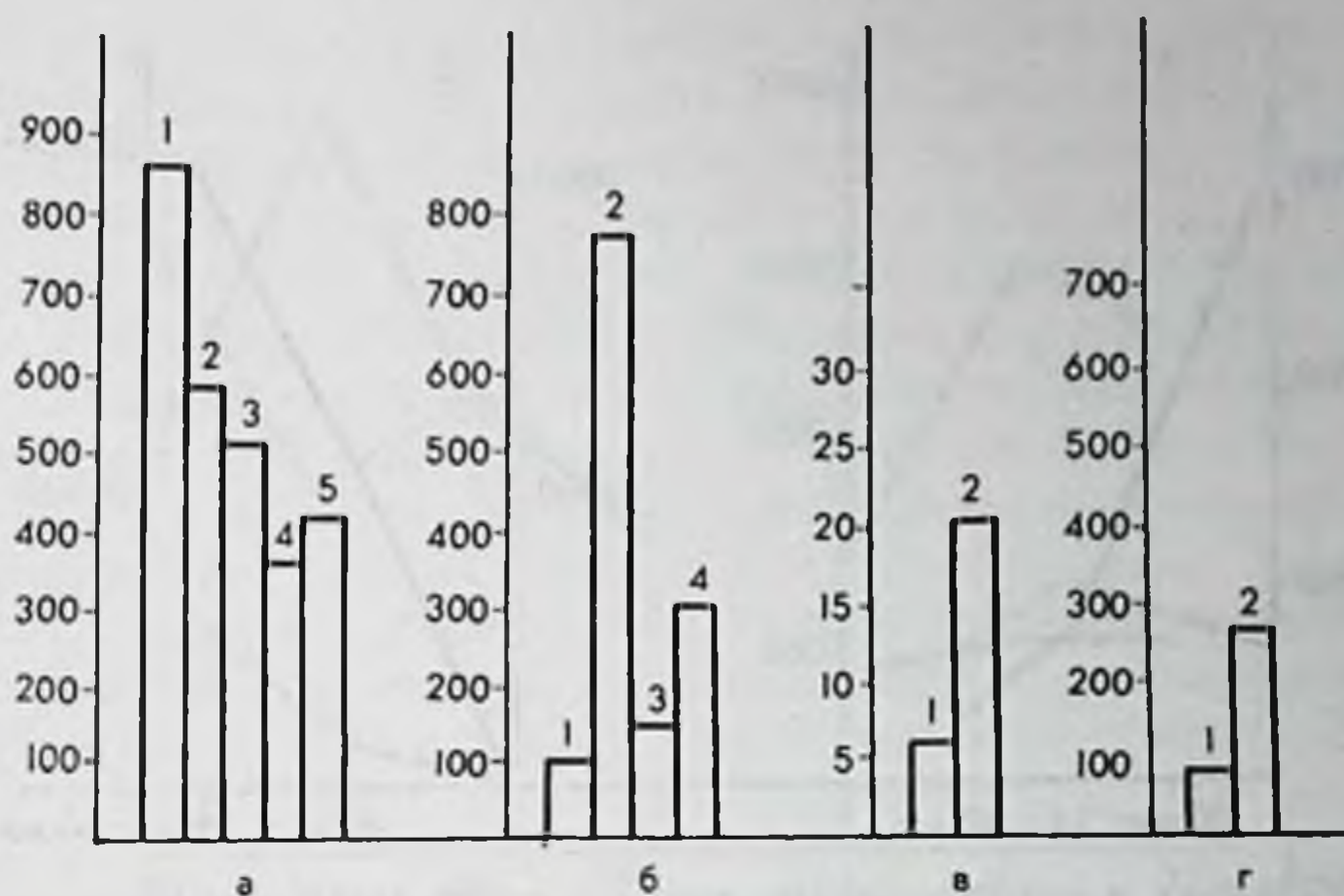


Рис. 6. Активность катепсина D (мкг тирозина на 1 мг белка) в селезенке и антителообразование у мышей разных линий.

1 — мыши линии СЗН; 2 — С57Black; 3 — А; 4 — Balb/c; 5 — СВА. По вертикали: а — мкг тирозина на 1 мг белка; б — титры гемагглютининов; в — количество антителообразующих клеток (бляшек) на 10^5 клеток; г — титр агглютининов.

св. Эти наблюдения и заставили нас предположить, что высокая активность лизосомных ферментов у мышей линии СЗН обеспечивает более полное переваривание эритроцитарного антигена, отчего у них отсутствуют нормальные антитела и снижена продукция антител в ответ на его введение. Большое число особей, имеющих нормальные гемагглютинины к эритроцитам барана среди мышей линии С57В1 (и некоторых других), со значительно более низкой активностью лизосомных ферментов в селезенке, подтверждает также гипотезу П. Н. Грабара о роли протеолитических ферментов в механизмах аутоиммунизации (П. И. Грабар, 1975).

Для выяснения роли лизосомного аппарата макрофагов в распознавании чужеродности в нашей лаборатории Х. М. Исиной (1974) были изучены захват и переваривание ауто- и гетерологичных эритроцитов макрофагами мышей *in vitro* и *in vivo*. Перитонеальные макрофаги получали от мышей линии СЗН, заранее стимулированных введением 2 мл мясо-пептонного бульона. Для определения захвата и переваривания в качестве антигенов использовали эритроциты мышей этой же линии и эритроциты барана, меченые ^{51}Cr .

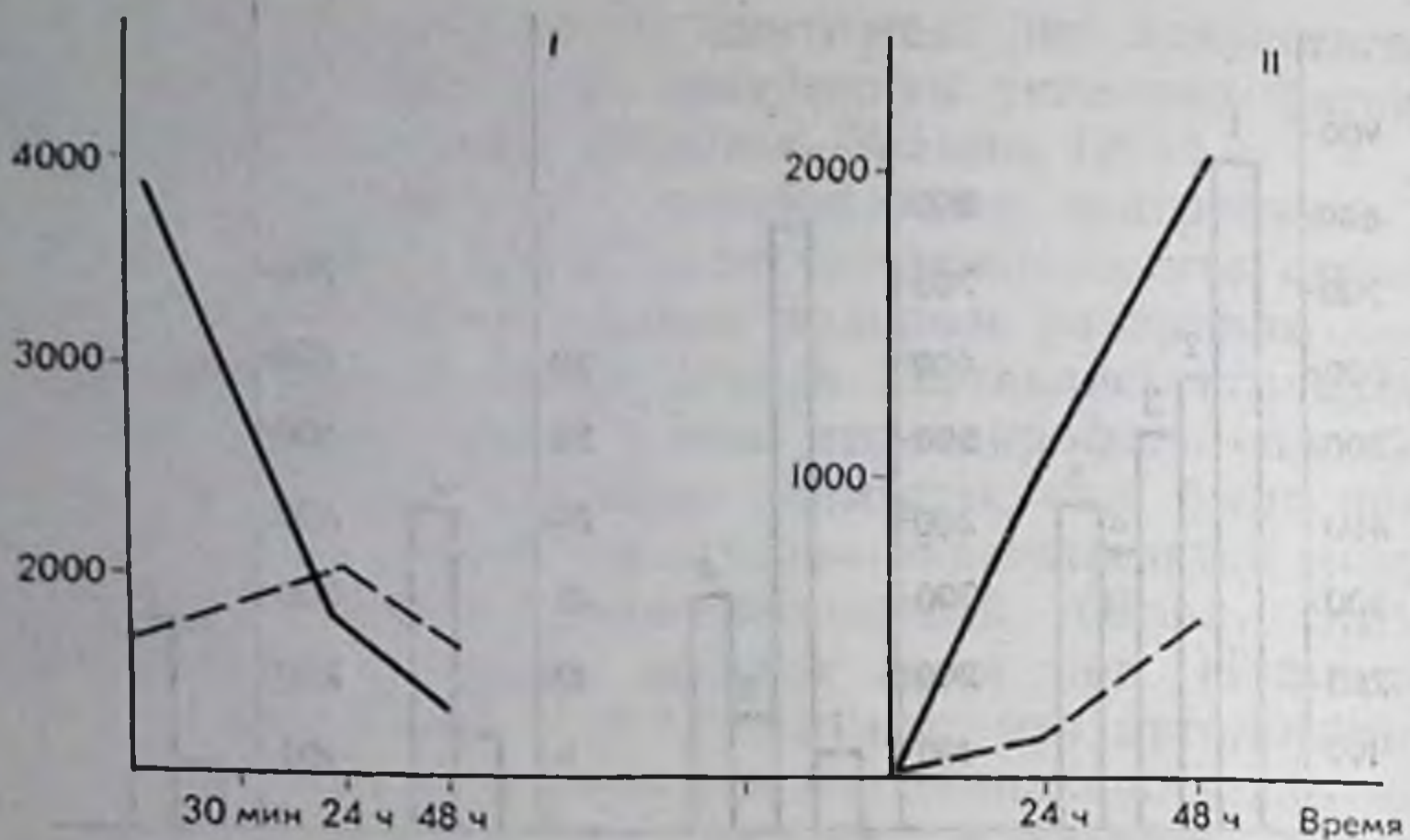


Рис. 7. Захват и переваривание ауто- и гетерологичных эритроцитов макрофагами мышей *in vitro*.

I — макрофаги; II — культуральная среда; сплошная линия — ^{51}Cr -эритроциты барана; прерывистая линия — ^{51}Cr -эритроциты мыши. На оси ординат — имп/мин/мг белка; на оси абсцисс — время.

В опытах *in vitro* КПЭ мышей линии СЗН помещали в культуральные пробирки по 2×10^7 и инкубировали 1 ч при 37°C для прикрепления макрофагов к стенкам пробирки, после чего отмывали их средой 199, содержащей 10% бычьей сыворотки, для удаления неприлипших клеток и инкубировали в этой среде. В часть пробирок прибавляли эритроциты мышей в количестве 3×10^6 , в другую часть пробирок — эритроциты барана в том же количестве. Радиоактивность введенного материала в обоих случаях была равна приблизительно 34 000 имп/мин на мыш. Макрофаги с эритроцитами инкубировали около 1 ч, после чего клетки пятикратно отмывали от нефагоцитированных эритроцитов средой 199 и продолжали культивирование в свежей среде в течение следующих 2 сут. Радиоактивность макрофагов и культуральной среды определяли через 1, 24 и 48 ч.

Из данных, приведенных на рис. 7, видно, что при инкубации ауто- и гетерологичных эритроцитов с культурой макрофагов мышей линии СЗН происходит захват тех и других, однако поглощение гетерологичных эритроцитов превышало захват аутологичных в 3—4 раза. При более интенсивном поглощении гетерологичных эритроцитов происходило и более быстрое выведение

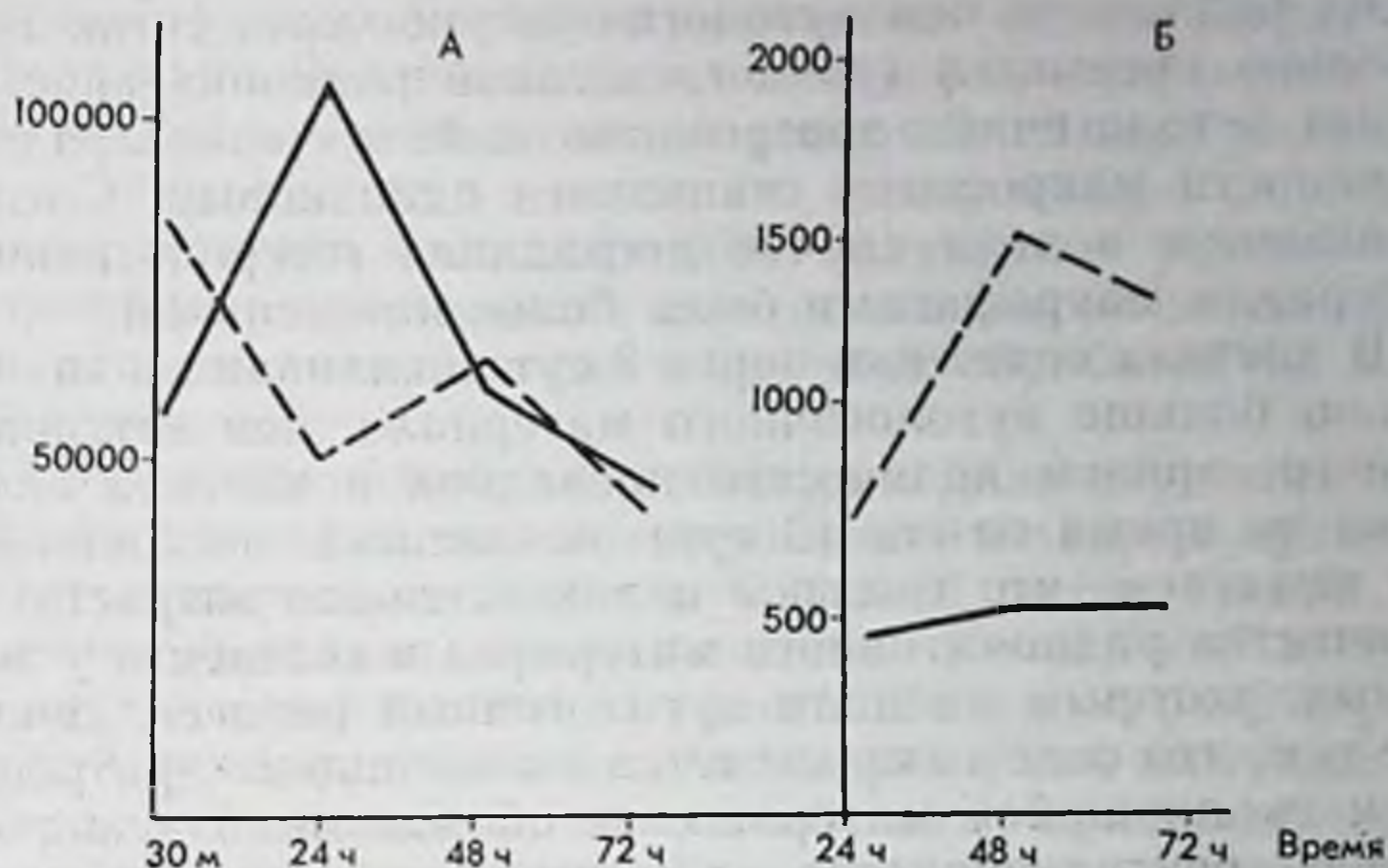


Рис. 8. Захват и переваривание ауто- и гетерологичных эритроцитов макрофагами *in vitro*.

А — макрофаги; Б — селезенка. Сплошная линия — ^{51}Cr -эритроциты барана; прерывистая линия — ^{51}Cr -эритроциты мыши. На оси ординат — имп/мин/мг белка; на оси абсцисс — время.

поглощенного материала, так как радиоактивность в макрофагах после фагоцитирования эритроцитов барана через 24 ч была ниже, чем в макрофагах, поглотивших эритроциты мышей в значительно меньшем количестве. В следующие сутки радиоактивность макрофагов, поглотивших эритроциты барана, продолжала снижаться, в то время как радиоактивность макрофагов, поглотивших эритроциты мышей, оставалась практически на прежнем уровне. Радиоактивность культуральной среды макрофагов, фагоцитировавших эритроциты барана, нарастала во времени, а радиоактивность среды, в которой культивировали макрофаги, поглотившие сингенные эритроциты, почти не изменялась, что также свидетельствует о более интенсивном разрушении гетерологичных эритроцитов. Аналогичные результаты были получены и при исследовании захвата и переваривания ауто- и гетерологичных эритроцитов макрофагами *in vivo*. В этих условиях опыта одной группе внутрибрюшинно вводили ^{51}Cr -эритроциты барана, другой — ^{51}Cr -эритроциты мыши; КПЭ получали через 30 мин, 24, 48 и 72 ч после введения меченых антигенов.

Из данных, приведенных на рис. 8, видно, что *in vivo* захват гетерологичных эритроцитов макрофагами проис-

ходил медленнее, чем аутологичных, но через сутки значительно превышал (по поглощенной радиоактивности) захват аутологичных эритроцитов: к 48 ч уровень радиоактивности макрофагов становился одинаковым. Следовательно, и в этом случае деградация гетерологичного материала макрофагами была более интенсивной.

В клетках селезенки через 2 сут скапливалось значительно больше аутологичного материала, чем гетерологичного, причем количество последних в клетках селезенки во время опыта (3 сут) оставалось постоянным. Мы полагаем, что быстрое и значительное возрастание количества радиоактивного материала в селезенке у животных, которым вводили аутологичный антиген, связано с тем, что селезенка является «кладбищем» эритроцитов и скопившийся материал, не обладающий чужеродностью, реутилизируется, а гетерологичный материал поступает в селезенку уже после первой встречи с перитонеальными макрофагами в относительно небольшом количестве и, возможно, хранится там в иммуногенной форме, вследствие чего при наблюдении в течение 3 сут не удастся проследить его крайне медленное выведение. В процессе других опытов мы смогли убедиться в том, что антиген в иммуногенной форме можно обнаружить в лизосомной фракции клеток селезенки через 3 нед после введения (И. Я. Учитель и др., 1969).

Проведенные исследования, как и цитированные ранее работы (Maguta, 1971; Curtis, 1973, и др.), свидетельствуют о том, что макрофаги распознают ауто- и гетерологичные эритроциты как *in vitro*, так и *in vivo*, на что указывают различия в величине и скорости захвата и деградации их макрофагами. Дискуссия по этому вопросу тем не менее продолжается, скорее всего, потому, что нет единого мнения о механизме распознавания чужеродности. А этот механизм, вероятно, имеет два уровня: первый — неспецифический, обусловленный фагоцитозом и перевариванием агента. При этом распознавание может вестись по отличиям как в физической природе (Schmidtke, Унапие, 1971), так и в химической его структуре с помощью адаптивных ферментов, что является более специфичным. Агенты, не полностью деградированные ферментами, могут вызывать отторжение трансплантатов или антителиобразование, направленное по существу на то, чтобы сделать этот агент более доступным фагоцитозу и выделению.

Специфическое иммунологическое распознавание является филогенетически более поздней и, естественно, более тонкой и чувствительной реакцией общего механизма, позволяющего клеткам распознавать чуждые агенты. Однако они, вероятно, начинают участвовать в процессе распознавания клеток или высокомолекулярных агентов только после первичной обработки их макрофагами.

Вряд ли целесообразно спорить о доле двух этих частей общего механизма распознавания в защите организма от чужеродных агентов. С нашей точки зрения, не лишено основания предположение о том, что именно в защите от инфекционных агентов большую роль играет первый путь распознавания, в то время как иммунологическое распознавание возникло как приспособление, обеспечивающее главным образом контроль за нормальными морфогенетическими клеточными взаимодействиями и антигенным постоянством тканей. Естественно, что оба механизма распознавания тесно взаимодействуют друг с другом, их функции взаимосвязаны и в определенной мере взаимозаменяемы, тем более что поглотительная функция макрофагов в значительной мере регулируется различными гуморальными факторами: цитофильными антителами, опсонинами, «нормальными» и даже специфическими антителами (Rabinovitch, 1969; Nelson, 1969). Помимо этого, скорость эндоцитоза может быть увеличена неспецифическими стимуляторами, например введением БЦЖ или других неспецифических стимуляторов иммуногенеза, на чем мы остановимся в главе V (М. Е. Бубашвили и др., 1975). Пиноцитоз также можно неспецифически стимулировать введением анионов, нуклеозидов и нуклеотидов (Cohn, Parks, 1967).

Обработка антигенов макрофагами

Как уже говорилось ранее (см. гл. II), после образования фагосомы с ней сливаются первичные лизосомы, выпуская в вакуоль весь набор своих гидролитических ферментов (Hirsch, Cohn, 1960). В результате этого процесса уже через 30 мин после начала фагоцитоза наблюдается дегрануляция фагоцитирующих клеток, степень которой связана непосредственно с количеством поглощенного материала.

Накопление в пищеварительных вакуолях инородных веществ, которые клетка не в состоянии переварить, приводит к их запустеванию и превращению в остаточные тельца. Поэтому накопление в лизосомах различных инертных веществ (тушь, красители или неионный детергент — тритон WR-1339) препятствует мобилизации лизосомных ферментов и блокирует в ряде случаев процесс переваривания позднее введенных агентов (Е. А. Кирьянова, А. В. Зеленин, 1968; Weissmann, Thomas, 1962; Wattiaux, Wattiaux-de Coninck, 1967). Внутрелизосомное переваривание определяется активностью и набором содержащихся в лизосомах ферментов и регулируется состоянием проницаемости их мембран.

В настоящее время можно считать доказанной сегрегацию самого различного чужеродного материала в лизосомах макрофагов, начиная от синтетических полипептидов и растворимых антигенов (сывороточные альбумины человека и быка) и кончая различными корпускулярными антигенами и фагом T2 (Weissmann, Dukor, 1970). Накопление в лизосомах торотраста позволило отделить их от других гранул, а также выделить и охарактеризовать вторичные лизосомы.

Использование меченых антигенов дало возможность установить, что при одновременном введении двух антигенов (сывороточный альбумин лошади и ферритин или два бактериофага) их можно обнаружить внутри одних и тех же фаголизосом (Rhodes et al., 1969).

Изучение субклеточного распределения меченого, денатурированного нагреванием бычьего сывороточного альбумина в гомогенатах КПЭ мышей показало, что большая часть антигена (90%) локализуется в так называемых обменных частицах, плотность которых составляет $1,19 \text{ г/см}^3$ (легкая фракция). Этот антиген разлагается в течение нескольких часов. Однако около 10% антигена связано с «гранулами хранения», обладающими очень высокой плотностью — $1,25 \text{ г/см}^3$ (тяжелая фракция).

Антиген, связанный с легкими фракциями, легко растворяется в детергентах и преципитируется специфическими антисыворотками. Антиген, локализующийся в тяжелых фракциях, резистентен к действию детергентов и, возможно, связан с мембранами. Легкие фракции, содержащие антиген, богаты лизосомными гидролазами. Природа «гранул хранения» менее ясна: возможно, это

вторичные лизосомы или остаточные тельца (Kolsch, Mitchison, 1968).

Вирусные частицы вначале абсорбируются на клеточной мембране, но уже через несколько минут оказываются включенными в фагосому, с которой сливаются первичные лизосомы. Бактериофаги, введенные в организм, обычно оказываются связанными с лизосомными фракциями клеток МФС, главным образом селезенки. Введение торотраста после бактериофага позволило установить, что бляшкообразующие единицы можно обнаружить не только в обычной популяции лизосом, но и во вторичных лизосомах, содержащих торотраст. Это указывает на способность вторичных лизосом участвовать в захвате нового материала (Weissmann, Dukor, 1970).

Корпускулярные антигены (микроорганизмы или клетки животного происхождения) как фагоцитированные клетками, так и проникающие в них непосредственно через мембрану уже в течение первых минут оказываются связанными с фаголизосомными фракциями клеток МФС. Основная масса антигена выводится из КПЭ (при внутрибрюшинном введении), как уже указывалось ранее, в течение первых суток. В лизосомной же фракции антиген может быть обнаружен в течение длительного времени (И. Я. Учитель и др., 1969; И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1969).

При сравнении иммуногенности связанного с различными субклеточными фракциями антигенного материала (ядра, митохондрии, микросомы, лизосомы и др.) после внутривенного введения мышам 2×10^8 эритроцитов барана Franzl (1962) было обнаружено, что наиболее активной в индукции антителообразования является лизосомная фракция селезенки. На основании анализа показателей общей иммуногенности донорских селезенок и распределения введенных мышам эритроцитов автор полагает, что в стимуляции антителообразования принимало участие не более 15% фагоцитов селезенки, содержащих менее чем 1,5% эритроцитов.

Кроме различных видов чужеродного материала, в лизосомах фагоцитирующих клеток происходит деградация и клеточных органелл собственных клеток организма. При анализе с помощью электронной микроскопии было показано, что введенные внутривенно митохондрии или микросомы тут же фагоцитируются звездчатыми эндотелиоцитами и уже через 30 мин могут быть

обнаружены в фаголизосомах. Процесс переваривания длится от 4 ч до 2 сут (Glaumann et al., 1975), что позволило сделать вывод о важной роли лизосомного аппарата в кругообороте клеточных органелл. Помимо этого, любое повреждение ткани, в том числе и воспалительный процесс, сопровождается деградацией вне- и внутриклеточных макромолекул, в которой также принимают участие лизосомные ферменты. Гиалуронат соединительной ткани, коллаген стенки артерии, эластин, плазминоген, фибрин, кинины, комплемент, базальные и эритроцитарные мембраны, РНК и ДНК — все эти компоненты расщепляются соответствующими ферментами лизосом: гиалуронат-лиазой, клостридиопептидазой А, панкреатопептидазой Е, катепсинами D и E и, наконец рибо-РНК- и ДНК-азами и т. д. Однако помимо ферментов, адаптированных к определенному субстрату, в лизосомах обнаружен ряд неферментных факторов, повышающих проницаемость капилляров, способствующих освобождению гистамина из лаброцитов (тучных клеток), обладающих бактерицидными или пирогенным действием (Weissmann, Dukor, 1970). Эти данные позволили Weissmann и Dukor рассмотреть роль лизосомного аппарата клеток МФС во всех четырех типах клеточных поражений, вызываемых иммунологическими механизмами.

В лизосомах нейтрофильных гранулоцитов обнаружена гетерогенная группа катионных белков, из которых некоторые способны вызывать воспаление, разрушая лаброциты (Seegers, Janoff, 1966), что наблюдается при остром аллергическом процессе; другие повышают проницаемость капилляров или вызывают воспалительную реакцию каким-то еще окончательно не установленным путем. После реакции антиген — антитело с фиксацией 1-го, 4-го, 2-го и 3-го компонентов комплемента и активацией и освобождением комплекса C5, C6, C7, вокруг комплекса происходят аккумуляция нейтрофилоцитов, кровяных пластинок (тромбоцитов) и фагоцитоз иммунного комплекса с последующей дегрануляцией нейтрофилоцитов и освобождением катепсинов D и E и катионных белков (Cochrane, 1968).

При обработке клеток цитотоксическими гетерологичными сыворотками происходит фиксация антител на мембранах клеток с последующим связыванием и активацией комплемента. Это приводит к освобождению хемотоксических факторов, и фагоцитирующие клетки

вступают в прямой контакт с мембранами обработанных клеток, причем продукты деградации мембран могут быть обнаружены в моче, что позволило установить участие катепсинов D и E, панкреатопептидазы E и других кислых гидролаз лизосом в их переваривании. Таков, по мнению ряда авторов, механизм возникновения поражений при токсических нефритах (Cochrane, 1968) или рассасывания хрящей при обработке их антисывороткой *in vitro* (Coombs, Fell, 1969).

Как уже упоминалось, основной функцией антител (кроме антитоксинов) является связывание антигена с тем, чтобы сделать его более доступным фагоцитозу и перевариванию. В этом случае степень вовлечения лизосомного аппарата фагоцитирующих клеток зависит от природы захваченного иммунного комплекса. При этом идет обычный процесс переваривания с образованием вторичных лизосом и освобождением кислых гидролаз. Одновременно вовлекаются и активизируются различные компоненты комплемента, что также может повлечь за собой разрушение биологических мембран (Lachmann et al., 1970). Наконец, в реакциях отторжения трансплантатов тоже участвует лизосомный аппарат Т-лимфоцитов и макрофагов, хотя функция его в этом феномене еще недостаточно ясна.

Как известно, трансформированные любым путем (ФГА, аллогенными клетками, антисыворотками против аллотипических детерминант и т. д.) лимфоциты выделяют в культуральную среду различные биологически активные вещества: вызывающие трансформацию и митозы лимфоцитов, местное воспаление, цитотоксическое действие, фактор переноса, фактор, ингибирующий миграцию макрофагов, и фактор, хемотоксичный для макрофагов, и т. д. Каждое из этих веществ выделяется только во время активации лизосомного аппарата клеток.

Все трансформированные лимфоциты, в противоположность покоящимся, обладают развитым лизосомным аппаратом. При этом он вовлекается в реакцию в начальных стадиях трансформации (Hirschhorn et al., 1965). Некоторые авторы даже предполагают, что активация лизосомных гидролаз под влиянием ФГА или специфического антигена приводит к снятию белкового репрессора (возможно, гистона) с ДНК, что и активизирует ее синтез (Hirschhorn et al., 1970). Возможно, что

толчком к активации лизосомного аппарата и трансформации клеток служат изменения поверхностной мембраны, которые митогены могут вызывать во всех клетках, а антигены — лишь в некоторых (Weissmann, 1969).

В поздних стадиях реакции отторжения большое участие принимают клетки МФС, при этом значительные изменения претерпевает не только лизосомный аппарат активно фагоцитирующих клеток, но и клеток МФС, находящихся вдали от очага. В клетках селезенки, например, наблюдается значительная активация лизосомных ферментов и повышение проницаемости их мембран, что может утяжелять клиническую картину при отторжении трансплантата. Не случайно, что протеолитическая активность клеток, инфильтрирующих аллотрансплантат, повышается по мере развития инфильтрата. Количество гистохимически активных макрофагов при аллогенной пересадке быстро увеличивается и примерно к 10-му дню после пересадки достигает 50% всех инфильтрирующих клеток (Poulfert et al., 1971). По-видимому, в условиях трансплантации макрофаги активно выполняют роль клеток-«мусорщиков», участвующих в деградации тканей, погибающих в результате иммунологического конфликта.

Не возникает сомнений в том, что в фаголизосомных вакуолях сегрегируются самые различные материалы, отличающиеся по величине, физико-химическим и антигенным свойствам. До какой степени они перевариваются, от чего зависит их выведение или длительное хранение в лизосомах и является ли переваривание лизосомными ферментами необходимой ступенью для проявления антигенности — пока недостаточно ясно.

Полисахариды довольно быстро разрушаются лизосомными гидролазами, но сахара с низкой относительной молекулярной массой (ди-, три- и тетрасахариды) ими не расщепляются и могут длительное время оставаться внутри лизосом, пока не станут доступными для растворимых гексоидов и β -фруктофуранозидазы, проникающих в клетку извне путем пиноцитоза (Cohn, Ehgenreich, 1969).

Исследуя полноту переваривания и судьбу конечных продуктов, Coffey и de Duve (1968) определили, что основной составной частью продуктов гидролиза белков являются дипептиды и свободные аминокислоты; в гидролизате можно обнаружить аммоний, аспарагин, глю-

тамин и др. Чувствительность белков к перевариванию лизосомами параллельна их чувствительности к тепловой денатурации. Относительная стабильность белковых систем *in vitro* тоже параллельна их устойчивости к перевариванию в лизосомах *in vivo*. Наиболее плохо перевариваются белки, устойчивые к кислотной денатурации.

Пептиды с короткой цепью бывают способны вызывать вакуолизацию фагоцитирующих клеток, тем не менее они чувствительны к гидролизам макрофагов. Все пептиды, устойчивые к гидролизам, содержат D-аминокислоты, которые не расщепляются катепсином D, действующим только на L-аминокислоты. Пептиды и аминокислоты, образующиеся в процессе переваривания белков, способны проникать сквозь лизосомную мембрану. Крупные пептиды задерживаются в лизосомах и подвергаются дальнейшему перевариванию. Следовательно, можно предположить, что антигенные детерминанты, состоящие, по Кэботу, не менее чем из 5 пептидов, должны задерживаться в лизосомах. Эти соображения привели к заключению, что антигенные детерминанты должны разрушаться внутри лизосом и не могут образовывать комплексы с РНК или другими элементами цитоплазм (Ehrenreich, Cohn, 1969). Однако установлено, что антигенный материал сохраняется в лизосомах длительное время и, несомненно, комплексируется с РНК. Остается предположить, что детерминанта, определяющая чужеродность, может крайне медленно расщепляться лизосомными ферментами или не расщепляться совсем. Тогда при повышении проницаемости лизосомной мембраны, возникающем под влиянием разнообразных причин, антигенные детерминанты могут попадать в цитоплазму клетки и комплексироваться как с РНК, так и с другими ее компонентами. Ранее Campbell и Garvey (1963) обратили внимание на то, что после, казалось бы, полного исчезновения меченого антигена из организма повторное введение немеченого антигена провоцирует появление новых порций меченого, вероятно, где-то хранящегося. Весьма возможно, что этот феномен вызывается повышением проницаемости лизосомной мембраны под влиянием введения антигена, что мы часто наблюдали в своих опытах (И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1969).

Несмотря на быстрое выведение основной массы введенного белка (сывороточный альбумин быка, гемоциа-

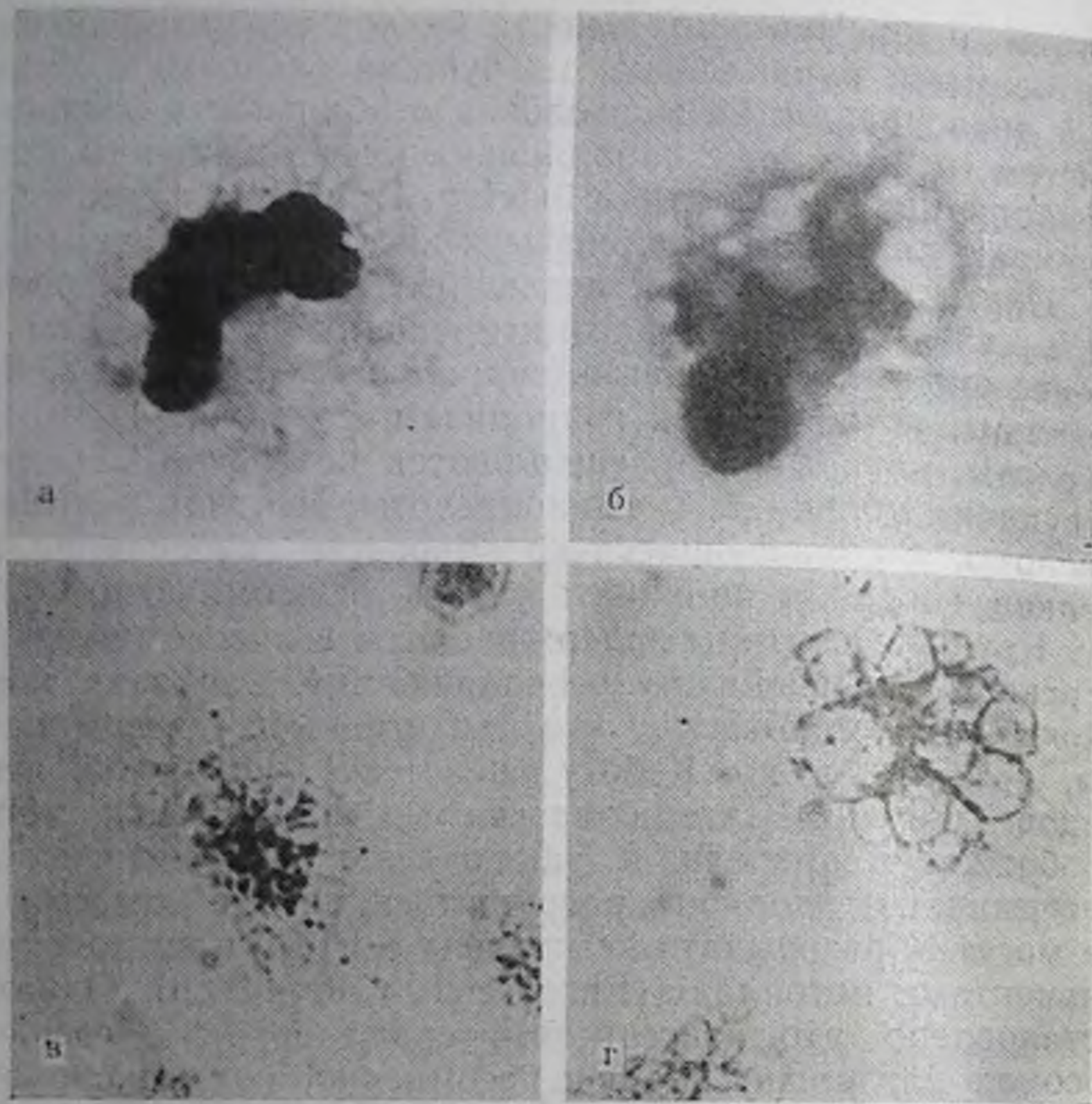


Рис. 9. Изменение активности лизосомных и окислительно-восстановительных ферментов в перитонеальных макрофагах во время активного фагоцитоза.

а — активность кислой фосфатазы в макрофагах контрольной мыши; б — ослабление активности кислой фосфатазы в макрофагах, поглотивших антиген. Окраска по Гомори. $\times 1800$; в — активность ацетилэстеразы в макрофагах контрольной мыши; г — ослабление активности ацетилэстеразы в макрофагах мыши, поглотивших антиген. Окраска по Пирсу. $\times 1800$.

нин, кроличий гемоглобин и др.), небольшое его количество (от 3 до 10%) оказывается связанным с лизосомной фракцией длительное время (И. Я. Учитель и др., 1969; Franzl, 1962; Kolsch, Mitchison, 1968). Все бактерии и продукты их жизнедеятельности, так же как и бактериофаги, перевариваются с помощью лизосомных ферментов, хотя и с различной скоростью.

Важно отметить, что фагоцитируемые микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, такие, как эндотоксин грамотрицательных бактерий, сами могут вызывать изменения в лизосомном аппарате клеток МФС.

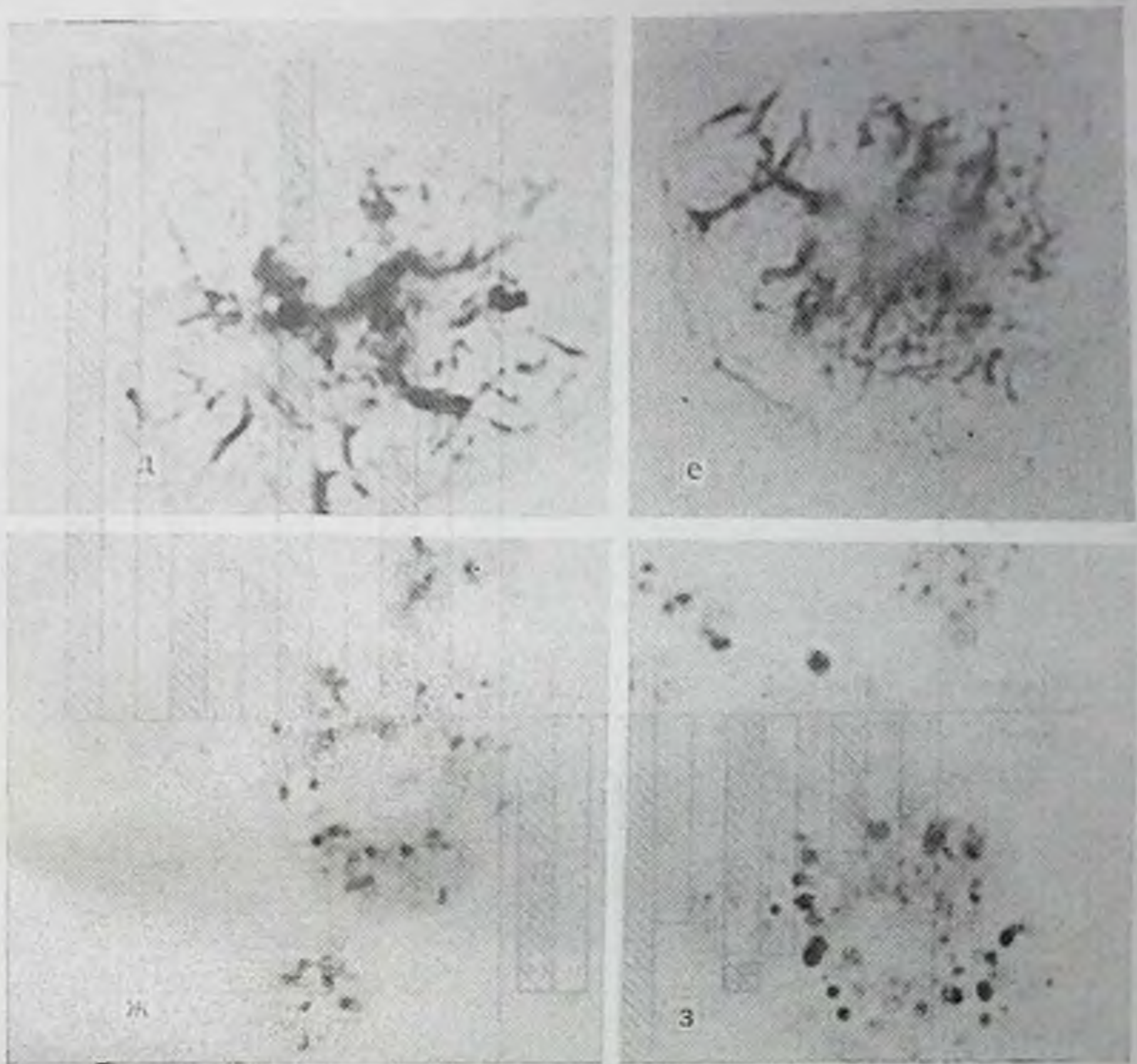


Рис. 9. (продолжение).

д — β -глюкуронидаза в макрофагах контрольной мыши; е — ослабление активности β -глюкуронидазы в макрофагах, поглотивших антиген. Окраска по Пирсу. $\times 1800$; ж — активность сукцинатдегидрогеназы в макрофагах контрольной мыши; з — повышение активности сукцинатдегидрогеназы в макрофагах мыши после введения антигена. Окраска по Нахласу. $\times 1800$.

В разное время различные авторы отмечали, что во время фагоцитоза различных агентов наблюдается уменьшение количества гранул, дающих положительную реакцию на кислую фосфатазу, т. е. лизосом (А. И. Брауде, 1968; Cohn, Benson, 1965), и прямая зависимость уровня окислительно-восстановительных ферментов от фагоцитарной активности клеток (Mesrobian et al., 1957).

Изучение активности лизосомных (катепсин D, кислая фосфатаза, β -глюкуронидаза и ДНК-аза) и окислительно-восстановительных (сукцинатдегидрогеназа, ли-

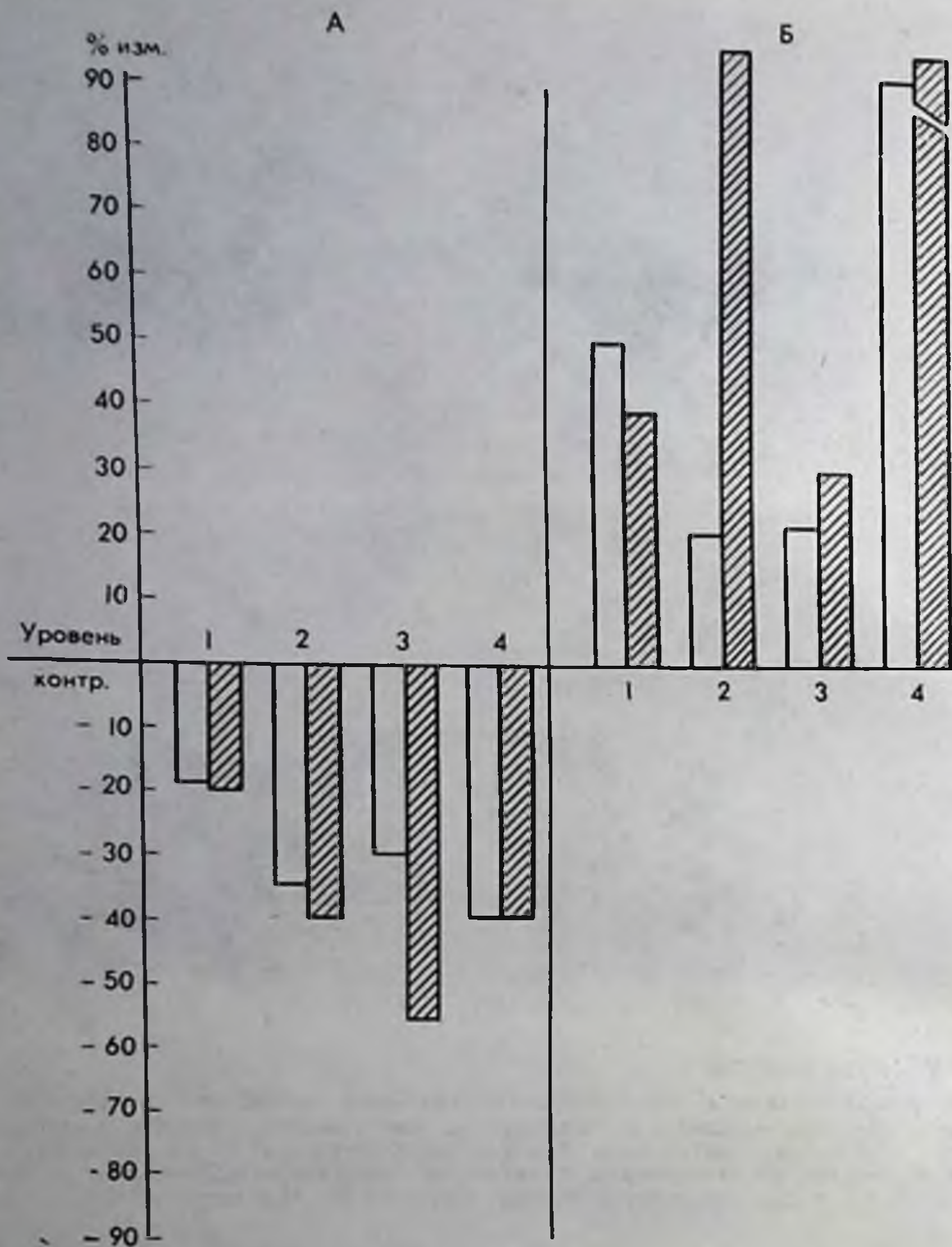


Рис. 10. Активность катепсина D в макрофагах и клетках селезенки через 30 мин после введения антигена.

А — макрофаги; Б — селезенка; 1 — эритроциты барана; 2 — тифозная вакцина; 3 — эндотоксин *S. typhi*; 4 — столбнячный анатоксин. Белые столбики — цитоплазма; заштрихованные столбики — лизосомы.

поамид-дегидрогеназа) ферментов макрофагов позволило нам установить ряд определенных закономерностей в изменении метаболизма макрофагов, подвергавшихся различным воздействиям (И. Я. Учитель и др., 1976).

Под влиянием любого из испытанных агентов, будь то корпускулярные (эритроциты барана, тифозная вакцина) или растворимые (столбнячный и стафилококко-

Таблица 1

Активность катепсина в макрофагах и клетках селезенки
через 30 мин после введения антигена

Антигены	Количество мышей	Содержание тирозина, мкг/мг белка					
		макрофаги			селезенка		
		I	II	I/II	I	II	I/II
Контроль	120	573	1651	0,34	58	356	0,1
Эритроциты барана	40	466 —19	1330 —20	0,35	87 +50	592 +39	0,1
Тифозная вакцина	25	373 —35	1014 —39	0,36	70 +20	725 +103	0,09
Эндотоксин <i>S. typhi</i>	80	403 —30	727 —56	0,55	71 +22	482 +30	0,1
Столбнячный анатоксин	45	333 —42	967 —42	0,34	119 +94	989 +177	0,1

Примечание. Верхняя строка—абсолютное количество тирозина; нижняя строка — в процентах к контролю. Величина p колебалась от 0,1 до 0,001.

вый анатоксины) антигены или живые возбудители (стафилококки), во время активного фагоцитоза происходит понижение активности лизосомных и повышение активности окислительно-восстановительных ферментных систем макрофагов (рис. 9).

На рис. 10 представлены данные об активности катепсина D в макрофагах и селезенке через 30 мин после внутрибрюшинного введения стимулированным мышам различным антигенам. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что клетки МФС, находящиеся в разных органах и тканях, объединены какими-то регулируемыми механизмами в единую систему.

Если в фагоцитирующих клетках во время активного фагоцитоза понижается активность лизосомных ферментов (И. Я. Учитель и др., 1976), по-видимому, за счет расхода некоторой их части на переваривание поглощенного субстрата, то в это же время в остальных клетках системы синтез ферментов активируется. Биохимическое определение активности катепсина D показало,

что, вероятнее всего, имеет место истинное понижение активности лизосомных ферментов в клетках во время активного фагоцитоза, поскольку происходит одновременное понижение их активности в лизосомах и остальной цитоплазме клеток.

На поздних стадиях фагоцитоза в клетках тоже наблюдается активация лизосомных ферментов, причем степень ее зависит от природы поглощенного агента.

Неперевариваемые агенты не вызывают увеличения синтеза ферментов, так же как и D-аминокислоты (Axline, Cohn, 1970). Увеличение активности ферментов после фагоцитоза происходит за счет нового их синтеза, поскольку этот процесс угнетается пуроминином.

В табл. 1 приведены данные об активности катепсина D в перитонеальных макрофагах и клетках селезенки через 30 мин после введения различных антигенов.

Роль макрофагов в антителообразовании

Роль макрофагов в антителообразовании и иммуногенезе далеко не ясна. Несмотря на то что к настоящему времени накопилось много сведений о функции этих клеток, об их значении в поддержании гомеостаза, наконец, даже об их участии в обеспечении естественной резистентности к инфекции, тем не менее роль макрофагов в специфическом иммунитете не понята до конца. Точно установленным можно считать только тот факт, что макрофаги фаго- или пиноцитируют антигены, переваривают их, способствуя выведению из организма большей их части, и длительное время хранят небольшие их количества, возможно, в виде детерминант, состоящих не менее чем из 5 пептидов.

Исследователи по-разному оценивали значение макрофагов для развития специфического иммунитета. Если в 20-х годах нашего столетия предполагали, что макрофаги не только захватывают антиген, но и сами синтезируют антитела, то не так давно ряд авторов высказывали мнение, что макрофаги играют чисто пассивную роль в антителообразовании, поставляя антиген лимфоцитам в наиболее доступной форме (Schmidtke, Unanue, 1972). На основании имеющихся данных стало очевидным, что в индукции антителообразования макрофаги играют весьма существенную роль. Об этом свидетельствуют 4 группы фактов:

1. Антиген, связанный с различными фракциями макрофагов, будь то их мембраны, лизосомы или РНК, значительно иммуногеннее нативного антигена.

2. Для индукции антителообразования необходимы все три типа клеток (макрофаги, Т- и В-лимфоциты).

3. Иммунологическая незрелость новорожденных, так же как иммунологическая неполноценность облученных животных могут быть восстановлены введением полноценных макрофагов.

4. Макрофаги выделяют ряд факторов, вызывающих трансформацию лимфоцитов и, возможно, регулирующих их функцию.

При исследовании роли макрофагов в иммунном ответе одним из первых спорных вопросов была степень переваривания антигена, необходимая для получения наилучшего ответа. Давно было установлено, что корпускулярные антигены, обязательно фагоцитируемые, проявляют большую иммуногенность, чем растворимые белки, да и в последнем случае лучшей иммуногенностью обладают высокомолекулярные белки по сравнению с низкомолекулярными. Эти наблюдения позволили предположить, что взаимодействие антигенов, находящихся в простой мономерной форме, непосредственно с лимфоцитами, минуя макрофаги, приводит к созданию в организме иммунологической толерантности, в то время как продукты переваривания антигенов макрофагами вызывают специфический иммунный ответ (Dresser, Mitchison, 1968). Эти представления полностью исключали макрофаги из круга клеточных взаимодействий, приводящих к созданию в организме толерантности, тем более что были получены данные о, казалось бы, нормальной функции макрофагов у толерантных животных как при изучении их способности захватывать и переваривать антигены, так и в опытах с переносом перитонеальных макрофагов от иммунных и толерантных к бычьему сывороточному альбумину доноров нормальным мышам (Dresser, Mitchison, 1968). В действительности же эти данные свидетельствуют только о том, что макрофаги содержат антиген. Вместе с тем хорошо известно, что иммуногенность антигенов зависит от степени их переваривания макрофагами, причем этот процесс является наглядным примером перехода количества в качество, а также закона о единстве и борьбе противоположностей.

Давно известно, что интенсивность антителообразования зависит от дозы антигена и пути его введения, но не всегда учитывают, что в значительной мере это объясняется условиями контакта антигена с клетками МФС.

В своих опытах мы неоднократно убеждались в этом. Например, при внутрибрюшинном введении мышам небольшой дозы эритроцитов барана (0,1 мл 1% взвеси) на 4-й день в селезенке каждой мыши в среднем появляется от 1500 до 2500 антителообразующих клеток (бляшки гемолиза). Однако при внутрибрюшинном введении той же дозы эритроцитов барана мышам, за 4 дня до этого стимулированным введением мясо-пептонного бульона и, следовательно, имеющим к моменту введения антигена большое количество макрофагов в брюшной полости, антителообразование у таких животных будет резко снижено. В среднем у них можно обнаружить не более 100 антителообразующих клеток на селезенку.

При блокировании захвата и переваривания (блок ретикулоэндотелиальной системы определенной степени) иммунного ответа не наблюдается. Однако чрезмерное переваривание также сопровождается угнетением иммуногенеза, так как полностью деградированный антиген выводится из организма естественным путем, минуя иммунные механизмы. Это выявилось в серии опытов, в которых сравнивали иммунный ответ при внутрибрюшинном введении антигена (непосредственный контакт с макрофагами) и внутривенном введении или при исследовании влияния на иммунный ответ блокады ретикулоэндотелиальной системы какими-нибудь неперевариваемыми частицами. Установлено, что мыши, получившие внутрибрюшинно и внутривенно антиген после блокады ретикулоэндотелиальной системы, содержали в селезенке в 10 раз больше антигена, чем нормальные мыши, которым внутрибрюшинно вводили то же количество антигена.

Все эти соотношения зависят от функции макрофагов, их возможности контактировать с лимфоцитами и физико-химической природы антигенов. Количества антигена, поступающего при внутрибрюшинном введении непосредственно в селезенку, вполне достаточны для хорошей продукции антител. Однако внутрибрюшинное введение слабофагоцитируемых антигенов повышает их иммуногенность по сравнению с внутривенным путем введения, так как способствует захвату антигена макро-

фагами, что происходит в значительно меньшей степени, если антиген поступает непосредственно в селезенку.

Упаице (1972) связывает все эти динамические взаимоотношения с условиями контакта макрофагов с лимфоцитами. Поэтому антигены, захваченные клетками МФС в местах, бедных лимфоидными элементами (брюшная полость, печень), разрушаются, а небольшая часть антигенного материала, оставшаяся связанной с макрофагами, не имеет возможности легко контактировать с иммунокомпетентными элементами. Вспомогательная роль макрофагов, по его мнению, выявляется в тканях, где макрофаги тесно связаны с лимфоидными элементами, т. е. в селезенке или лимфатических узлах.

Трудно себе представить, что клетки МФС, локализующиеся в разных участках тканей и органов, были бы настолько разобщены, что это могло сказываться на уровне иммунного ответа, проявляющегося через достаточно длинный отрезок времени. Помимо этого, роль макрофагов в индукции иммунного ответа вряд ли может быть сведена к пассивной подаче или передаче антигена лимфоцитам, о чем свидетельствует большое количество фактов.

Макрофаги, происходящие из разных источников (альвеолярные, перитонеальные клетки и звездчатые эндотелиоциты), обладают практически одинаковой способностью к захвату антигенов и выделению иммуногенной его фракции, что было показано в опытах с переносом макрофагов сингенным реципиентам. Использование переноса макрофагов, инкубированных *in vivo* или *in vitro* с антигеном, сингенным реципиентам позволило установить ряд интересных фактов. В этой системе были исследованы различные антигены: белки, гемоцианин, лизоцим, эритроциты барана и бактерии.

Использование в качестве маркера макрофагов радиоактивного золота ^{198}Au позволило установить, что после введения реципиентам макрофагов последние можно обнаружить в лимфатических узлах, печени и селезенке (Roseg, 1968). Аналогичные результаты были получены и с макрофагами, мечеными ^{51}Cr или ^{125}I -5-йод-2-дезоксисуридином. При этом было показано, что и макрофаги брюшной полости, наполняющие ее после различных видов стимуляции, мигрируют из нее в селезенку.

Опыты с переносом макрофагов показали, что присутствие макрофагов необходимо для индукции антителообразования. Одновременным введением макрофагов и антигена у облученных реципиентов можно восстановить антителообразование. Однако если доноров макрофагов предварительно обработать циклолейцином (иммунодепрессант, угнетающий функцию макрофагов), то увеличения выработки антител не происходит (Frisch, Wilson, 1969). Неспособность к антителообразованию новорожденных можно предотвратить введением им макрофагов от взрослых животных. Поскольку эффект от введения макрофагов более значителен при введении их однодневным мышам, а при введении антигена (эритроциты барана) — трехдневным, весьма убедительным кажется предположение, что иммунологическая незрелость новорожденных зависит не от отсутствия иммунокомпетентных клеток, а от недостатка клеток, распознающих и переваривающих антиген, т. е. макрофагов (Braun, Lasky, 1967; Argyris, 1968).

В развитии новорожденных мышей имеется определенный период, в течение которого иммунокомпетентные клетки приобретают способность отвечать на введение антигена после прибавления макрофагов взрослых животных. Вне этого периода перенос неэффективен. Менее эффективен перенос и большого количества макрофагов, что наводит на мысль о необходимости для начала антителообразования определенного соотношения между макрофагами и иммунокомпетентными клетками.

Весьма примечателен тот факт, что убитые макрофаги не оказывают восстанавливающего действия (Argyris, 1968; Mitchison, 1969), а антиген из макрофагов аллогенных или ксеногенных доноров вызывает более слабый ответ, чем антиген, связанный с живыми сингенными клетками (Unanue, Askonas, 1968; Mitchison, 1969). Вероятно, для индукции антителообразования важна не только определенная степень деградации антигена, но и его комплексообразование с какими-то субклеточными структурами.

Антиген, связанный макрофагами, способен вызывать не только первичный и вторичный ответы, но и гиперчувствительность замедленного типа (Unanue, Feldman, 1971).

Для дальнейшего развития иммунологических исследований крайне важным является наблюдение, свиде-

тельствующее о том, что антиген, связанный с макрофагами, иммуногеннее нативного. Эта разница выступает тем явственнее, чем хуже фагоцитируется обычно исследуемый антиген (Feldman, Palms, 1971). Например, альбумин, связанный с жизнеспособными макрофагами, в 1000 раз иммуногеннее нативного (Mitchison, 1969; Spitznagel, Allison, 1970).

Остается открытым вопрос о роли макрофагов в толерантности. Несмотря на неоднократно повторяемые попытки, не удалось обнаружить разницу в захвате или переваривании антигенов макрофагами от интактных и толерантных к нему животных.

Вместе с тем несомненно, что макрофаги, связанные с антигеном, взаимодействуют главным образом с Т-лимфоцитами, с которыми в основном связано состояние толерантности.

Макрофаги тимэктомизированных животных не отличаются *in vitro* от макрофагов интактных животных (Mosier et al., 1970), однако введение им макрофагов, инкубированных с гемоцианином *in vivo* усиливало ответ на этот антиген (Rodants, Askonas, 1972).

Наши экспериментальные данные (И. Я. Учитель, 1970) позволили нам высказать предположение о том, что если рассматривать толерантность как состояние организма, при котором он не отвечает антителообразованием на какие-то антигены, то макрофаги играют в нем очень важную роль. Постепенно становится очевидным, что под толерантностью разные авторы понимают многообразные феномены, часто отличающиеся по своему механизму.

Ранее мы уже высказывали предположение (И. Я. Учитель, 1970), нашедшее развитие в работе П. Н. Грабаря (1976), что толерантность организма к собственным тканям и белкам обусловлена адаптацией ферментных систем клеток МФС, обуславливающих полное расщепление до пептидов и аминокислот продуктов распада собственных тканей и клеток. Специфическое же распознавание появляется несколько позднее как в ходе филогенеза, так и в онтогенезе, ибо, вероятно, древняя функция распознавания «своего» и «чужого» развивалась в направлении синтеза специфических белков против невыведенного чужеродного агента так же, как в процессе эволюции осуществился переход от внутриклеточного пищеварения к внеклеточному.

Блокада клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы

Угнетение иммунного ответа на введение антигена можно вызвать перенасыщением фагоцитирующих клеток неперевариваемыми агентами — коллоидным углем или другими коллоидными суспензиями. Сила и продолжительность искусственно создаваемого блока зависят от дозы и характера блокирующего агента. Полной блокады МФС практически достигнуть не удастся.

Учитывая упоминавшееся выше динамическое соотношение между иммуногенностью агента и степенью его поглощения макрофагами, не следует удивляться тому, что некоторые авторы наблюдали увеличение продукции антител при блокаде МФС, в то время как другие видели при этом угнетение антителообразования. Разноречивость данных тоже косвенно свидетельствует о значении степени обработки антигена для индукции антителообразования.

Подробное изучение действия блокады ретикулоэндотелиальной системы на антителообразование было проведено Sabet и Friedman (1970). Они показали, что блокада МФС коллоидным углем (0,1 мл суспензии — 10 мг угля на мышь) за 1—2 сут до введения эритроцитов барана подавляет антителообразование как на клеточном, так и на гуморальном уровне. Угнетается также развитие иммунологической памяти и повторное введение эритроцитов барана вызывает иммунный ответ по первичному типу. Блокаду можно вызвать и добавлением угля к нормальным клеточным культурам селезенки, которые затем теряют способность давать первичный иммунный ответ. Однако результаты опытов с переносом облученным реципиентам клеток селезенки от нормальных и обработанных углем мышей показали, что число антигенчувствительных клеток при такой блокаде снижается умеренно (не более чем на 20%), число же антителообразующих клеток уменьшается на 20—50%. Максимум угнетения наблюдали при введении угля донорам за 1—3 дня до последующего переноса их клеток реципиентам (Friedman, Sabet, 1970). Более выраженную блокаду клеток МФС вызывают не только плохо перевариваемые агенты, но и разрушающие лизосомный аппарат макрофагов, например кремний или карагинан (высокомолекулярная полигалактоза). Последний уменьша-

ет толерогенную дозу левана с 1 мг до 300 мкг и подавляет антителообразование к эритроцитам барана и осла (Chaonot, Howard, 1976).

Более того, экспериментально показана возможность отмены гибридной и аллогенной резистентности к костному мозгу при угнетении функции макрофагов введением мышам-реципиентам кремнезема за 6 ч до трансплантации им костного мозга (Vriesendorp et al., 1976).

Приведенные наблюдения подтверждают высказанное ранее предположение о том, что высокая толерантность некоторых антигенов или синтетических полипептидов объясняется слабой деградацией их макрофагами, вызванной естественным или искусственным путем (Japeway, Sela, 1967).

У нас в лаборатории были проведены исследования с целью выяснения, не связана ли толерогенность больших доз эритроцитов барана блокадой ими клеток МФС (Ю. К. Фаворская и др., 1976).

На рис. 11 (А) приведены данные о захвате *in vivo* макрофагами мышей иммуногенной ($3,5 \times 10^8$) и толерогенной (1×10^{10}) доз ^{51}Cr -эритроцитов барана, из которых видно, что, несмотря на огромную разницу в количестве введенных эритроцитов, макрофаги в течение первых 30 мин захватывают практически одинаковое их количество. При инкубации монослоев таких макрофагов (получивших *in vivo* те же дозы, но не меченных эритроцитов барана) *in vitro* с ^{51}Cr -эритроцитами барана ($3,6 \times 10^8$) (рис. 11, Б) видно, что макрофаги, взятые от животных через 30 мин, захватывали *in vitro* в 4 раза меньше антигена, чем интактные макрофаги (рис. 11, Б, 3), независимо от того, какой дозой эритроцитов барана — иммуногенной (рис. 11, Б, 4) или толерогенной (рис. 11, Б, 5) — были подготовлены доноры макрофагов. Создается впечатление, что в определенный отрезок времени (в наших опытах 30 мин) популяция макрофагов способна захватить ограниченное количество эритроцитов барана.

На рис. 12 представлены данные о фагоцитирующей способности макрофагов к разным антигенам *in vitro* после предварительной обработки их *in vivo* разными антигенами, отличающимися как по размерам, так и по физико-химической природе. Наиболее резкое понижение фагоцитирующей способности макрофагов *in vitro* было выражено при предварительной обработке доноров

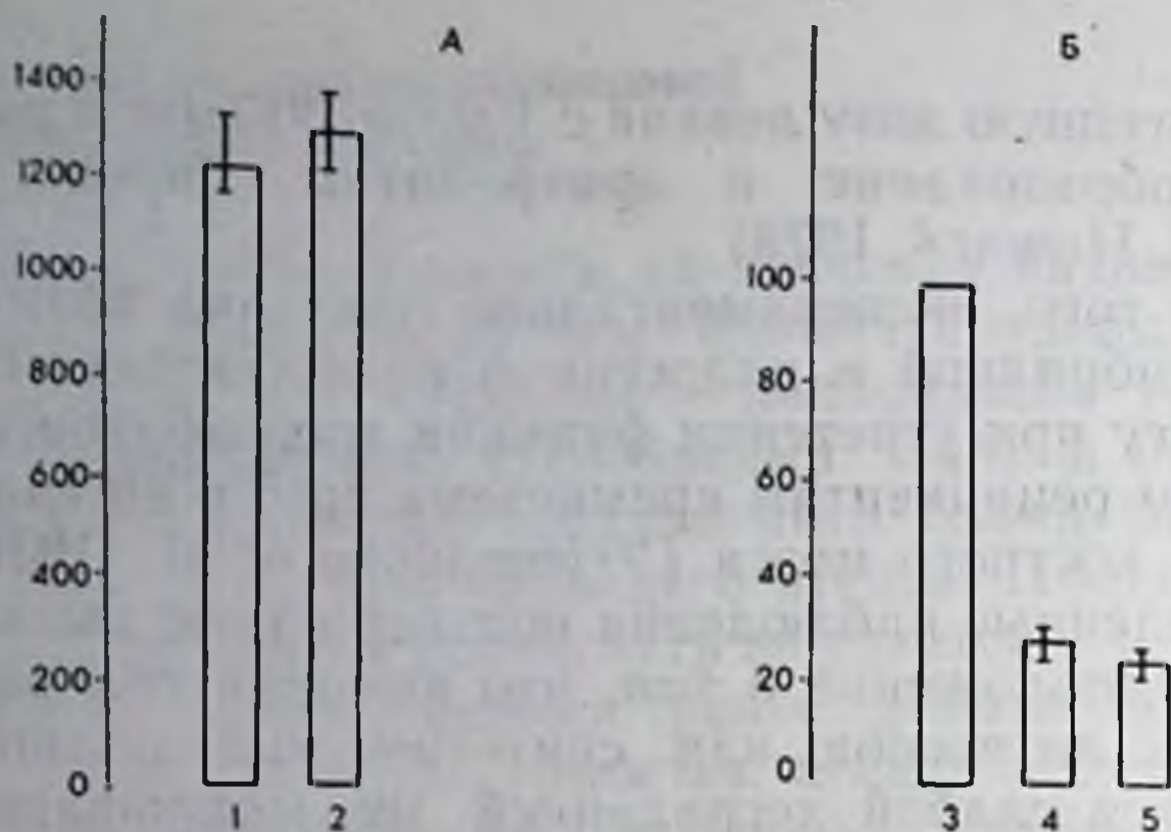


Рис. 11. Захват макрофагами ^{51}Cr -эритроцитов барана в зависимости от дозы антигена и состояния макрофагов.

А — захват разных доз ^{51}Cr -эритроцитов барана *in vivo*: 1 — 1×10^{10} эритроцитов; 2 — $3,5 \times 10^9$ эритроцитов; Б — захват эритроцитов барана *in vitro* макрофагами от животных, ранее подготовленных введением антигена: 3 — интактные макрофаги; 4 — макрофаги, получившие иммуногенную дозу *in vivo*; 5 — макрофаги, получившие толерогенную дозу *in vivo* (в процентах от контроля).

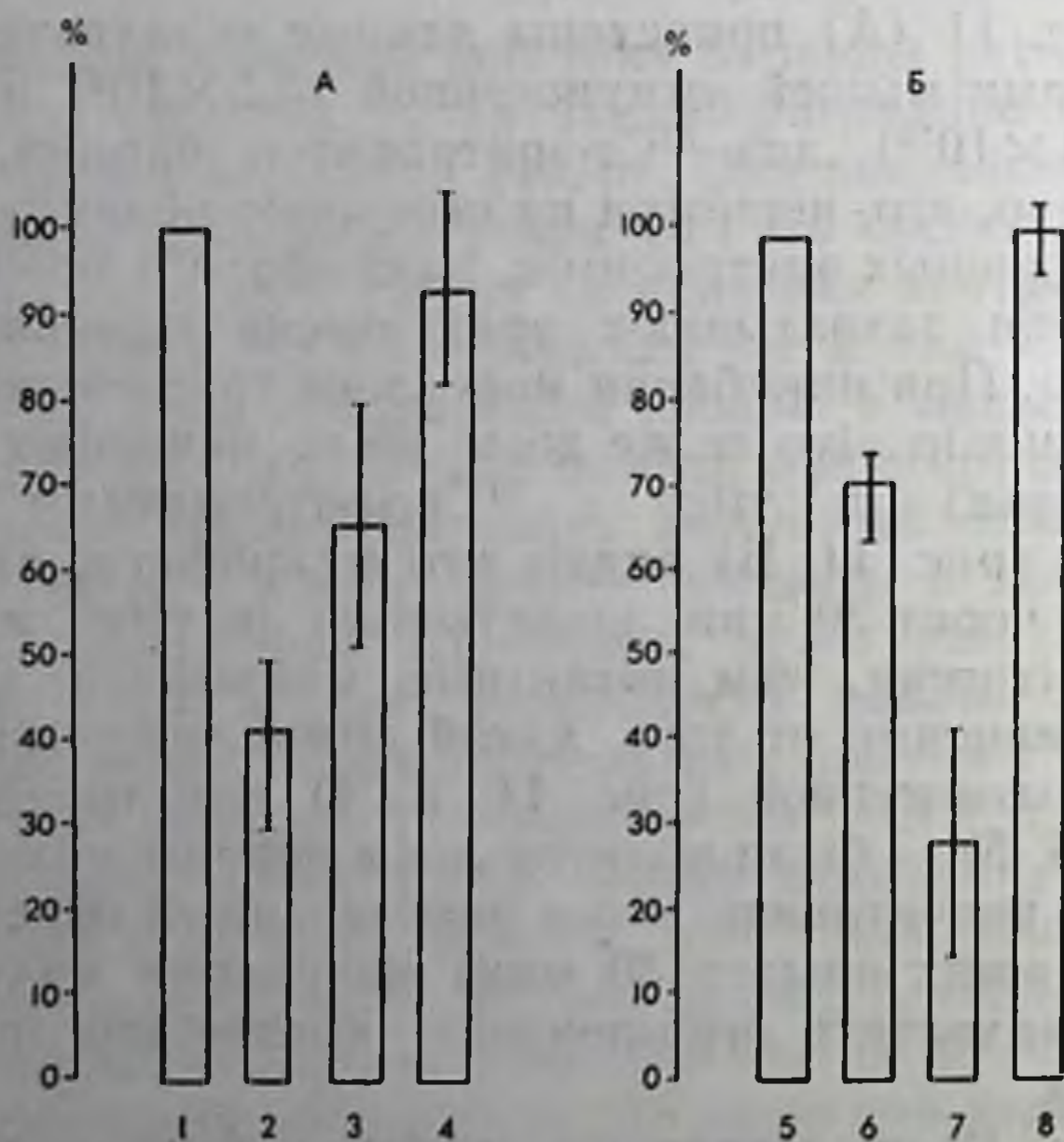


Рис. 12. Захват *in vitro* эритроцитов барана макрофагами мышей, подготовленных *in vivo* разными антигенами (в процентах от контроля).

А — захват ^{51}Cr -эритроцитов барана макрофагами мышей, получивших *in vivo*: 1 — интактные макрофаги, 2 — эритроциты барана, 3 — эритроциты крысы, 4 — тифозную вакцину; Б — захват ^{51}Cr -эритроцитов крысы макрофагами мышей, получивших *in vivo*: 5 — интактные макрофаги, 6 — эритроциты крысы, 7 — эритроциты барана, 8 — тифозную вакцину.

макрофагов эритроцитами барана (на 60%) или крысы (на 40%). Предварительное введение животным тифозной вакцины практически не отражалось на способности макрофагов к фагоцитозу *in vitro*.

Эти наблюдения вполне согласуются с представлением о том, что клетки МФС можно в определенной мере заблокировать не только неорганическими плохо перевариваемыми агентами, но и большими количествами эритроцитов барана. Однако в дальнейших опытах выяснилось, что эти закономерности справедливы только по отношению к клеткам организма и не распространяются на захват макрофагами микроорганизмов.

Из рис. 13 видно, что предварительное введение любого из исследованных антигенов *in vivo* резко (от 4 до 8 раз) увеличивало способность макрофагов фагоцитировать ¹⁴C-тифозную вакцину *in vitro*.

Несмотря на большую численность популяции макрофагов в брюшной полости мышей, стимулированных предварительным введением мясо-пептонного бульона, при внутрибрюшинном введении разных доз эритроцитов в определенный отрезок времени фагоцитируется лишь ограниченное их количество. Вероятно, существование механизмов, лимитирующих фагоцитоз эритроцитов, физиологически оправдано, поскольку их разрушение является функцией фагоцитов. Это подтверждается и тем, что у макрофагов, взятых через короткие сроки после введения мышам эритроцитов различных видов животных, резко угнетается способность к захвату этих эритроцитов *in vitro*, в то время как на способности к фагоцитозу микроорганизмов такая подготовка не сказывается. Наоборот, любой антиген, преинкубированный с макрофагами *in vivo* или *in vitro*, стимулирует способность макрофагов к захвату микроорганизмов *in vitro*. Это наводит на мысль о том, не лежит ли подобный механизм в основе феномена быстро возникающей резистентности. Явление быстрого появления резистентности проявляется обычно однотипной реакцией — чрезвычайно быстрой неспецифической перестройкой защитных механизмов организма под влиянием предварительно введенного агента. Такими агентами могут быть бактерии, вакцины и вирусы. Интересно, что предварительное введение ЛДГ-вируса, репликация которого поддерживается в макрофагах, в 10 раз увеличивает антителообразование в ответ на введение эритроцитов барана. Неспе-

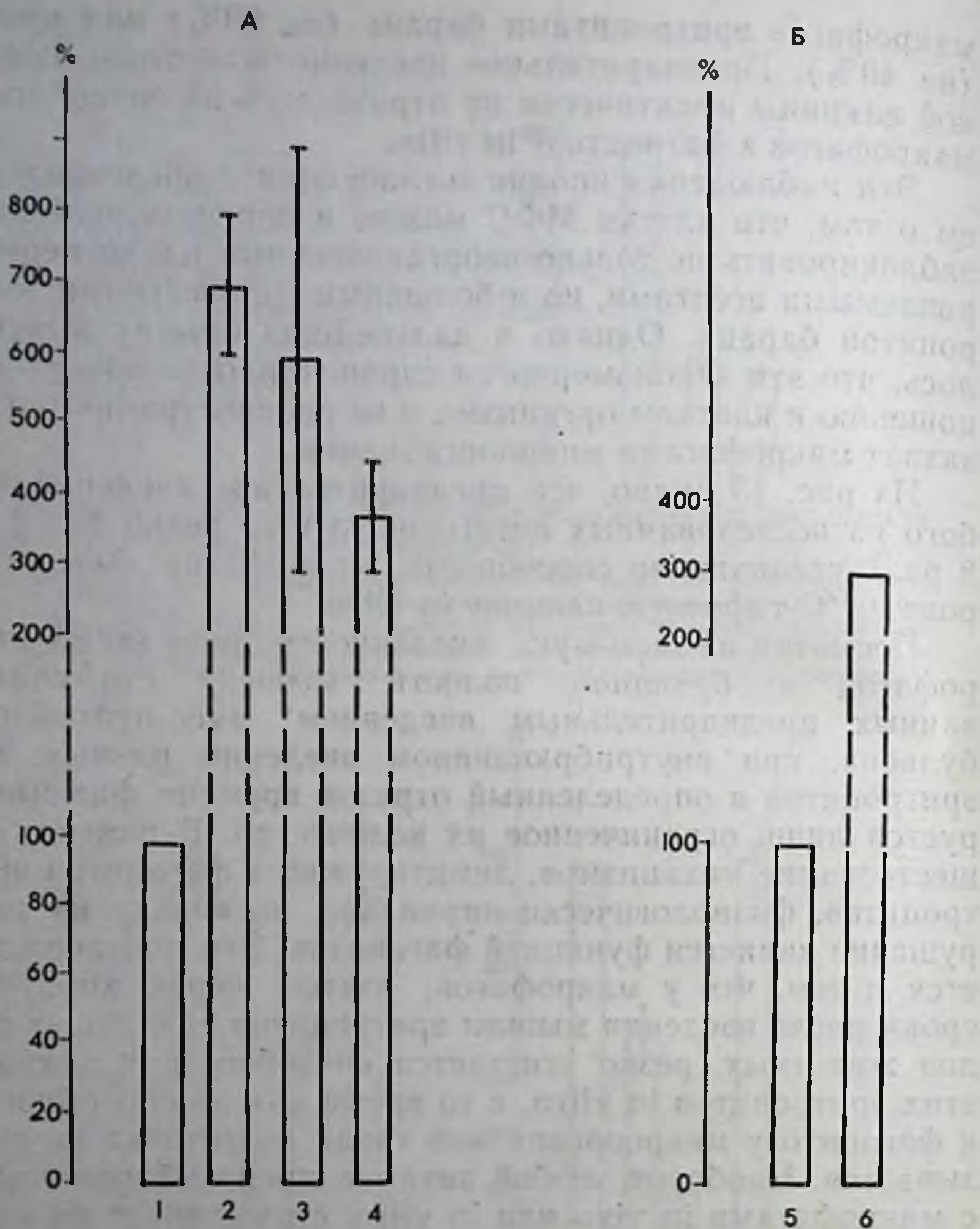


Рис. 13. Захват *in vitro* ^{14}C -тифозной вакцины макрофагами мышей, подготовленных введением разных антигенов (в процентах от контроля).

А — в опытах *in vivo*: 1 — интактные макрофаги, 2 — тифозная вакцина, 3 — эритроциты барана, 4 — эритроциты крысы; Б — в опытах *in vitro*: 5 — интактные макрофаги, 6 — эритроциты барана.

цифический характер этого феномена указывает на то, что в его основе лежит мобилизация физиологических факторов естественного иммунитета. Одним из них может быть стимуляция фагоцитарной функции МФС.

Связь антигена с различными субклеточными фракциями макрофагов и их значение в иммуногенезе

После относительно короткого (не более 1 сут) периода обильного содержания в макрофагах поглощенных антигенов основная масса их выводится и в клетках остается, как уже указывалось, не более 10% антигенного материала, связанного с различными субклеточными фракциями макрофагов и хранящегося в них длительное время.

Начиная с 60-х годов исследователи предпринимали неоднократные попытки установить биологическую роль комплексов антигенного материала с отдельными субклеточными фракциями. Этому стали уделять особое внимание после того, как было обнаружено, что связанный макрофагами антиген обладает повышенной иммуногенностью.

Комплексирование антигена с РНК макрофагов

Наибольшее внимание привлекла особенность РНК макрофагов комплексироваться с антигеном и способность этого комплекса индуцировать антителообразование при переносе его в интактный организм или к культуре интактных лимфоидных клеток (Б. Б. Фукс и др., 1964; В. А. Ляшенко и др., 1968; Fishman, 1961; Friedman, 1963; Askonas, Rhodes, 1965). Споры разгорелись главным образом вокруг вопроса, индуцирует ли синтез антител модифицированная антигеном РНК или, обладая адьювантными свойствами, она неспецифически стимулирует ответ на связанные с ней детерминанты антигена. Дискуссия вокруг этого вопроса продолжается по сей день, так как он имеет принципиальное значение до существа наших представлений о механизме антителообразования и роли в нем макрофагов.

Fishman (1961) сообщил, что помещенные в камеры лимфоциты, будучи имплантированными облученным крысам, отвечают специфической продукцией антител на введение экстракта из КПЭ от крыс, получивших за несколько минут до этого фаг Т2, причем это свойство экстракта устраняется обработкой его РНК-азой. Эта работа сразу же привлекла к себе внимание, хотя и подверглась критике как за полученную им низкую продукцию

антител и плохую воспроизводимость эксперимента, так и за трактовку опытов.

Выделяя РНК из КПЭ, инкубированных *in vitro* с фагом Т2, Friedman (1963) обнаружил небольшое количество фага Т2 в разных порциях экстракта, что сразу поставило под сомнение способность самой РНК индуцировать синтез специфических антител. Аналогичные данные были получены и в опытах *in vivo* при попытке выделить чистую РНК из макрофагов мышей, которым был введен ^{125}I -гемоцианин. Около 0,01% меченого антигена оказалось связанным с РНК (Askonas, Rhodes, 1965). Впоследствии почти все разделили мнение о том, что специфической иммуногенностью обладает именно комплекс РНК с антигеном. В настоящее время свойства этого комплекса были исследованы самым тщательным образом и, как это иногда бывает, сформулированы две совершенно противоположные точки зрения.

Roelants (1971), исследуя способность различных веществ (натуральные и синтетические полипептиды, белки, полисахариды, аминокислоты и стероидные гормоны) связываться с РНК макрофагов, не нашел корреляции между связывающей способностью РНК и иммуногенностью. С РНК, по его данным, связываются все отрицательно заряженные вещества, так что эти комплексы физиологически инертны и комплексообразование антигена с РНК не является специфичным процессом и не связано с иммуногенностью. Последний вывод он аргументирует еще и тем, что синтетический полипептид одинаково связывается с РНК перитонеальных клеток от мышей линии С57ВL, хорошо вырабатывающих антитела к нему, и от мышей СВА — плохих продуцентов антител.

Существенный аргумент против специфической роли комплексообразования антигена с РНК макрофагов заключается, по мнению вышеназванных авторов, в том, что связывание его с РНК является ферментонезависимым процессом, т. е. ковалентные связи между антигенами и РНК отсутствуют. Связывание не нарушается при удалении из гомогенатов КПЭ ядер и митохондрий или при обработке гомогената актиномицином D. Следовательно, процесс не требует активного синтеза РНК. Поэтому можно заключить, что процесс связывания пассивен и роль макрофагов сводится к созданию более удобных путей транспортировки антигена к лимфоцитам. Сравнивая методы выделения комплексов антиген — РНК (АГ—

РНК), они заключили, что образование этих комплексов не специфично для макрофагов и вообще может быть артефактом, образующимся в процессе их выделения.

Повышенную антигенность комплексов АГ—РНК, которую отрицать невозможно, объясняют адьювантным действием полинуклеотидов и повышением взаимодействия между тимусзависимыми и костномозговыми клетками.

Против таких крайних представлений имеется много данных разных авторов. Во-первых, нет никаких оснований считать, что методы выделения комплексов АГ—РНК макрофагов недостаточно точны (В. А. Ляшенко, 1973; Bishop, 1971). Во-вторых, исследования с помощью импульсной метки показали, что синтез 6—10 S РНК в КПЭ во время фагоцитоза ими эритроцитов завершается вдвое быстрее, чем у интактных макрофагов. Эта РНК остается стабильной в течение 2½ ч после метки и активно индуцирует антитела *in vitro*, причем выработка антител и синтез РНК угнетаются актиномицином D, что позволило некоторым авторам (Б. Б. Фукс и др., 1963; Bishop et al., 1967) высказать предположения об образовании после введения антигена специфической РНК, индуцирующей синтез специфических антител.

Группа Gottlieb (1971) провела серию исследований, дающих возможность оценить данные, отрицающие специфическую роль комплексов антигена с РНК макрофагов. С этой целью была разработана модификация метода электрофореза в полиакриламидном геле, позволяющая избирательно отделить антиген, связанный с рибонуклеопротеидом (РНП) макрофагов, от антигенов, загрязняющих препараты РНК. Рибонуклеопротеид макрофагов содержит 30% белка и в его состав входит не более 5% всей клеточной РНК. Относительная молекулярная масса РНП, который можно выделить только из макрофагов, составляет 12 000. С антигенами связывается именно этот компонент.

При изучении захвата синтетических L- и D-полимеров макрофагами при электрофорезе в полиакриламидном геле было обнаружено, что с РНП связано значительно больше L-полимеров. Следовательно, комплексование антигена с РНП не является просто ионным типом взаимодействия, при котором не различались бы оптические формы полимеров. Кроме того, в этих опытах присоединение антигена к РНП происходило только в целых

жизнеспособных клетках, а не в их гомогенатах, что также указывает на активный характер этого процесса. В опытах по изучению образования иммуногенного комплекса АГ—РНК в бесклеточной системе было также показано, что активные комплексы можно получить только из макрофагов (Fishman, Adler, 1973).

Несмотря на существующие разногласия, большинство авторов придерживаются мнения, что в клетках МФС иммунизированного животного можно обнаружить комплекс антигена с РНК клеток, обладающий высокой иммуногенностью, специфичной для данного антигена. Феномен этот универсален, т. е. с РНК макрофагов комплексуются антигены различной природы (фаги, эритроциты, белки и полисахариды). Вместе с тем ряд свойств «иммунной» РНК наводит на мысль о том, что роль РНК в этом комплексе не может быть сведена просто к неспецифической стимуляции ею образования антитела к данному антигену. «Иммунная» РНК обладает способностью вызывать антителообразование в условиях, в которых один антиген его не индуцирует — у новорожденных животных или у ареактивной к данному антигену линии мышей (В. Г. Пинчук и др., 1968). Активность иммунной РНК возрастает непропорционально даже при небольшом увеличении дозы антигена и вызывает более ускоренный синтез антител (В. А. Ляшенко, 1973).

Нельзя оставить без внимания работы, даже если они не всегда воспроизводимы, содержащие данные о том, что влияние «иммунной» РНК не всегда может быть объяснено прямым антигенным действием. Так, было найдено, что при смешивании РНК, выделенной из клеток перитонеального экссудата кроликов определенного аллотипа после их иммунизации фагом, с нормальными лимфоцитами кроликов другого аллотипа часть молекул антител имеет аллотипическую характеристику донорских клеток (Adler et al., 1968). Аналогичные опыты с экстрактами из лимфоцитов также приводят к мысли о том, что «иммунная» РНК может выполнять роль матричной РНК (Bell, Gray, 1969, 1970). Косвенно о специфической роли РНК в ее комплексе с антигеном свидетельствует также то, что при индукции антителогенеза с помощью иммунных макрофагов в аллогенном организме наблюдается подавление накопления антителообразующих клеток при условии несовместимости донора макрофагов и реципиента по системе H-2, хотя при их

совместимости по системе H-2 иммунный ответ все же развивается по типу реципиента (Т. В. Анфалова, 1975). Возможно, что в последнем случае из-за отсутствия достаточно тонкой маркировки авторы не уловили небольшой части молекул антител донорского типа, как это удалось сделать Adler и соавт. (1968).

Все эти, хотя и скудные, факты, свидетельствующие о возможности специфической индукции антителообразования модифицированной антигеном РНК макрофагов, заслуживают пристального внимания. Вряд ли можно сомневаться в том, что синтез рибосомами лимфоидных клеток специфических молекул антител происходит на матрице специфической РНК, однако лимфоцитарное происхождение этой РНК нельзя считать доказанным.

Несмотря на существование видового иммунитета к определенным инфекционным или паразитарным заболеваниям, приобретенный специфический иммунитет никогда не бывает наследственным. Это несколько затрудняет безоговорочное принятие клональной теории с ее постулатом детерминированности всех возможных специфических белков. Можно предположить, что источником информации для синтеза лимфоцитами специфического белка все же может служить РНК макрофагов, видоизмененная в какой-то области антигенными детерминантами, которые присоединяются к ней после обработки антигена лизосомными ферментами. В этом случае становится объяснимым появление у реципиентов антител с аллотипом как реципиента, так и донора. При бласттрансформации лимфоцитов, зависящей также в значительной степени от сигналов с макрофагов, эта комбинированная молекула РНК макрофагов, вступая в определенные взаимодействия с мРНК для гамма-глобулинов лимфоцитов, индуцирует синтез нового специфического белка.

Вряд ли следует закрывать глаза на достаточно многочисленные факты, свидетельствующие о роли макрофагов именно в индукции антителогенеза. Во-первых, макрофаги играют значительно большую роль в развитии первичного, а не вторичного ответа. Во-вторых, немало работ на различных моделях переноса свидетельствует о том, что макрофаги передают антигенную информацию иммунологически компетентным клеткам (Yokomizo et al., 1972), хотя механизм этой передачи может быть

объяснен по-разному. В-третьих, показано не только образование цитоплазматических мостиков между макрофагами и лимфоцитами (Ю. Н. Фаворская и др., 1975), но их необходимость для индукции антителообразования, так как облученные макрофаги, теряющие способность образовывать мостики с лимфоцитами, перестают индуцировать антителогенез (Gallily, Ben-Ishay, 1974). Yokomizo и Nozima (1972) наблюдали в фазово-контрастном микроскопе с помощью метода радиоавтографии переход материала из клетки в клетку по цитоплазматическим мостикам. Эти факты требуют строгого анализа.

Роль комплекса РНК макрофагов с антигеном еще далеко не расшифрована и вряд ли может быть объяснена только неспецифической стимуляцией антигенного действия, тем более что можно считать установленным тот факт, что антиген, соединенный с РНК, значительно отличается от нативного антигена не только по степени иммуногенности.

Mitchison (1969), хотя и сомневался в активности комплекса АГ—РНК и тем более в существовании специфической мРНК, тем не менее считает, что нельзя сводить роль макрофагов только к хранению иммуногенной части антигена, поскольку антиген, связанный с макрофагами, качественно отличен от нативного. Этим антигеном, например, можно иммунизировать мышей в фазе восстановления от иммунологического паралича к бычьему сывороточному альбумину, что нельзя достигнуть введением мышам нативного сывороточного альбумина быка. Качественные различия между нативным и связанным макрофагом антигена свидетельствуют в пользу предположения о возникновении каких-либо специальных особенностей, возможно облегчающих контакт антигена с лимфоцитами.

Антиген, связанный с мембранами макрофагов

Факт высокой иммуногенности антигена, связанного с наружной цитоплазматической мембраной макрофагов, был установлен во многих работах и не вызывает сомнений.

Электронно-микроскопические исследования показали, что большинство макрофагов содержит небольшое количество антигена как на наружной мембране, так и в лизосомах. Антиген, связанный с мембранами, спо-

собен реагировать с антителами или их фрагментами, после чего его иммуногенность резко угнетается. Антиген может быть удален с поверхности макрофагов обработкой их трипсином. Связанный с мембраной макрофагов антиген вызывает антителообразование и активацию синтеза ДНК в культурах лимфоцитов *in vitro*. Количество связывающегося с мембранами антигена зависит от типа антигена и функциональной активности макрофагов. На наружной цитоплазматической мембране стимулированных макрофагов обнаружили в 5—10 раз больше антигена, чем у нестимулированных макрофагов (Lane, Unanue, 1972). Спорным остается вопрос о том, нативные ли это молекулы антигена, оставшиеся на мембране после первого контакта клетки с антигеном и не пино- или фагоцитированные ею, или же это молекулы, попавшие на мембрану после фагоцитоза и катаболизма нативного антигена.

При культивировании макрофагов, поглотивших *in vivo* ^{125}I -гемоцианин, большая часть радиоактивного белка выходит в культуральную среду, однако небольшая часть радиоактивности остается связанной с клетками и через 2 сут культивирования.

Ряд авторов полагают, что на наружной цитоплазматической мембране макрофагов антиген фиксируется в нативном состоянии, в котором он и сохраняется в течение длительного времени, не подвергаясь катаболизму (Unanue, Askonas, 1968; Unanue, Cerottini, 1970). Главным аргументом в пользу такого предположения Unanue (1972) считает то, что отделенный от мембран антиген имеет параметры, сравнимые с молекулой нативного антигена, и что после его удаления с поверхности макрофагов трипсином новых порций антигена на поверхности клеток как будто не появляется. Эти аргументы нуждаются в серьезной проверке, так как другими исследователями было показано, что при лабильзации лизосомных мембран клеток МФС и просто при гибели клеток в кровотоке выходят новые порции антигенного материала (Campbell, Garvey, 1963, и др.), которые могут фагоцитироваться и комплексоваться с РНК. Есть все основания полагать, что с наружной мембраной эти вновь поступающие антигенные компоненты могут связываться. Особенно трудно согласиться с трактовкой вопроса о связывании мембраной макрофагов корпускулярных антигенов, продукты деградации которых, вероятно, дол-

жны поступать на мембрану из фаголизосом или вторичных лизосом макрофагов, поскольку можно считать доказанным необходимость деградации их клетками МФС до индукции ими антителообразования. Этого факта не отрицают Cguchaud и Unanue (1967).

Чтобы доказать связь с мембранами макрофагов нативных молекул антигена, следует допустить, что поверхностная мембрана макрофагов имеет участки с низкой способностью к пиноцитозу, что пока не установлено.

Более поздними исследованиями было показано, что аккумуляция по крайней мере некоторых антигенных молекул макрофагами происходит в две стадии: вначале идет связывание растворимого антигена с мембранами, а затем секвестрация этого антигена. Этот процесс зависит от уровня обменных процессов в клетке. При любой концентрации антигена связывание его с макрофагами происходит более интенсивно при 37°C, чем при 4°C. При этом иммуногенность, приобретенная при 4°C, может быть полностью устранена путем обработки макрофагов трипсином, произведенной сразу после инкубации. Антиген, связанный макрофагами при 37°C, удалить трипсином не удастся. Если макрофаги, инкубированные с антигеном при 4°C, дополнительно прогреть при 37°C, то последующая обработка трипсином оказывается неэффективной и устранить с ее помощью иммуногенность не удастся. Кинетические исследования показали, что устойчивые к трипсину иммуногенные свойства этих макрофагов непрерывно возрастают по мере удлинения времени инкубации (в пределах часа). Увеличение периода инкубации до 2 ч приводит к тому, что устойчивая к трипсину иммуногенность, связанная с макрофагами, возрастает до 80%, в то время как количество антигена, связанного мембранами макрофагов, уменьшается с 37 до 7%. Такое увеличение иммуногенности внутри макрофага зависит от уровня обменных процессов и может быть заторможено ингибиторами окислительных и гликолитических процессов (азидом натрия и 2-дезоксиглюкозой), однако оно не угнетается цитохалазином В, являющимся ингибитором классического пиноцитоза. Возможно, что секвестрация имеет место и в крипах самой мембраны. Поскольку связанную с макрофагами иммуногенность в этой системе определяли по пролиферативному ответу индикаторных Т-лимфоцитов (включение ³H-тимидина в ДНК лимфоцитов), то данные о происходящей секве-

страции иммуногенности внутри клетки свидетельствуют о том, что антиген, связанный с макрофагами и вызывающий *in vitro* специфическую индукцию пролиферации Т-клеток, не связан с мембранами (Waldron et al., 1974). Это противоречит приведенному ранее мнению Upanie и Cerattini (1970) о длительном существовании на наружной цитоплазматической мембране макрофагов, связанных с нею нативных молекул антигена.

Антиген, связанный с фаголизосомной фракцией макрофагов

В связи с тем что лизосомный аппарат макрофагов имеет большое значение в переваривании и хранении антигенного материала, естественно было попытаться подробно изучить антиген, локализованный в лизосомах. Начало этим исследованиям было положено в уже упомянувшейся работе Franzl (1962), который сравнивал иммуногенность связанного с различными субклеточными фракциями антигена (эритроциты барана) в клетках печени и селезенки мышей. Им были исследованы ядра, митохондрии, лизосомы, микросомы и супернатанты, оставшиеся после выделения этих субклеточных фракций. Реальная иммуногенность была им обнаружена только в лизосомной фракции клеток селезенки, причем срок исследования был очень коротким — всего 3 дня после введения антигена. Позже была выделена фракция больших гранул (лизосом) из печеночных макрофагов, поглотивших бактериофаг, и обнаружена ее высокая иммуногенность (Uhr, Weissmann, 1965, 1968). Фракция фаголизосом относится к легким, обладает высокой скоростью обмена и с ней, по крайней мере в первые часы после фагоцитоза, связано не менее 90% поглощенного макрофагами антигена (Kolisch, Mitchison, 1968; Walker, 1974). Тяжелая фракция гранул с большой оптической плотностью и с малой скоростью обмена содержит около 10% антигена и, вероятно, может быть ассоциирована со вторичными лизосомами, хотя она и содержит примесь в виде небольшого количества клеточных мембран.

На протяжении ряда лет мы проводили сравнительное изучение иммуногенности фракции лизосом, мембран и РНК макрофагов после введения животным (кролики и мыши) различных антигенов, главным образом эритроцитов барана. Часть работы была посвящена изучению

иммуногенности лизосом и РНК фракций селезенки и печени кроликов в течение 3 нед после однократного введения им эритроцитов барана.

Из клеток селезенки и печени кроликов в течение 3 нед (на 1-й, 2-й, 3-й, 8-й и 21-й день) после введения им 3×10^8 эритроцитов барана выделяли цитоплазматическую РНК, лизосомную и микросомальные фракции, которые вводили как контрольным, так и предварительно подготовленным реципиентам. Ответ реципиентов оценивали по накоплению в их крови гемагглютининов и гемолизинов и по количеству антителообразующих клеток в селезенке. Фракции микросом вводили реципиентам для контроля, как и лизосомные фракции, выделенные из селезенки контрольных или иммунизированных другим антигеном животным. Фракции лизосом и РНК фракции, выделенные из селезенки доноров на 1-й, 2-й, 3-й и 21-й день после введения им эритроцитов барана, вводили внутрибрюшинно контрольным кроликам, не имеющим в крови нормальных антител к эритроцитам барана (лизосомы селезенки в дозе 3—3,2 мг по белку, лизосомы печени — 6 мг по белку, РНК — по 4 мг).

Антителообразование у «чистых» кроликов вызывало как введение РНК, так и лизосомных фракций. Наибольшей иммуногенностью обладали фракции, выделенные в первые 3 дня после введения донорам эритроцитов барана. Гемолизины образовывались в большем количестве, чем гемагглютинины. На 8-й день после введения антигена лизосомные фракции еще сохраняли способность вызывать первичный ответ, в то время как РНК оказались практически неэффективными. Фракции, выделенные на 21-й день, ни в одном случае не вызывали антителообразование у не подготовленных ранее животных.

Поскольку вызываемый фракциями подъем титров антител был относительно невелик, спустя 1 мес всех кроликов, которым однократно вводили субклеточные фракции, ревакцинировали однократно внутрибрюшинным введением 3×10^8 эритроцитов барана. Результаты этого эксперимента приведены на рис. 14. При введении аналогичной дозы бараньих эритроцитов контрольным кроликам средние титры гемагглютининов у них обычно не превышали 1 : 80, а гемолизинов — 1 : 160, поэтому отсчет вели от этого уровня (рис. 14).

Как видно из представленных данных, у кроликов, иммунизированных субклеточными фракциями, выделенными в первые 3 сут после введения антигена, наблюдали хороший ревакцинаторный ответ как по титру гемагглютининов, так и по титру гемолизинов. Иммунизация фракциями, выделенными на 8-й и 21-й день после вве-

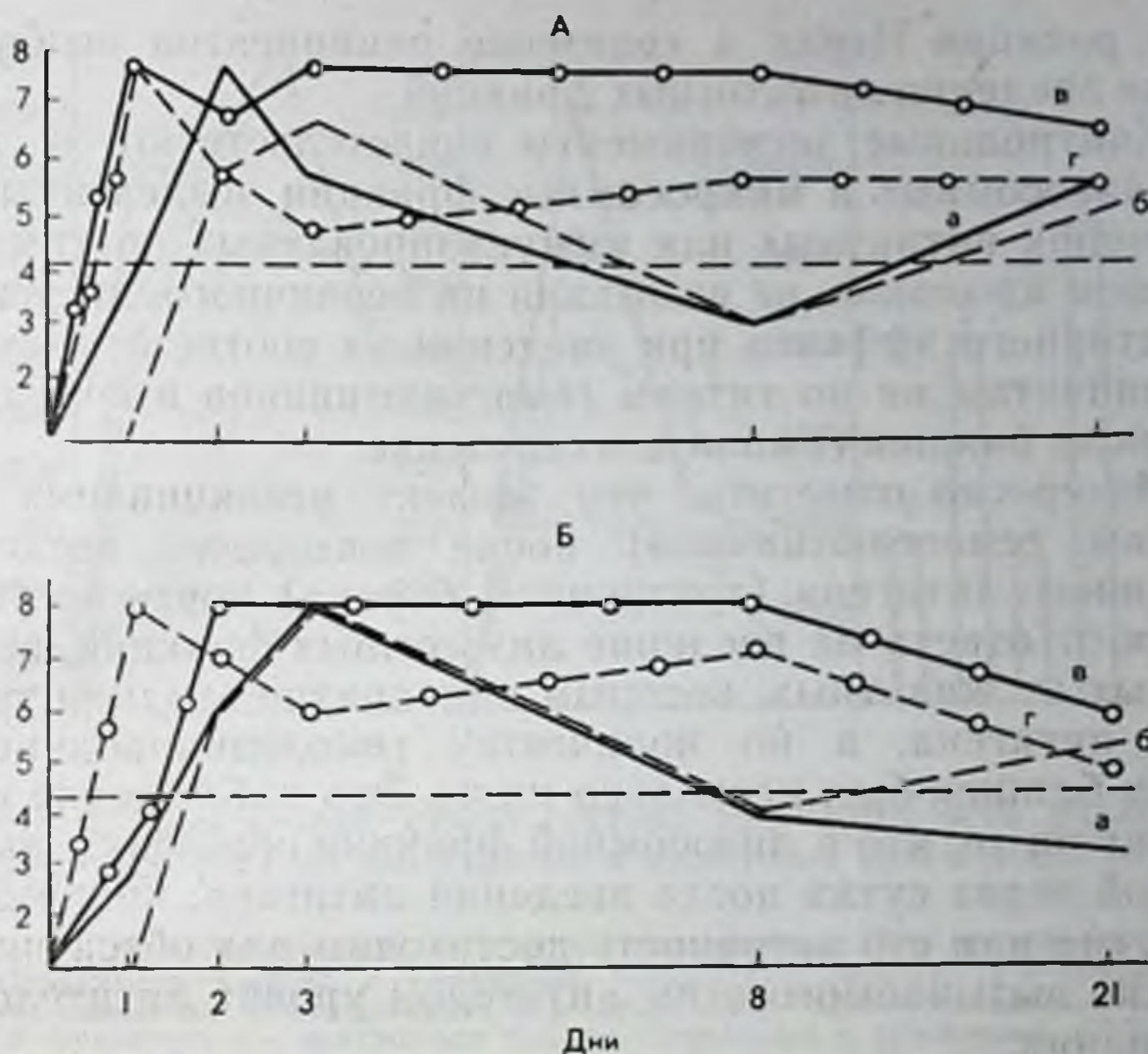


Рис. 14. Иммунологическая перестройка, вызываемая лизосомными и РНК-фракциями из клеток селезенки и печени иммунизированных доноров. Ревакцинация нативным антигеном.

А — гемагглютинины; Б — гемолизины; а, б — лизосомы из клеток селезенки и печени; в, г — фракции РНК из клеток селезенки и печени. На оси ординат — логарифмы титров с основанием 2; на оси абсцисс — время (дни). Прерывистой горизонтальной линией обозначен уровень антител у контрольных животных.

дения антигена, оказалась эффективной только при введении лизосом печени. В других опытах лизосомы и РНК из печени и селезенки доноров вводили ранее иммунизированным кроликам после снижения у них титров антител в крови. Титры гемолизинов и гемагглютининов определили на 5-й и 7-й день. Количество бляшек гемолиза на 1 млн. клеток селезенки подсчитывали на 5-й день. При определении иммуногенности на этой высокочувствительной модели обе исследуемые фракции селезенки и печени вызвали антителообразование в любые сроки их выделения. Правда, фракции, выделенные в первые 2 сут после введения антигена донорам, практически не вызвали образования гемолизинов, но продукция гемагглютининов в ответ на их введение была высокой. Значительным было и увеличение числа бляшек гемоли-

за в реакции Мерне в селезенке реципиентов особенно после введения лизосомных фракций.

Контрольные эксперименты свидетельствуют о том, что лизосомные и микросомные фракции, выделенные из селезенок интактных или иммунизированных другим антигеном кроликов, не вызывали ни первичного, ни ревакцинаторного эффекта при введении их соответствующим реципиентам ни по титрам гемагглютининов в крови, ни по числу бляшек гемолиза в селезенке.

Интересно отметить, что эффект ревакцинации (по титрам гемагглютининов) после повторного введения нативного антигена (эритроциты барана) почти не отличался от ответа на введение лизосомных фракций, выделенных от животных, которым однократно вводили ту же дозу антигена, а по количеству гемолизинпродуцирующих бляшек был несколько ниже. Это наблюдение указывает на то, что в лизосомной фракции селезенки, выделенной через сутки после введения антигена, количество антигена или его активность достаточны для обеспечения обычно вызываемого этим антигеном уровня антителиобразования.

В наших опытах фракции лизосом и РНК селезенки и печени оказались способными обеспечить вполне эффективную иммунологическую перестройку (priming effect), о чем свидетельствует хороший эффект, наблюдаемый после введения нативного антигена животным, подготовленным введением им субклеточных фракций.

Вторичный ответ вызывали все фракции независимо от времени их выделения. Имели место и некоторые различия в образовании гемагглютининов и гемолизинов. При первичном ответе продукция гемолизинов несколько опережала выработку гемагглютининов. При вторичном ответе, наоборот, выработка гемагглютининов опережала продукцию гемолизинов, которые в значительных количествах образовывались только при введении реципиентам фракций, выделенных в более поздние сроки. С этим, наверное, связано то, что Franzl (1962), работавшему на модели гемолизинов, при вторичном ответе не удалось обнаружить иммуногенности в лизосомах печени. В наших опытах в аналогичных условиях даже лизосомы селезенки практически не вызывали или вызывали очень слабую продукцию гемолизинов у реципиентов, в то время как вторичную продукцию наблюдали при введении всех исследуемых фракций.

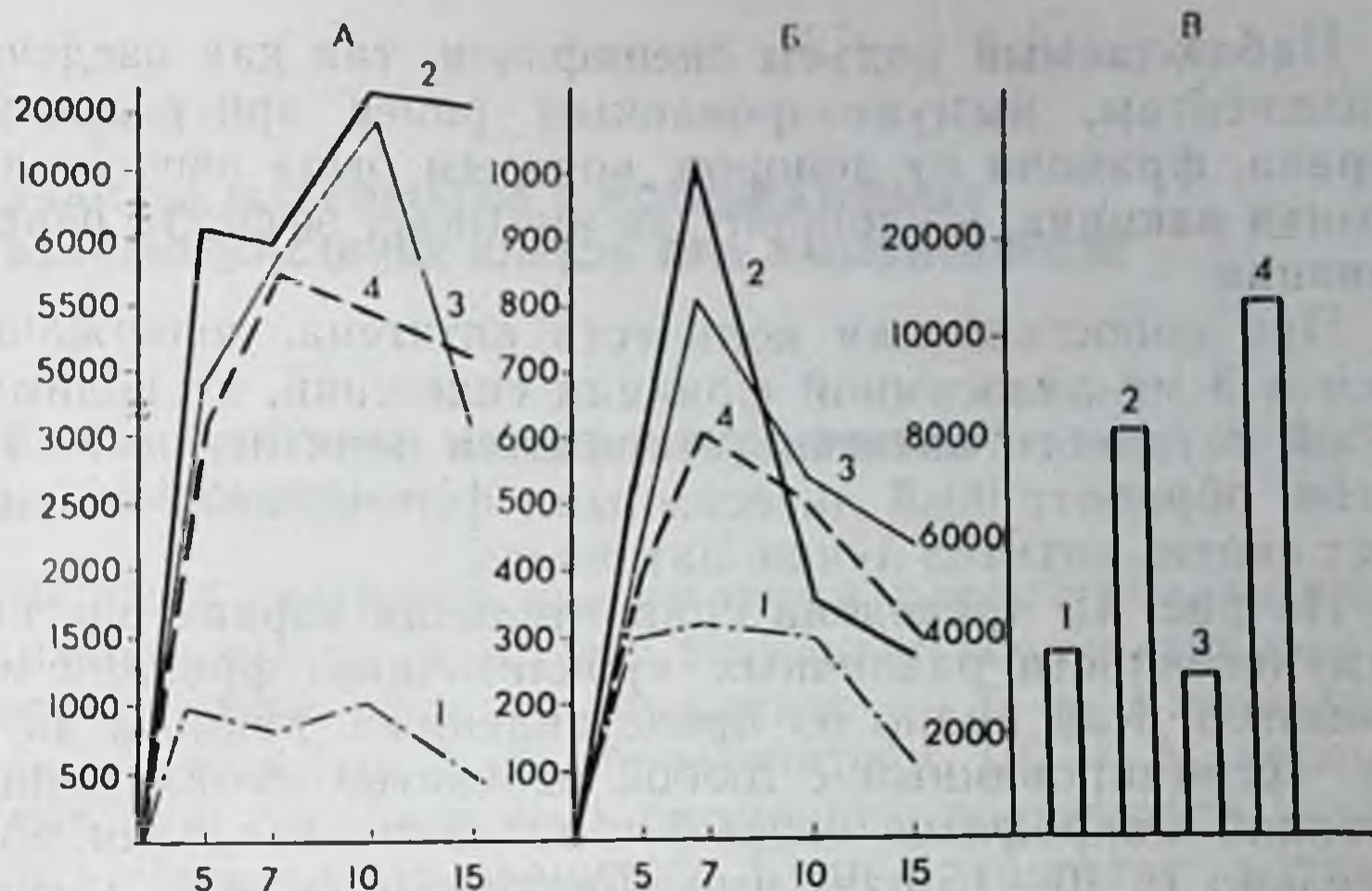


Рис. 15. Сравнительная характеристика иммуногенности различных субклеточных фракций макрофагов в различные сроки после их введения.

А — титры гемагглютининов; Б — титры гемолизиннов; В — количество анти-телообразующих клеток; 1 — нативные эритроциты барана; 2 — эритроциты барана, связанные с мембранами; 3 — эритроциты барана, связанные с лизосомной фракцией; 4 — эритроциты барана, связанные с суммарной РНК.

В наших опытах фракции лизосом и РНК, выделенные из селезенки и печени кроликов, которым однократно вводили эритроциты барана, оказались иммуногенными практически в равной степени. При этом иммуногенность можно было выявить во все сроки выделения фракций вплоть до последнего — на 21-й день после введения антигена. Примерно равная иммуногенность выделяемых из селезенки и печени иммунизированных животных РНК и бедных ею лизосом заставляет предполагать, что во всех случаях иммуногенность обусловлена антигенным материалом, связанным с этими фракциями.

Отсутствие подъема титров антител и увеличения числа антителопродуцирующих клеток после введения лизосомных и микросомных фракций, выделенных из селезенки контрольных кроликов, как интактным, так и ранее иммунизированным реципиентам свидетельствует о том, что антителообразование, вызываемое фракциями от иммунизированных животных, является результатом введения антигенного материала, а не следствием каких-либо неспецифических влияний.

Наблюдаемый подъем специфичен, так как введение реципиентам, иммунизированным ранее эритроцитами барана, фракции от доноров, которым была введена тифозная вакцина, и наоборот, не вызывает эффекта ревакцинации.

При сопоставлении количеств антигена, содержащегося в 3 мг лизосомной фракции селезенки, с вводимой дозой нативного антигена становится понятным, что антиген, обработанный лизосомными ферментами, индуцирует синтез антител лучше нативного.

На рис. 15 приведена сравнительная характеристика иммуногенности различных субклеточных фракций макрофагов. Как видно из представленных данных, антиген, ассоциированный с любой из взятых субклеточных фракций макрофагов через 3 ч после его введения, значительно (в 10—15 раз) иммуногеннее нативного антигена (эритроциты барана). Однако эта разница значительно заметнее при определении гемагглютининов, чем гемолизинов или бляшек гемолиза.

Глава IV

УЧАСТИЕ МАКРОФАГОВ В КООПЕРАТИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ КЛЕТОК ПРИ ИММУНОГЕНЕЗЕ

Взаимодействие между макрофагами и лимфоцитами

Недавно считалось правомочным рассматривать иммунный ответ организма как результат кооперативного взаимодействия двух типов клеток — Т- и В-лимфоцитов (И. Л. Чертков, А. Я. Фриденштейн, 1972). Макрофагам при этом отводили роль пассивного поставщика антигенных молекул лимфоцитам. Если в качестве антигенов использовали растворимые белки, то, по мнению некоторых авторов (Унапе, 1972), индукцию антителообразования вызывали нативные молекулы антигена, адсорбированные на наружной цитомембране макрофагов.

В настоящее время накопился ряд факторов, свидетельствующих о необходимости для полноценного иммунного ответа кооперативного взаимодействия макрофагов с лимфоидными клетками. Контакт между макрофагами и лимфоцитами наблюдали давно. Описано скопление лимфоцитов и плазматических клеток вокруг макрофагов и дендритных клеток в перифолликулярных зонах лимфатических узлов и селезенки (Miller, Avrameas, 1971). Цитологическими и электронно-микроскопическими методами было установлено, что лимфоциты часто окружают центрально расположенный макрофаг, содержащий антиген, и образуют с ним цитоплазматические мостики (Schoenberg et al., 1967; Sulitzeam et al., 1971).

В нашей лаборатории Ю. Н. Фаворской и сотр. (1975) была предпринята попытка изучить поверхностные структуры макрофагов и лимфоцитов при их взаимодействии в условиях антигенной стимуляции с помощью растрового электронного микроскопа, который позволяет получить трехмерное изображение целых клеток, что, как мы надеялись, может существенно дополнить представления о строении поверхности клеток МФС и ее изменениях во время клеточных контактов.

Опыты были поставлены на мышах-самцах линии А/Н с массой тела 18—20 г. С целью получения стимулированных макрофагов за 3 дня до опыта мышам вводили по 2 мл мясо-пептонного бульона. Для получения макрофагов, индуцированных антигеном, животным, предварительно стимулированным введением мясо-пептонного бульона, за 10 или 45 мин до вскрытия внутрибрюшинно вводили по 0,1 мл 20% суспензии эритроцитов барана. Контролем служили макрофаги интактных мышей. Лимфоциты у сенсибилизированных мышей получали путем выделения лимфатических узлов, измельчения их в ручном гомогенизаторе и суспендирования после фильтрования осажденных лимфоцитов в среде 199 с 10% раствором бычьей сыворотки.

Для изучения взаимодействия макрофагов с лимфоцитами 2 мл перитонеального экссудата (содержащего макрофаги в концентрации 2×10^5 мл), полученного от мышей, индуцированных эритроцитами барана, вносили в пробирки с находящимися в них покровными стеклами и культивировали в течение часа при 37°C. Неприлипшие клетки трижды отмывали средой 199 с 10% раствором бычьей сыворотки и к монослою макрофагов добавляли суспензию лимфоцитов из лимфатических узлов (2×10^9 мл) в 2 мл той же среды и культивировали при 37°C в течение часа.

Контролем служили культивированные в этих же условиях интактные, стимулированные введением мясо-пептонного бульона и индуцированные эритроцитами барана макрофаги, к которым не добавляли взвеси лимфоцитов, а также изолированных лимфоцитов. После культивирования клеток на покровных стеклах их отмывали фосфатным буфером (рН 7,4), фиксировали в 1% растворе глутаральдегида на том же буфере, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, высушивали в эксикаторе с силикагелем, напыляли тонким слоем углерода и золота и изучали в растровом электронном микроскопе 25М-1 при возрастающем напряжении 10 кВ.

Наряду с макрофагами в перитонеальном экссудате содержались единичные лимфоциты. При помощи растрового электронного микроскопа не удалось обнаружить разницы в форме и поверхности лимфоцитов из перитонеальной жидкости мышей, стимулированных и не стимулированных мясо-пептонным бульоном. Лимфоциты представляли собой клетки округлой или овальной формы с шероховатой поверхностью, часто с отростками разной длины. Иногда наблюдали лимфоциты, соединенные цитоплазматическими мостиками друг с другом или с макрофагами (рис. 16, а, б, в). При больших увеличениях ($\times 7000$ и $\times 10\,000$) хорошо просматривалось распластывание отростков мостика лимфоцита по цитоплазматической мембране макрофага (рис. 16, б, в). Несмотря на то что в перитонеальном экссудате интактных

мышей присутствовали только единичные лимфоциты, контакты между ними и макрофагами обнаруживали неоднократно. Нередко наблюдали контакты макрофагов с двумя лимфоцитами и более. Число мостиков между лимфоцитами и макрофагами в перитонеальном экссудате intactных мышей было значительно меньше, чем между лимфоцитами и макрофагами в перитонеальном экссудате мышей, которым вводили эритроциты барана. Это могло свидетельствовать о том, что наблюдаемые контакты не случайны и выполняют определенную физиологическую роль, что и подтвердилось в серии экспериментов, в которых изучали влияние антигенной стимуляции на частоту возникновения контактов между культивируемыми совместно макрофагами из перитонеального экссудата мышей и лимфоцитами из лимфатических узлов сингенных животных. Установлено, что количество контактирующих клеток увеличилось в случае добавления *in vitro*, лимфоцитов к макрофагам индуцированным антигеном *in vivo*. В популяции макрофагов, индуцированных антигеном, число контактов с лимфоцитами зависело от фагоцитарной активности мононуклеаров: образование мостиков с лимфоцитами было более типичным для макрофагов, поглотивших эритроциты барана *in vivo*. При совместном культивировании макрофагов с лимфоцитами от сингенных мышей наблюдали частые контакты между этими клетками (рис. 16, г), а также между клетками одного вида (рис. 16, д).

Изучение макрофагов, полученных от стимулированных и не стимулированных мясо-пептонным бульоном мышей в растровом электронном микроскопе, позволило установить существенные различия в строении наружной цитомембраны мононуклеаров. Характер прикрепления к поверхности стекла, истончение краев цитоплазмы стимулированных макрофагов свидетельствуют о большей их способности к распластыванию по сравнению с нестимулированными клетками. Такие данные позволяют предположить, что стимуляция макрофагов мясо-пептонным бульоном *in vivo* вызывает повышение их функциональной активности и играет существенную роль в поведении макрофагов перитонеального экссудата в условиях культивирования. Это предположение согласуется с данными Albrecht и соавт. (1972), показавших зависимость топографии поверхности перитонеальных макрофагов от степени стимуляции их *in vivo*.



Рис. 16. Цитоплазматические мостики между макрофагами и лимфоцитами.

а — $\times 2000$; б — $\times 7000$; в — $\times 10\,000$.

Характерно, что, несмотря на тщательное отмывание монослоя макрофагов от неприлипающих клеток, в препаратах почти всегда обнаруживали небольшое число лимфоцитов, соединенных с макрофагами пальцевидными выростами. Снимки не дают возможности судить о целостности мембран клеток в месте контакта, но свидетельствуют об относительной прочности его. Если к монослою макрофагов, поглотивших *in vivo* эритроциты барана, прибавляли сингенные лимфоциты, количество контактирующих с макрофагами лимфоцитов резко возрастало,

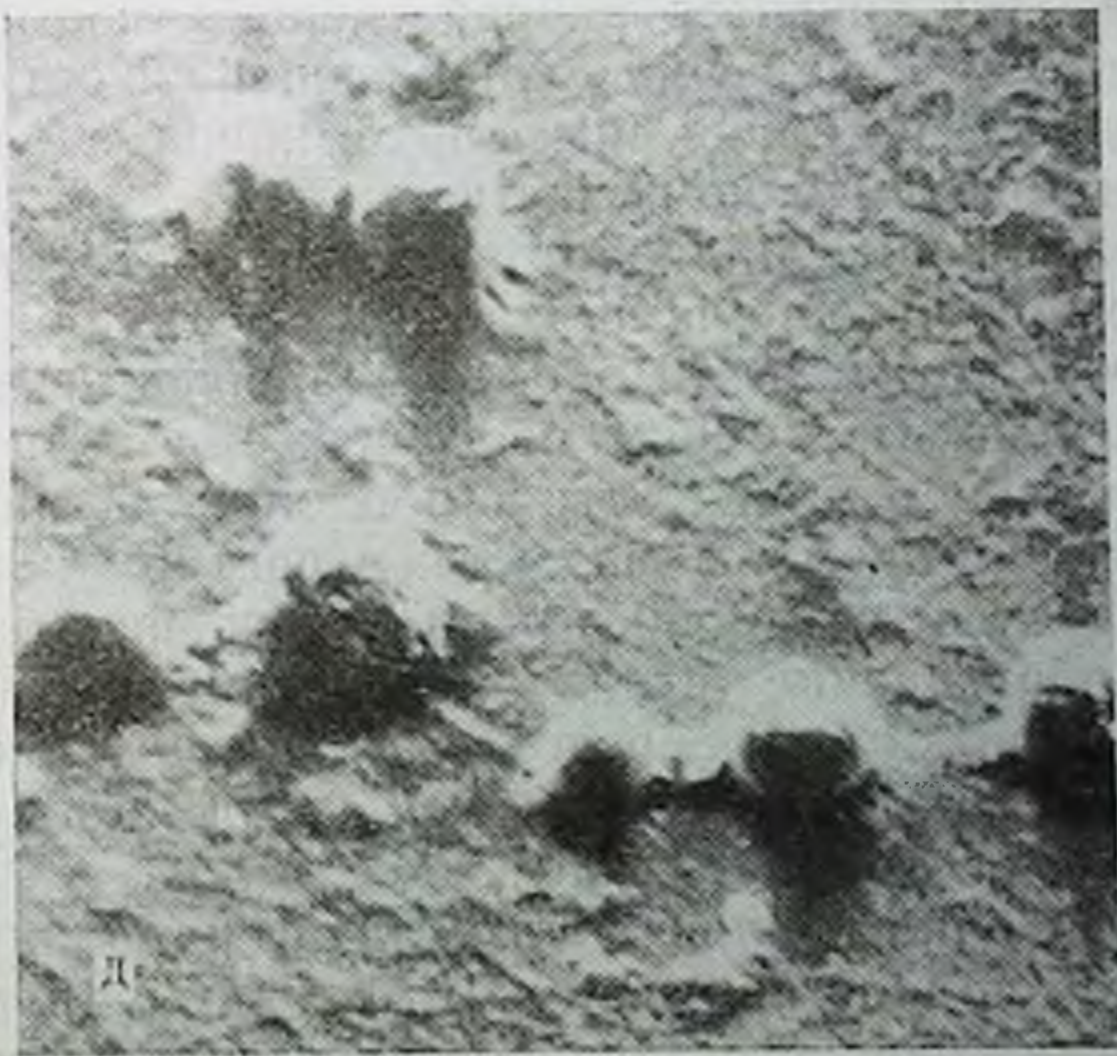
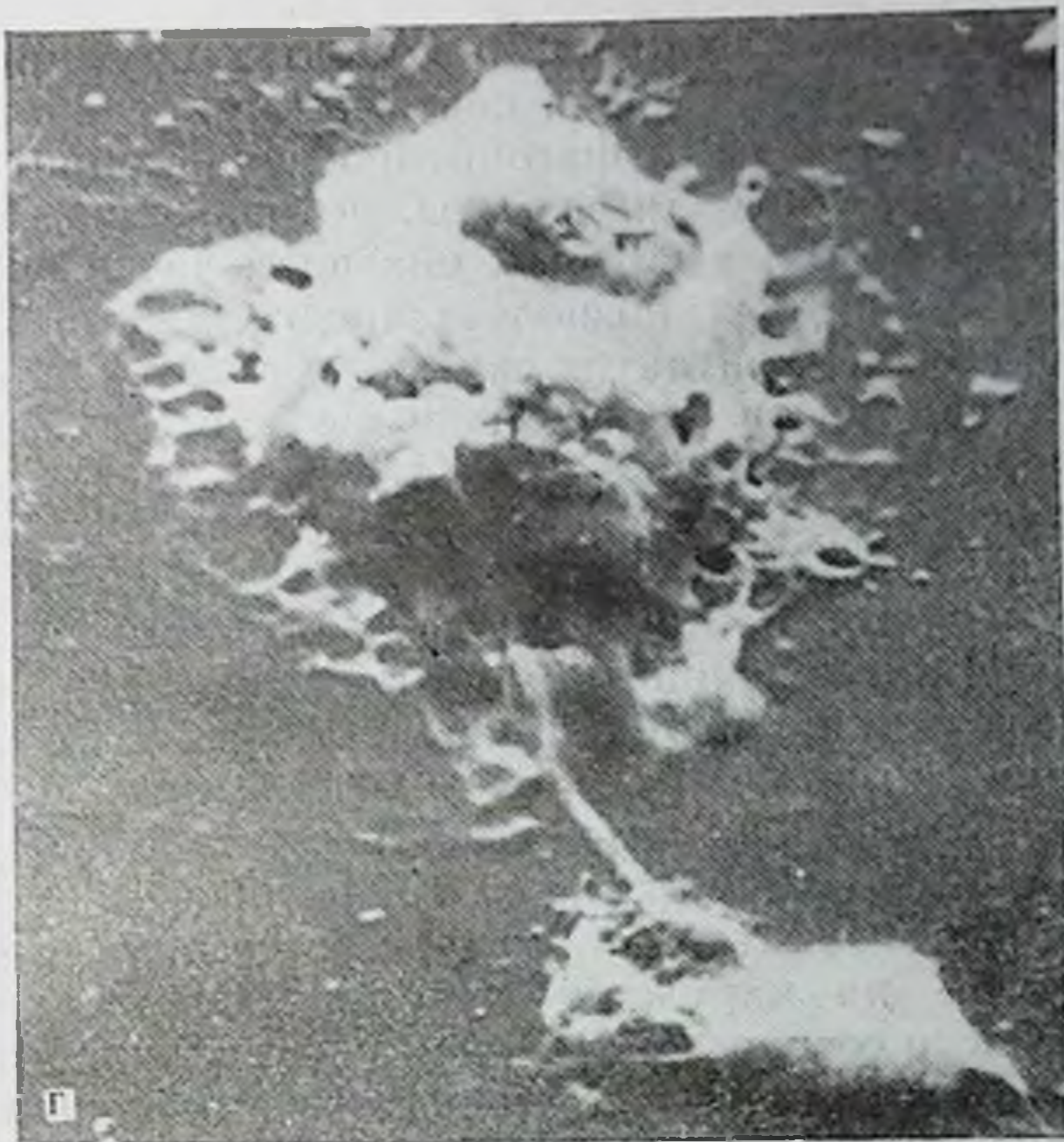


Рис. 16. (продолжение).

г — $\times 7000$; д — контакты между клетками одного вида. $\times 2000$ (растровая электронная микроскопия).

так же как и число лимфоцитов, контактирующих друг с другом. Увеличение числа контактов в препаратах, содержащих макрофаги, фагоцитировавшие эритроциты барана и интактные лимфоциты, по сравнению с таковым в препаратах, в которых оба вида клеток были от интактных животных, позволяет предположить, что увеличение частоты контактов связано с антигенной стимуляцией макрофагов. Возникновение контактов между макрофагами и лимфоцитами было описано ранее, однако трехмерное изображение, получаемое при помощи растрового электронного микроскопа, дает особо четкую картину взаимодействия макрофагов и лимфоцитов, не оставляющую сомнений в том, что в ходе иммунного процесса эти клетки тесно взаимодействуют друг с другом. Крайне важно выяснить, происходит ли при этом обмен цитоплазмой или другими компонентами этих клеток (комплекс АГ — РНК) или специфическое соединение рецептора лимфоцита с антигенной детерминантой, локализуемой на наружной цитомембране макрофага. Контакт осуществляется при помощи единичного пальцевидного отростка, вырастающего из лимфоцита. Было высказано мнение (Ю. Н. Фаворская и др., 1975), что на микроворсинке пальцевидного отростка лимфоцита локализуется один рецептор данной специфичности или что множественные рецепторы одной специфичности, локализуемые на мембране лимфоцита, подвижны и скапливаются на ограниченном участке.

Использование радиоавтографии позволило наблюдать переход материала из клетки в клетку по цитоплазматическим мостикам. Монослой макрофагов инкубировали с меченым антигеном, после чего прибавляли к нему аутологичские лимфоциты и продолжали инкубацию. При изучении срезов в фазово-контрастном и электронном микроскопе с помощью радиоавтографии было установлено образование цитоплазматических мостиков между этими клетками и перенос материала от макрофага к лимфоцитам (Bona et al., 1972; Yokomuro, Nozino, 1972; Lipsky, Rosenthal, 1973).

Обнаружение поглощенного антигена в ядрах лимфоцитов позволило предположить наряду с другими возможностями непосредственное действие антигена на генетический аппарат лимфоцита. Насколько это предположение правомочно, покажет будущее, однако и в опытах с переносом лимфоцитов после их инкубации *in vitro*

перитонеальными макрофагами мышей, поглотивших эритроциты барана, облученным реципиентам было показано, что макрофаги передают антигенную информацию иммунологически компетентным клеткам. При этом иммуногенность поглощенного антигена снижается по мере его переваривания макрофагами (Jokomito et al., 1972).

Необходимость прямых контактов между макрофагами и лимфоцитами для осуществления иммунного ответа показана давно (Shoenberg et al., 1964; Oppenheim et al., 1968). Описано образование скоплений иммунных лимфоцитов вокруг макрофагов в присутствии специфического антигена. При этом вокруг одного макрофага может скапливаться до 20 лимфоцитов, образуя гроздь (cluster). Вокруг макрофага, содержащего антиген, могут скапливаться и интактные лимфоциты. Однако при инкубации иммунных лимфоцитов с интактными макрофагами в отсутствие антигена скопления лимфоцитов вокруг макрофагов встречаются в 7 раз реже. Образование гроздьев в иммунной системе не зависит от выделения каких-нибудь растворимых факторов, так как в среде после культивирования иммунных лимфоцитов не обнаруживают активности, способствующей образованию скоплений лимфоцитов вокруг макрофагов. Этот процесс может быть усилен обогащением суспензии лимфоцитов Т-клетками. Эти данные указывают на то, что в образовании скоплений макрофаги играют роль антигенсвязывающих клеток, с которыми лимфоциты взаимодействуют специфически и физически (Werdelin et al., 1974; Fagg, Gruen, 1975).

Электронно-микроскопические исследования показали, что типичная гроздь клеток состоит из одного макрофага и одного очень большого лимфоцита, похожего на бластную клетку, контактирующих друг с другом на значительном участке. К этому центральному лимфоциту прикреплено около 20 малых лимфоцитов, похожих по морфологическим признакам на Т-клетки и соединяющихся с центральной клеткой уropодами (Nielsen, 1974).

Лимфоциты довольно часто оказываются тесно связанными с макрофагами и в отсутствие антигенной стимуляции как *in vivo* (Miller, Avrameas, 1971), так и *in vitro*, что наблюдали у мышей (Jokomito, Nozima, 1971), кроликов (Sulitzeanu et al., 1971), морских свинок (Siegel, 1970) и человека (McFarland et al., 1966). Возможно, эти межклеточные взаимодействия являются ступенью

в функциональном созревании и дифференцировке лимфоцитов (Mosier, Pierce, 1972) и происходят независимо от антигенной стимуляции, которая только увеличивает их частоту.

Особенно тщательно механизм антигеннезависимого связывания тимоцитов и лимфоцитов сингенными макрофагами был исследован Lipsky и Rosenthal (1973, 1975). Им было показано, что макрофаги различного происхождения (перитонеальные, селезеночные или альвеолярные) обладают большей способностью к взаимодействию с лимфоцитами и тимоцитами, чем зернистые лейкоциты или фибробласты. Связывание происходит только живыми макрофагами, обладающими активными метаболическими процессами, в то время как тимоциты и лимфоциты, даже убитые нагреванием или обработкой антимаболами, все равно связываются нормальными макрофагами. То, что L₂C-лейкозные клетки, несущие на своей поверхности γ_2 -иммуноглобулины, так же как и лимфоциты, содержащие иммуноглобулин, связываются макрофагами не больше, а скорее меньше, чем упоминаемые выше клетки, и то, что удаление с поверхности иммуноглобулина не понижает их способности физически связываться с макрофагами, позволяет авторам считать, что связывание макрофагов и Т-лимфоцитов происходит не за счет иммуноглобулиновых рецепторов макрофагов. Нормальные лимфоциты, тимоциты и клетки лимфатических узлов связываются макрофагами активнее, чем L₂C-лейкозные клетки или эритроциты, что доказывает специфичность клеточного типа, участвующего в этих взаимодействиях.

Использование различных приемов исследования (действие ферментов, ингибиторов и т. д.) привело авторов к заключению, что взаимодействие макрофагов с лимфоцитами осуществляется рецепторами, отличными от всех ранее описанных рецепторов макрофагов или лимфоцитов. При этом взаимодействии необходим прямой физический контакт клеток друг с другом, так как специфическую стимуляцию лимфоцитов нельзя осуществить средой, в которой инкубировали макрофаги после их контакта с антигеном (Rosenstreich, Rosenthal, 1973; Waldron et al., 1973).

Образование гроздьев макрофаг — лимфоциты при контакте с антигеном всегда предшествует пролиферации лимфоцитов и на ранней ее стадии клетки, меченные ³H-

тимидином, физически связаны с макрофагами, содержащими антиген (Sulitzeanu et al., 1971). Тем не менее макрофаги могут связывать как Т-, так и В-лимфоциты и в отсутствие антигена, но не за счет иммуноглобулинов, связанных с поверхностными мембранами. Это позволяет предположить, что начальные стадии иммунного ответа облегчаются предсуществующим механизмом, обеспечивающим специфическое клеточное распознавание, который облегчает отбор специфических лимфоцитов и способствует их пролиферации и дифференциации.

Главным вопросом, требующим ответа, остается выяснение природы и пути, по которому передается иммуногенный сигнал макрофагов, и клеток, которым он передается. Для решения этого вопроса был предпринят ряд исследований, в том числе был использован так называемый эффект носителя, заключающийся в том, что селезенки облученных мышей, иммунизированных сывороточным альбумином кролика, отвечают при добавлении *in vitro* связанного с динитрофенилом (ДНФ) сывороточного альбумина продукцией антител только в том случае, если животных иммунизировали этим альбумином в полном адьюванте Фрейнда. Такой же эффект обнаружили при иммунизации мышей перитонеальными макрофагами, обработанными сывороточным альбумином кролика.

Для определения клеток-мишеней, на которые действует комплекс макрофаг — антиген, облученным животным вводили Т-лимфоциты с макрофагами, содержащими антиген, а спустя 8 дней — В-лимфоциты или наоборот. Поскольку выяснено, что только в первом случае селезенки мышей способны отвечать *in vitro* на введение связанного с ДНФ сывороточного альбумина кролика, сделан вывод, что выработка антител зависит от кооперации трех типов клеток. Однако макрофаги, содержащие антиген, вначале реагируют с Т-клетками и только после этого включаются в работу В-клетки (Kunin et al., 1972).

В отсутствие макрофагов очищенные иммунные Т-лимфоциты не связывают *in vitro* растворимый антиген, не активизируются им и не становятся к нему толерантными (Rosenthal et al., 1971; Waldron et al., 1973).

Вопреки ранее бытовавшему мнению о возможности прямой активизации В-клеток тимуснезависимыми антигенами в отсутствие макрофагов (Mosier et al., 1974),

в настоящее время доказано, что последние необходимы и для индукции образования антител к тимуснезависимому синтетическому полимеру (Chused et al., 1976). При этом для ответа *in vitro* клеток селезенки на введение немитогенных полимеров и эритроцитов барана необходимо примерно одинаковое количество макрофагов, равное приблизительно 6×10^4 — 10^5 .

Ответ освобожденной от макрофагов клеточной суспензии селезенки может быть восстановлен также путем добавления 1×10^3 макрофагов в сочетании с 2-меркаптоэтанолом в дозе 5×10^{-3} М. Частично ответ восстанавливается даже при введении этой дозы 2-меркаптоэтанолом без макрофагов, что позволяет думать об активации этим соединением функции макрофагов в 10—100 раз или замещении им функции макрофагов.

Вероятно, не все антигены нуждаются в одинаковых количествах макрофагов для осуществления ими индукции антителообразования. Об этом свидетельствует резкое ослабление ответа на некоторые антигены уже при грубом освобождении клеток селезенки от макрофагов (тимусзависимые антигены), в то время как ответ на введение митогенного антигена (TNP—LPS) осуществляется и в клеточной суспензии, обедненной макрофагами путем фильтрации ее через сефадекс G-10 (Chused et al., 1976).

Все это свидетельствует о том, что макрофаги играют определенную роль в осуществлении клеточных взаимодействий, вызывающих иммунный ответ. Представлены веские доказательства того, что взаимодействует с Т-лимфоцитами антиген, не связанный с мембранами макрофагов, но распознающийся Т-лимфоцитами, так как они пролиферируют в его присутствии. 25% изначально связанного макрофагами ДНФ-альбумина морских свинок остается постоянным при длительном культивировании макрофагов. Это наблюдение справедливо и для других антигенов с небольшими количественными отклонениями (10—25%), например сывороточного альбумина человека и мыши, гемоглобина и др. Однако небольшие количества этих антигенов, вызывающие пролиферацию Т-лимфоцитов, устойчивы к трипсину и их нельзя инактивировать специфическими антителами. Это позволяет предполагать, что Т-лимфоциты распознают антиген, локализующийся внутри макрофагов (Eller, Rosenthal, 1975).

Можно предположить несколько путей передачи иммунологического стимула с макрофага на лимфоцит. При иммобилизации антигенных детерминант, связанных с поверхностью макрофага, может повышаться их активность к поверхностным рецепторам лимфоцитов. Если же допустить, что рецепторы лимфоцита находятся в скрытом состоянии, то физическое взаимодействие с макрофагом может сделать их открытыми. Не лишено также основания предположение, что макрофаги передают антигенную информацию непосредственно в цитоплазму лимфоцита или по крайней мере так перерабатывают антиген, что он приобретает способность реагировать с рецептором Т-лимфоцитов (Waldron et al., 1973).

Для бласттрансформации лимфоцитов, вызванной неспецифическими агентами или стимулами, необходимо присутствие интактных макрофагов, тогда как для образования гроздьев лимфоцитов вокруг макрофагов присутствие антигена нужно не всегда. Существует ряд агентов, способных вызвать интенсивную бласттрансформацию лимфоцитов разных видов животных (Viniaminov et al., 1975). Метаперйодат натрия, нейраминидаза и галактозидаза являются активными митогенами для Т-лимфоцитов мышей (McClain et al., 1975). Тем не менее можно считать доказанным, что и в этих случаях бласттрансформация лимфоцитов не может быть осуществлена в отсутствие макрофагов (М. Бабянскас и др., 1972; Greineder, Rosenthal, 1975). При этом практически неважно, какие клетки — Т-лимфоциты или макрофаги — будут обработаны митогенами (Viniaminov et al., 1975). Потребность в макрофагах при обработке лимфоцитов митогенами специфична, поскольку другие клетки не могут заменить их в этих культурах. При обработке макрофагов митогенами также наблюдается бласттрансформация в лимфондных культурах, с которыми их смешивают. Механизм действия митогенов в этих двух случаях, вероятно, различен, потому что изменения поверхностных детерминант обоих видов клеток различны.

Изменения макрофагов, вызываемые митогенами, устойчивы к протеолитическим ферментам и сохраняются при культивировании клеток в течение 2 сут, в то время как обработанные митогенами лимфоциты теряют приобретенные свойства при обработке папаином и при длительном культивировании.

Вряд ли действие обработанных митогенами макрофагов на лимфоциты может быть полностью объяснено освобождением из них ферментов (нейраминидазы или галактозидазы) в процессе пиноцитоза, потому что обработанные этими ферментами лимфоциты не пролиферируют в отсутствие макрофагов. Наконец, пролиферацию лимфоцитов нельзя стимулировать прибавлением обработанных митогенами, но убитых макрофагов, в то время как добавление интактных макрофагов в эту систему стимулирует бласттрансформацию. Скорее всего для индукции бласттрансформации Т-лимфоцитов необходим какой-то сигнал с макрофагов, запускающий эту реакцию, что свидетельствует о важной роли макрофагов в индукции пролиферации Т-лимфоцитов (Greineder, Rosenthal, 1975).

Взаимодействие макрофагов с Т-клетками регулируется Н-антигенами или продуктом гена, связанного с системой генов гистосовместимости. К этому выводу пришли на основании того, что аллоантисывороткой можно блокировать взаимодействие макрофагов и Т-лимфоцитов. В настоящее время не установлено, какой клетке принадлежат детерминанты гистосовместимости, на которые действует аллоантисыворотка. Тем не менее было высказано предположение, что поскольку ген Jg действует на уровне Т-клеток, почти не влияя на функцию макрофагов, и следовательно, иммунный ответ контролируется главным образом Т-лимфоцитами, а ген Jg связан с системой Н-генов, то, вероятнее всего, ответственные за взаимодействие макрофагов с Т-лимфоцитами детерминанты гистосовместимости локализуются на Т-лимфоцитах (Rosenthal, Shevach, 1973; Shevach, Rosenthal, 1973).

Интересно, что для пролиферации лимфоцитов, вызываемой растворимыми белками, необходимо присутствие сингенных макрофагов, в то время как пролиферация лимфоцитов, обусловленная неантигенными митагенами (ФГА), стимулируется как сингенными, так и аллогенными макрофагами. Для пролиферации в смешанной культуре лимфоцитов наиболее эффективным оказывается прибавление аллогенных макрофагов, в отсутствие которых бласттрансформация не происходит (Greineder, Rosenthal, 1975a). Получены также данные о том, что макрофаги участвуют в отторжении опухолевого трансплантата не только как клетки-«мусорщики», но и через

лимфоциты, поскольку последние приобретают способность ингибировать рост клеток лимфом только после инкубации с макрофагами, взятыми от животных, которым вводили клетки опухоли (Evans, Alexander, 1972).

Все накопленные в настоящее время данные свидетельствуют об активном участии макрофагов в межклеточных взаимодействиях при осуществлении иммунного ответа, хотя многое еще остается неясным и требует тщательного изучения. Макрофаги участвуют только в кооперативных процессах, развивающихся на уровне предшественников антителопродуктов, включающих иммунопоэтическую дифференцировку клеток-предшественников, развитие и размножение антителообразующих клеток. В исследованиях, выполненных под руководством Р. В. Петрова, установлен второй тип клеточной пролиферации в процессе иммунного ответа — взаимодействие на уровне зрелых антителопродуктов, в результате которого в антителогенез вовлекаются лимфоциты интактной популяции (Р. В. Петров и др., 1972). Вероятно, в кооперативных взаимодействиях на уровне зрелых антителопродуктов макрофаги не принимают участия, хотя полностью исключить эту возможность нельзя хотя бы потому, что феномен стимуляции синтеза иммуноглобулинов наиболее выражен при сочетаниях клеток иммунных лимфатических узлов с клетками интактной селезенки (или наоборот), где макрофаги обязательно присутствуют. Существуют ли среди макрофагов отдельные субклассы, приспособленные к одной из многообразных функций, выполняемых этими клетками, до сих пор остается неясным. В прерывистом градиенте плотности альбумина бычьей сыворотки среди макрофагов перитонеального экссудата описаны моноклеарные клетки (см. гл. I), обозначенные как А-клетки и служащие как бы источником иммуногенной РНК (Rice, Fishman, 1973). Эти клетки будто бы отличны от макрофагов другого субкласса, обладающих рецептором для соединения с Т-лимфоцитами (Walker, 1974).

Несмотря на то что в собственных экспериментах мы убедились в возможности разделения популяции перитонеальных макрофагов на подклассы, функционально отличающиеся друг от друга, у нас нет уверенности, что обнаруженные различия не являются отдельными стадиями, которые проходит клетка в процессе захвата, переваривания и хранения антигена.

Растворимые факторы, выделяемые во время клеточных взаимодействий

Помимо непосредственного физического контакта, макрофаги и иммунокомпетентные клетки взаимодействуют друг с другом при помощи разнообразных растворимых факторов, выделяемых этими клетками после антигенной стимуляции. Имеется предположение, что подавляющее большинство растворимых факторов выделяется Т-лимфоцитами, причем их многообразие не уступает многообразию антител, образуемых В-клетками (Х. Фьоденберг и др., 1975). Химическая природа большинства этих факторов не изучена. Нельзя также считать доказанным, что эффекты, вызываемые ими в системах *in vitro*, имеют место и в организме животного или человека.

Среди растворимых лимфоцитарных факторов есть несколько действующих непосредственно на макрофаги. К ним в первую очередь относятся факторы, тормозящие миграцию макрофагов (МИФ), вызывающие их хемотаксис, агрегацию и активацию. Среди факторов, вырабатываемых сенсibilизированными лимфоцитами, имеются как стимулирующие, так и ингибирующие функцию макрофагов.

Одним из наиболее изученных лимфоцитарных факторов, непосредственно действующих на макрофаги, является открытый ранее фактор, ингибирующий их миграцию (Bloom, Bennett, 1966). Получают его из супернатанта суточной культуры сенсibilизированных лимфоцитов в присутствии антигена или в некоторых случаях какого-нибудь митогена (конканавалин А). Испытывали МИФ в капиллярном тесте на скорость миграции макрофагов из капилляра (Remold et al., 1972).

С целью определения механизма действия МИФ на макрофаги были проведены специальные исследования. Оказалось, что при инкубации макрофагов с МИФ в присутствии D, L-фукозы МИФ не действует, но его активность может быть восстановлена.

Предварительная обработка МИФ или макрофагов ферментом, отщепляющим конечную L-фукозу от полисахаридов (L-фукозидазой), показала, что, в то время как активность МИФ от этой обработки не страдает, макрофаги, инкубированные с этим ферментом в течение часа, больше не реагируют на МИФ. Следовательно, для проявления действия МИФ необходимо, чтобы на

поверхностных мембране макрофагов находилась L-фукоза, которая, возможно, играет роль рецептора для МИФ (Remold, 1975). Этому углеводу приписывают большую роль в клеточных поверхностных взаимодействиях.

Действие МИФ ингибируется ацетилэстеразой макрофагов только в активной форме. Во всяком случае ингибиторы ацетилэстеразы повышают чувствительность макрофагов к МИФ. Взаимодействие ацетилэстеразы с МИФ происходит тоже на клеточной поверхности. Возможно, ацетилэстераза является лишь частью механизма, контролирующего ответ клетки на МИФ, поскольку известно, что ряд клеточных гидролаз участвует в регуляции других биологических процессов, таких, как хемотаксис зернистых лейкоцитов, и освобождение гистамина из лаброцитов (Remold, 1975).

Чувствительность макрофагов к фактору, ингибирующему их миграцию, может меняться под влиянием различных химических агентов. Ряд агентов, реагирующих с гидроксильными, сульфгидрильными или карбонильными группами, повышает чувствительность макрофагов к МИФ. Вероятно, изменения происходят на уровне клеточных поверхностей, тем более что изменения различных функциональных групп на наружной цитомембране могут оказывать одинаковый физиологический эффект (Remold, 1977).

Помимо того, что выделяемые лимфоцитами факторы действуют непосредственно на макрофаги, последние в ряде случаев избирательно аккумулируют некоторые из выделяемых лимфоцитами медиаторов и, возможно, участвуют в их транспортировке.

Т-лимфоциты, инкубированные с антигенами или аллогенными клетками *in vitro*, выделяют ряд специфических и неспецифических факторов. Обнаружено, что один из специфических факторов, усиливающий иммунный ответ, будучи связанным с поверхностью макрофагов, угнетает его, находясь в свободном состоянии в среде (Feldman, 1972). Супрессор, выделяемый в присутствии антигена Т-лимфоцитами мышей, обработанных пикрилсульфоновой кислотой, специфически угнетает способность лимфоцитов к пассивной передаче контактной гиперчувствительности. Этот супрессор цитофилен по отношению к макрофагам и, вероятно, транспортируется ими (Zembala, Asherson, 1974; Asherson, Zembala, 1974).

Ряд факторов, выделяемых лимфоцитами, не вырабатывается в отсутствие макрофагов (Horton et al., 1974). Так же как и для активации макрофагов, необходимо присутствие лимфоцитов или продуктов их жизнедеятельности (Wilton et al., 1975).

Обнаружена некоторая разница между Т- и В-лимфоцитами во взаимодействиях с макрофагами. Если продукция лимфокина клетками селезенки и лимфатического узла в ответ на тимусзависимые антигены и митогены нуждается в присутствии макрофагов, то стимуляторы В-клеток, например липополисахариды, тоже вызывающие выработку лимфокинов, действуют и в отсутствие макрофагов.

На чистых популяциях Т- и В-лимфоцитов было выяснено, что Т-лимфоциты пролиферируют в ответ на антигенный стимул и вырабатывают лимфокины только при кооперации с макрофагами. В-лимфоциты могут быть стимулированы соответствующими митогенами или антигенами при прямом контакте с ними и в отсутствие макрофагов. Вероятно, Т- и В-клетки нуждаются в различных условиях для активации и кооперации с макрофагами. Интересно, что для ответа на тимусзависимые антигены В-клеткам, как и макрофагам, нужны также Т-клетки, что свидетельствует о важной роли макрофагов в кооперативных отношениях между Т- и В-клетками.

Возможно, что липополисахарид и тимуснезависимые антигены (полимеризованный флагелин и др.) имеют такую конфигурацию молекул, которая позволяет им активизировать непосредственно В-клетки. Поскольку лимфокины вырабатываются в течение первых 4 ч после контакта с антигеном, вероятно, макрофаги играют специальную роль в ранних стадиях активации лимфоцитов. Может быть, способность макрофагов концентрировать тимусзависимый антиген и подавать его к Т-лимфоцитам в распознаваемой форме опосредованно регулирует активность В-клеток, обеспечивая их участие в иммунном ответе (Whal et al., 1975).

Среди многочисленных растворимых белков и ферментов, вырабатываемых макрофагами, в опытах *in vitro* было обнаружено выделение ими в среду специального фактора, стимулирующего Т-лимфоциты и повышающего их чувствительность к митогенам (Gegu, Handschumacher, 1974). Это вещество получило название фактора, повышающего активность лимфоцитов (ЛАФ). Продукция

ЛАФ макрофагами может быть увеличена специальными митогенами, например конканавалином А или липополисахаридом. Введение мышам БЦЖ также увеличивает выработку его макрофагами (Mitchell et al., 1973).

Несмотря на то что стимуляция макрофагов сопровождается увеличением выработки ЛАФ так же, как и активацией лизосомных ферментов этих клеток, тем не менее прямой корреляции между выработкой ЛАФ и активностью лизосомных ферментов, по крайней мере кислой фосфатазы и β -глюкуронидазы, не обнаружено.

Культивирование макрофагов в среде, содержащей сыворотку новорожденных телят, приводит к активации их ферментных систем, но не сопровождается увеличением продукции ЛАФ. То же наблюдали *in vivo*: макрофаги, полученные после стимуляции мышей тногликолатом, обладали повышенным уровнем активности лизосомных ферментов, но низкой продукцией ЛАФ. На основании этих фактов сделано заключение, что освобождение макрофагами ЛАФ не связано непосредственно с тем состоянием, которое обычно понимают под термином «активация макрофагов» (Gery, Wiener, 1975). При активации макрофагов происходят такие резкие изменения в продукции синтезируемых ими веществ, что конкурирующие факторы (супрессоры и активаторы), вырабатываемые ими, могут маскировать истинную картину их синтеза (Calderon, Ulanue, 1975). Тем не менее не исключена возможность, что продукция ЛАФ обособлена от тех процессов, которые сопровождаются активацией лизосомных ферментов, или ЛАФ вырабатывает особая популяция макрофагов, гетерогенность которой, по-видимому, несомненна (Steinman, Cohn, 1974).

Относительно недавно было обнаружено, что лейкоциты человека при культивировании *in vitro* после стимуляции их ФГА выделяют в среду фактор, стимулирующий резорбцию остеокластов кости *in vitro*. Возможно, этот фактор вырабатывается лимфоцитами крови, потому что продуцирующие его клетки чувствительны к облучению. Однако очищенной от всех других клеток популяцией лимфоцитов фактор не вырабатывается. Для его продукции необходимо добавление в культуру макрофагов.

Создается впечатление, что синтез или освобождение этого фактора осуществляется только в результате определенных клеточных взаимодействий (Horton, 1974).

Изучение медиаторов, синтезируемых и выделяемых клетками, участвующими в иммунном ответе, еще только начато. Однако полученные факты убедительно свидетельствуют о том, что в кооперативных взаимодействиях, помимо мембранных контактных механизмов, участвует ряд растворимых факторов. Эти медиаторы регулируют и стимулируют жизненный цикл и функциональную активность всех типов клеток, взаимодействие которых обеспечивает выработку иммунитета в организме.

Большой интерес представляют кооперативные взаимодействия между иммунными Т-клетками и макрофагами в разрешающей фазе иммунных реакций.

Показано, что приобретенная резистентность к внутриклеточным паразитам обеспечивается двухступенчатым механизмом: а) иммунными Т-клетками, вступающими в контакт со специфическим антигеном, в результате чего они выделяют различные медиаторы, активирующие макрофаги; б) активированные как живыми, так и неживыми агентами макрофаги приобретают повышенную неспецифическую бактерицидность по отношению к внутриклеточным паразитам и цитотоксичность к клеткам с ненормальным ростом (Hibbs et al., 1972).

Представление об эффекторной роли макрофагов в различных видах клеточного иммунитета, включая трансплантационный и противоопухолевый иммунитет, высказывалось многими исследователями (Pearssall, Weiser, 1970). Тем не менее, оценивая данные о специфической цитотоксичности макрофагов, нужно всегда иметь в виду, что Т-клетки тоже способны прилипать к стеклу и их нелегко отделить от макрофагов. Evans и Alexander (1972) различают две категории макрофагов: а) так называемые вооруженные макрофаги, проявляющие специфическую цитотоксичность по отношению к иммунным клеткам-мишеням, и б) активированные макрофаги, которые токсичны по отношению к различным клеткам-мишеням.

Это заключение основано на собственных данных авторов, свидетельствующих о том, что макрофаги, взятые от мышей, иммунизированных опухолевыми клетками, приобретают способность угнетать рост клеток этой опухоли *in vitro*. Это действие специфично, потому что макрофаги от мышей, иммунизированных аллогенными опухолевыми клетками, не действуют на клетки сингенной опухоли и наоборот. Цитотоксичность макрофагов исче-

зает после инкубации (24—48 ч) *in vitro* со специфическими опухолевыми клетками. Для проявления специфической цитотоксичности необходим прямой контакт с клетками-мишенями.

Специфичность угнетения роста опухолевых клеток «вооруженными» макрофагами позволяет предполагать наличие каких-то распознающих структур на наружной цитомембране макрофагов. Однако природа их неясна.

Некоторые исследователи полагают, что специфическая цитотоксичность «вооруженных» макрофагов объясняется их способностью связывать цитофильные антитела. На поверхности макрофагов, как указывалось ранее, имеются рецепторы для Fc-фрагмента IgG-молекул. Как всегда, в этих случаях энергия связывания IgG-антител резко возрастает при их комплексовании с антигеном. Действительно, цитофильные антитела были обнаружены на поверхности «вооруженных» макрофагов, однако их обработка антииммуноглобулиновой сывороткой не угнетала способности макрофагов тормозить рост клеток-мишеней (Evans, Alexander, 1972). Кроме того, лимфоциты от гипериммунизированных животных не способны сами по себе тормозить рост клеток сингенной опухоли *in vitro*, но индуцируют эту способность у нормальных макрофагов при инкубации с ними. Индукция происходит только при прямом контакте иммунных лимфоцитов с нормальными макрофагами. Специфическая цитотоксичность не передается нормальным макрофагам филтратами культур иммунных лимфоцитов. Однако после инкубации селезеночных клеток от иммунных животных со специфическим антигеном они выделяют в среду вещество, которое сообщает специфическую цитотоксичность нормальным макрофагам. Это вещество было названо фактором вооружения (arming) макрофагов (МАФ). Этот фактор вырабатывается иммунными Т-клетками и состоит из двух компонентов: один с относительной молекулярной массой более чем 300 000, второй — 50 000—60 000. Высказаны предположения, что МАФ имеет отношение к МИФ или специфическому рецептору Т-лимфоцитов (Cerottini, Brunner, 1974).

Интересно, что кортикостероиды *in vivo* и *in vitro* не угнетают выработку МАФ лимфоцитами, но изменяют чувствительность макрофагов к его действию (Dimitriu, 1976).

Ряд веществ, главным образом обладающих адьювантным действием (эндотоксины грамотрицательных бактерий, нуклеиновые кислоты), при контакте с нормальными макрофагами *in vitro* повышают их неспецифическую цитотоксичность. Такую же цитотоксичность приобретают макрофаги *in vivo* в процессе хронической инфекции простейшими или при внутриклеточном развитии бактерий, или после инъекции адьюванта Фрейнда. Эта цитотоксичность проявляется только по отношению к клеткам с нарушенным циклом деления, в том числе и опухолевым.

Как видно из изложенного выше, до сих пор нет ясности в вопросе о том, какую роль в проявлениях клеточного иммунитета играют прямые контакты с иммунными Т-лимфоцитами и какую выделяемые ими факторы, действующие на макрофаги и другие клетки.

Эти наблюдения привлекают в последние годы пристальное внимание, потому что свидетельствуют о важной роли макрофагов в очищении организма от клеток с нарушенными параметрами роста.

Исходя из изложенных выше данных, следует подчеркнуть, что уничтожение опухолевых клеток макрофагами от иммунизированных этими клетками животных происходит в результате специфических иммунологических взаимодействий, за которыми следует неспецифическая реакция умерщвления клеток (так называемый киллерный эффект).

Макрофаги, специфически цитотоксичные по отношению к сингенным опухолевым клеткам, можно получить тремя путями: 1) из брюшной полости иммунизированных данной опухолью мышей; 2) при контакте нормальных макрофагов с клетками селезенки от гипериммунных мышей; 3) путем «вооружения» нормальных макрофагов, инкубируя их *in vitro* с бесклеточной средой, полученной после культивирования клеток селезенки или лимфоцитов от иммунных мышей в присутствии специфического антигена (Evans, Alexander, 1972; Piesseur et al., 1975).

Разрушение клеток-мишеней происходит в результате прямого контакта с «активированными» макрофагами и является неспецифическим. При этом фагоцитоз является гораздо более поздней стадией реакции и наблюдается только после гибели клеток-мишеней.

По-видимому, существуют большие различия между специфической цитотоксичностью макрофагов по отно-

шению к опухолевым клеткам и участием макрофагов в противоопухолевом иммунитете как таковом. При изучении противоопухолевого иммунитета эти соображения заставляют принимать во внимание свойства и особенности клеток МФС главным образом в самой опухоли. Имеются указания на то, что эффекторныe клетки внутри самой опухоли иногда не соответствуют цитологии иммунологических сдвигов, которую можно обнаружить в селезенке и лимфатических узлах этих же животных (Haskill et al., 1976).

Макрофаги, выделяемые из регрессирующих опухолей (типа саркомы Молони) при культивировании их *in vitro* выделяют в среду растворимый, диализуемый и термостабильный фактор, угнетающий включение тимидина в клетки (Упанов, 1976; Russell et al., 1977).

Можно с большой дозой вероятности предположить, что сочетание влияния этого фактора с четко обнаруживаемым цитотоксическим действием макрофагов на опухолевые клетки обеспечивает макрофагам возможность участвовать в регрессии опухолей, подобно тому как это происходит при комплементзависимом антигенспецифичном действии Т-лимфоцитов.

Помимо этого, в последнее время появились данные, что предшественники Т-клеток — киллеров не пролиферируют или не дифференцируются в эффекторные клетки в отсутствие макрофагов. Об этой функции макрофагов свидетельствуют наблюдения, что при полном удалении из культур прилипающих клеток Т-клетки не приобретают цитотоксических свойств под влиянием 2-меркаптоэтанола, в то время как ни В-клетки, ни гранулоциты, ни кортизонустойчивые тимоциты не нужны для индукции цитотоксических свойств с помощью 2-меркаптоэтанола.

Было доказано, что эффект оказывает растворимый фактор, выделяемый макрофагами. Следовательно, даже в том случае, когда сами макрофаги не являются эффекторными клетками, они необходимы в индуктивной фазе процесса (Ygrashi et al., 1977).

При введении мышам кополимера пирана, оказывающего цитотоксическое действие на клетки опухоли *in vitro*, значительно повышается резистентность животных к пересадке опухолей *in vivo*. При этом через 6 дней после введения пирана в месте подсадки опухоли и вокруг нее можно обнаружить и выделить большое число макрофагов, ингибирующих рост опухоли (Schultz et al., 1976).

Почти одновременно с открытием способности макрофагов приобретать специфическую цитотоксичность появились наблюдения, имеющие, вероятно, большое общепатологическое значение (Hibbs et al., 1972). Обнаружено, что мыши, хронически зараженные *Toxoplasma gondii*, *Besnoitia jellisoni* или БЦЖ, обладают повышенной резистентностью к возникающим спонтанно или трансплантированным опухолям. Эта же группа авторов вскоре показала, что не только хронические инфекции, но и некоторые адъюванты (например, полный адъювант Фрейнда или уже упоминавшийся кополимер пирана) активируют макрофаги, которые делаются цитотоксичными для любых клеток с ненормальными характеристиками роста *in vitro*. Приобретаемая в результате активации цитотоксичность неспецифична, но для ее возникновения в макрофагах должны произойти какие-то существенные функциональные изменения. Во всяком случае введение мясо-пептонного бульона или тногликола в брюшную полость животных для стимуляции притока макрофагов оказывается недостаточным для сообщения им неспецифической цитотоксичности.

Активация макрофагов сопровождается возрастанием неспецифической бактерицидности по отношению к внутриклеточным паразитам *in vitro*. Вероятно, агенты, «активирующие» макрофаги, стимулируют неспецифическую резистентность не только к микробной инфекции, но и к росту опухолей (North, Kirstein, 1977).

Эффекторное звено цитотоксического действия «активированных» макрофагов в иммунологическом смысле неспецифично, потому что идет не по линии распознавания чужеродных антигенов на клетках-мишенях, а по линии распознавания изменений свойств, связанных с ростом клеток.

«Активированные» макрофаги тонко отличают нормальные клетки от клеток с измененными параметрами роста, потому что разрушаются ими только последние. Это наводит на мысль, что способность макрофагов приобретать специфическую и главным образом неспецифическую цитотоксичность представляет собой важный механизм в гомеостатическом контроле нарушений клеточного роста в организме в условиях нормы (Hibbs, 1976).

Исследование механизмов, вовлекаемых в активацию макрофагов, свидетельствует о том, что в этом процессе

не малую роль играют ферменты лизосом. Во-первых, содержащее вторичных лизосом активированных макрофагов можно обнаружить внутри клеток-мишеней. Во-вторых, проникновение этого материала связано с разрушением клеток-мишеней. Возможно, что ферменты лизосом «активированных» макрофагов являются конечными молекулами — эффекторами клеточной деструкции в цитотоксической системе.

В любом случае несомненным является местная или общая дестабилизация поверхностных мембран обоих видов, участвующих в реакции клеток.

Вероятно, нормальные макрофаги не обладают цитотоксическими свойствами, потому что их наружная цитомембрана устойчива и не принимает участия в реакциях слияния, необходимых для гетеролизиса клеток-мишеней. Аналогично этому «активированные» макрофаги не способны оказать значительного действия на нормальные клетки со стабильной мембраной (Hibbs, 1976).

Угнетение макрофагами опухолевого роста происходит за счет угнетения образования бластов. В этом процессе участвуют какие-то молекулы, расположенные на поверхности макрофагов, так как обработка клеток ферментами до добавления их в культуру уменьшает их способность угнетать рост опухоли (Baird, Kaplan, 1977).

В настоящее время еще далеко не расшифровано участие макрофагов в гомеостатическом контроле за нормальным клеточным составом организма. Однако изложенные выше факты заставляют внимательно исследовать все процессы, могущие вскрыть механизм этого контроля.

В этом аспекте представляют интерес сведения об общности механизмов естественной резистентности к инфекциям и неоплазмам. Активированные пираном или кориннебактериями КПЭ приобретают как противовирусную, так и противоопухолевую активность (Moghan et al., 1977), так же как преинкубация макрофагов с любым перевариваемым агентом увеличивает их бактерицидность по отношению к различным микроорганизмам (Л. Г. Зайцева и др., 1977).

СПОСОБЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ МАКРОФАГОВ

Действие адъювантов на клетки мононуклеарной фагоцитирующей системы

Многообразие функций клеток МФС и их роль в сохранении гомеостаза, в естественном и приобретенном иммунитете организма позволяет надеяться, что, поняв механизм регуляции их жизнедеятельности, можно овладеть путями регуляции не только специфического, но и естественного иммунитета.

Основным способом неспецифической регуляции приобретенного иммунитета является использование адъювантов, механизм действия которых до сих пор окончательно не выяснен. К настоящему времени накопились факты, свидетельствующие о том, что вызываемая адъювантами стимуляция иммуногенеза связана в значительной степени с их действием на клетки МФС. Вначале основанием для такого предположения послужили наблюдения, указывающие на то, что некоторые адъюванты вызывают в месте введения отчетливо выраженную воспалительную реакцию или инфильтраты, содержащие большое количество клеток МФС, в том числе активированных макрофагов. Еще Freund (1947, 1956) высказывал мнение, что адъюванты могут влиять на процессы захвата, переработки и распространения антигена.

Значение местной воспалительной реакции в неспецифической стимуляции иммуногенеза было подтверждено и изучено рядом авторов (А. А. Воробьев, 1958; Г. В. Шумакова, Т. Е. Новикова, 1965; Ю. Г. Шубик, 1966; Л. С. Сафонова, Б. Г. Аветикян, 1966; А. А. Воробьев, Н. Н. Васильев, 1969). Установлено, что выраженность воспалительной реакции, вызываемой различными дозами одного и того же агента, влияет на его адъювантное действие. Необходимо какой-то оптимальный уровень воспаления, чтобы оно оказало благоприятное влияние на иммуногенез. Слабая воспалительная реакция не сказывается на уровне антителообразования, а чрезмерная — может привести к его угнетению (А. А. Воробьев, 1958). Большинство авторов считают, что главную роль в этом играет клеточ-

ная инфильтрация в месте введения адьюванта, поскольку клетками МФС осуществляются захват и переработка антигена (Г. А. Гурвич, Г. В. Шумакова, 1960; Р. А. Салтыков и др., 1961).

Иммунологический процесс представляет собой сложную цепь событий, начинающуюся с поглощения и переработки антигена клетками МФС и заканчивающуюся синтезом новых белковых молекул с функцией антител. Между этими крайними точками происходят многообразные изменения гомеостаза, включающие в себя различные стадии воспалительного процесса с характерной для него продукцией веществ, выделяемых погибающими клетками (серотонин, гистамин, лейкотаксин и другие факторы воспаления, пирогены, С-реактивный белок и т. д.). В течение этого периода происходит интенсивная пролиферация и дифференциация клеток, активируется синтез белка как специфического (антитела), так и неспецифического.

В настоящее время накопилось достаточно сведений о том, что стимуляция иммуногенеза адьювантами происходит в результате вмешательства в самые начальные этапы антителообразования, предшествующие образованию специфической молекулы антитела. Продуктивную фазу иммуногенеза адьюванты практически не стимулируют (И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1964, 1965; Э. Л. Хасман, 1964).

В большинстве обнаруживаемых патофизиологических сдвигов, сопровождающих начальные этапы антителообразования, существенную роль играют клетки МФС, поскольку они синтезируют и выделяют большинство из перечисленных медиаторов, участвующих в формировании воспалительного процесса.

В ранее выполненных в нашей лаборатории исследованиях было установлено, что эндотоксин *S. typhi* abd. и адьювант Фрейнда в первые часы после введения стимулируют синтез белка в организме и оказывают выраженное пирогенное действие (И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1964; И. Я. Учитель и др., 1965).

На рис. 17 представлены данные об изменениях гомеостаза и антителообразования, вызываемых введением животным гомологичного эндогенного пирогена, выделенного из клеток перитонеального экссудата одновременно с небольшой дозой тифозной вакцины (5×10^8 микробных тел на кролика). Как видно из приведенных дан-

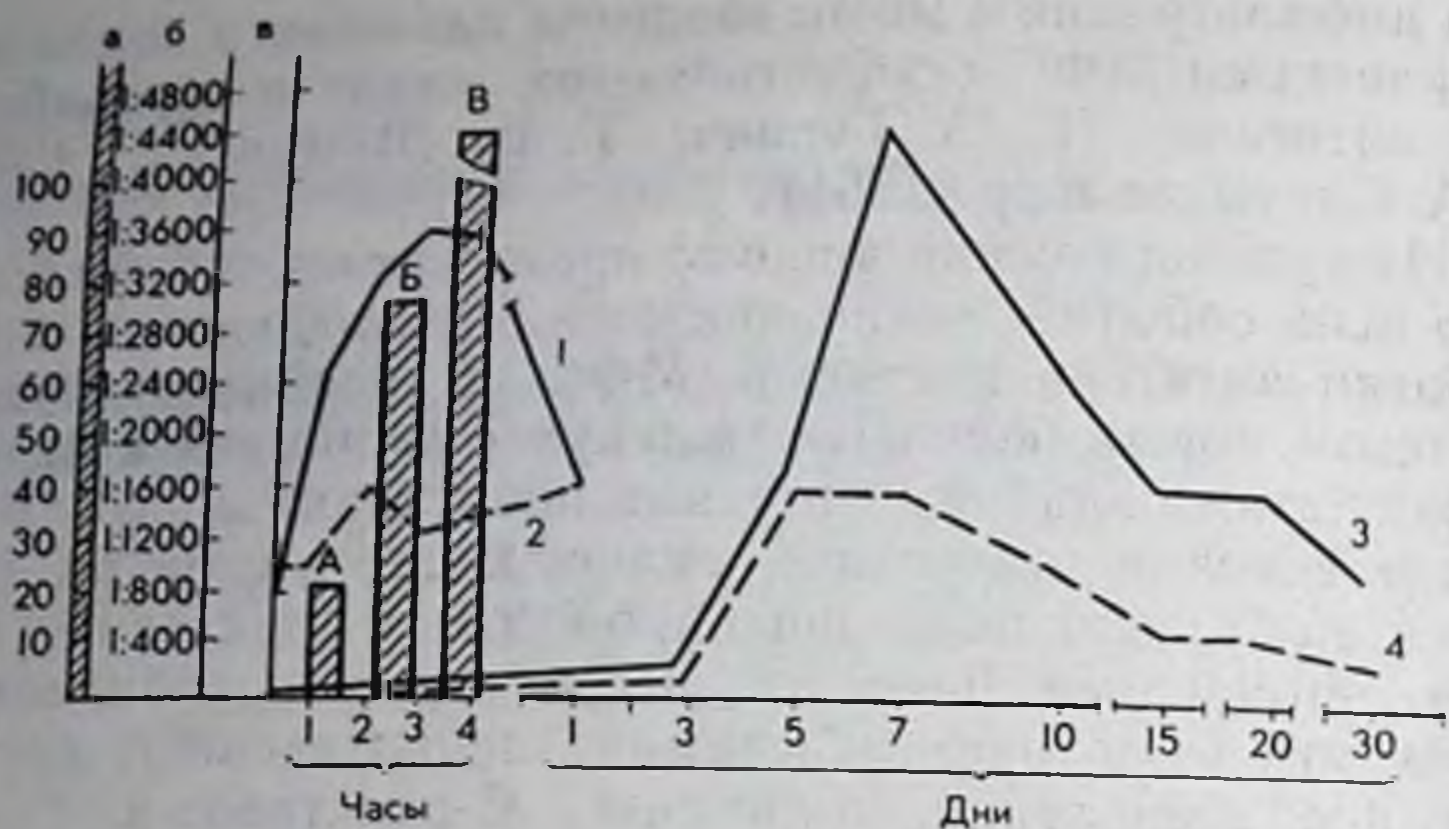


Рис. 17. Изменения интенсивности неспецифического и специфического синтеза белка под влиянием эндогенного пирогена, выделенного из клеток перитонеального экссудата.

А — селезенка; Б — надпочечная железа; В — регионарный лимфатический узел; 1 — температура тела кроликов, получивших эндогенный пироген; 2 — температура тела контрольных кроликов; 3 — титр агглютининов у кроликов, получивших вакцину и эндогенный пироген; 4 — титр агглютининов у кроликов, получивших одну вакцину.

На оси ординат — активация синтеза белка в процентах (а), титр агглютининов (б), температура (в); на оси абсцисс — время.

ных, эндогенный пироген, интенсивно вырабатываемый КПЭ после введения адьювантных веществ, будучи введенным в гомологичный организм, вызывает эффект, аналогичный действию адьювантов, спровоцировавших его усиленную продукцию.

Поскольку повышение температуры тела и воспалительная реакция в целом часто сопровождаются появлением в крови ранее отсутствующих белков, в специальной серии экспериментов были изучены изменения гомеостаза, вызываемые введением очищенного С_х-реактивного белка, появляющегося в сыворотке кроликов после введения адьювантов (эндотоксина *S. typhi* abd., адьюванта Фрейнда). Показано, что С_х-реактивный белок — физиологически активное вещество, усиливающее подвижность клеток МФС, стимулирующее синтез белка и вызывающее образование в организме больших количеств С_х-реактивного белка. При внутривенном введении кроликам гомологичного С_х-реактивного белка (1 мг) одновременно с подкожным введением 100 мкг полного антигена Буавена или внутривенном введении 50 мг гамма-глобулина лошади С_х-реактивный белок стимулирует образо-

вание антител к этим антигенам, т.е. он проявляет адьювантное действие (Э. Л. Хасман и др., 1968; И. Б. Фрянинова, И. Я. Учитель, 1969). Эти исследования позволили нам заключить, что неспецифическая стимуляция антителообразования осуществляется адьювантами в значительной мере опосредованно через эндогенные факторы (пирогены, С-реактивные белки), которые начинают интенсивно синтезироваться и проявлять свое действие в организме в ответ на введение адьювантов (И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1965).

Активация адьювантами клеточного метаболизма в ряде случаев может быть связана с их цитотоксическим действием (Johnson et al., 1968), однако это не является необходимым условием для проявления адьювантного действия, так как детоксицированные эндотоксины не теряют своих адьювантных свойств (Johnson, Nowotny, 1964). Во всяком случае несомненно, что адьюванты резко меняют функциональную активность клеток МФС — первых клеток, реагирующих на их введение (И. Я. Учитель и др., 1975). Как всегда, для проявления стимулирующего действия любого из адьювантов нужны оптимальные соотношения между ним и вводимым антигеном как по количеству, так и по временным соотношениям между их введением.

Как уже упоминалось, адьюванты наиболее активны при введении их одновременно с антигеном. При предварительном введении адьювантов может наблюдаться подавление иммунного ответа, которое может объясняться чрезмерным стимулированием макрофагов, в результате чего антиген переваривается ими до неиммуногенных форм (Ehrlengleich, Cohn, 1969), или, наоборот, как полагают некоторые авторы, блокадой клеток ретикулоэндотелиальной системы каплями масла, препятствующей захвату и перевариванию антигена (Huard, Siebeling, 1971). Макрофаги поглощают адьювантные вещества, как и любой чужеродный агент, попавший в организм парентеральным путем. Это дало основание для предположения о возможности транспортировки макрофагами адьювантных веществ к иммунокомпетентным клеткам и непосредственной стимуляции последних (Ulanue et al., 1969).

Несмотря на многочисленные доказательства, свидетельствующие об участии клеток МФС в реализации адьювантного действия, практически до настоящего вре-

мении не было ясно, как именно влияют адьюванты на функцию макрофагов и как это сказывается на захвате и катаболизме антигена.

После открытия de Duve лизосомного аппарата появились сообщения о связи между способностью веществ повышать проницаемость лизосомных мембран клеток МФС и их адьювантным действием (Allison, 1968; Rhodes, 1970; Spitznagel, Allison, 1970, и др.). По мнению Dresser (1968), стимуляция деления иммунокомпетентных клеток происходит в результате повреждения мембран лимфоцитарных лизосом.

Повышение активности или содержания гидролаз в перитонеальных и альвеолярных макрофагах после введения животным различных адьювантных веществ было описано рядом авторов (Weisswann, Thomas, 1962; Cohn, Wiener, 1963; Munder et al., 1969).

В настоящее время трудно сказать, какая степень переваривания антигена наиболее необходима для проявления его иммуногенности. Возможно, особенно в случае корпускулярных антигенов, что выделение устойчивой к перевариванию иммуногенной субстанции является функцией лизосомных ферментов. Во всяком случае изменение под влиянием адьювантных функций лизосомного аппарата макрофагов, включая в это понятие активность ферментов и состояние мембран лизосом, может, несомненно, иметь большое значение в регуляции процессов естественного и приобретенного иммунитета.

Собственные исследования и анализ обширной литературы, посвященный неспецифической стимуляции антителообразования, дают основание считать, что адьювантные вещества «вмешиваются» в процессы, происходящие на начальных этапах антителиогенеза и, возможно, связанные с активацией обмена в клетках МФС. В нашей лаборатории было проведено исследование, посвященное изучению влияния различных по происхождению и физико-химической природе веществ (полный адьювант Фрейнда, эндотоксин, сульфат кадмия и хлорид железа) на связанное с макрофагами звено иммуногенеза, в частности на захват и катаболизм антигена макрофагами, на его персистенцию в этих клетках, комплексование антигена с лизосомной фракцией и РНК макрофагов и влияние адьювантов на функцию лизосомного аппарата макрофагов и клеток селезенки (М. Е. Бубашвили, 1973). Адьюванты различного происхождения были вы-

браны с целью выяснить, существует ли общее звено в механизме их действия или механизм неспецифической стимуляции многообразен. Для ответа на вопрос, связана ли вызываемая изучаемой адьювантами неспецифическая стимуляция иммуногенеза с изменением условий захвата или переваривания антигена, было исследовано их действие на захват двух корпускулярных антигенов (эритроцитов барана, меченных ^{51}Cr , и тифозной вакцины, меченной ^{14}C -ацетатом натрия). Исследовали их захват макрофагами *in vivo* и *in vitro* с учетом распределения антигена по субклеточным фракциям клеток МФС *in vivo*.

Ранее некоторые авторы объясняли адьювантный эффект бактериальных эндотоксинов их способностью первично подавлять, а затем стимулировать фагоцитарную активность макрофагов (Freedman, Sultzer, 1964; Floer-sheiva, 1969), хотя, по данным Spitznagel и Allison (1970), обработка макрофагов липополисахаридом не увеличивала захвата ими ^{131}I -альбумина бычьей сыворотки, а способствовала сохранности его в макрофагах.

Наши эксперименты по изучению влияния адьювантов на захват и судьбу меченого антигена *in vivo* показали, что все исследованные нами адьюванты ускоряют катаболизм антигена и одновременно пролонгируют его существование в фагоизосомной фракции макрофагов (рис. 18). Через 72 ч после введения ^{51}Cr -эритроцитов барана макрофаги контрольных мышей, в том числе и их лизосомная фракция, содержат очень небольшие количества меченого антигена (см. рис. 18), в то время как в лизосомах макрофагов животных, обработанных адьювантами, его количество в 9—16 раз больше. Были выявлены некоторые особенности в действии разных адьювантных веществ.

Эндотоксин и адьювант Фрейнда усиливали захват меченого антигена макрофагами, тогда как сульфат кадмия понижал интенсивность фагоцитоза. Адьюванты способствовали более широкому распространению меченого материала по ретикулоэндотелиальной системе. Предположения об усилении распространения антигена по организму некоторые исследователи высказывали и раньше (Gillete, Lance, 1971). Наши опыты доказывают это.

Из рис. 19 видно, что мы обнаруживали радиоактивный антиген в лизосомных фракциях селезенки мышей, получавших адьюванты даже через 3 нед после введения

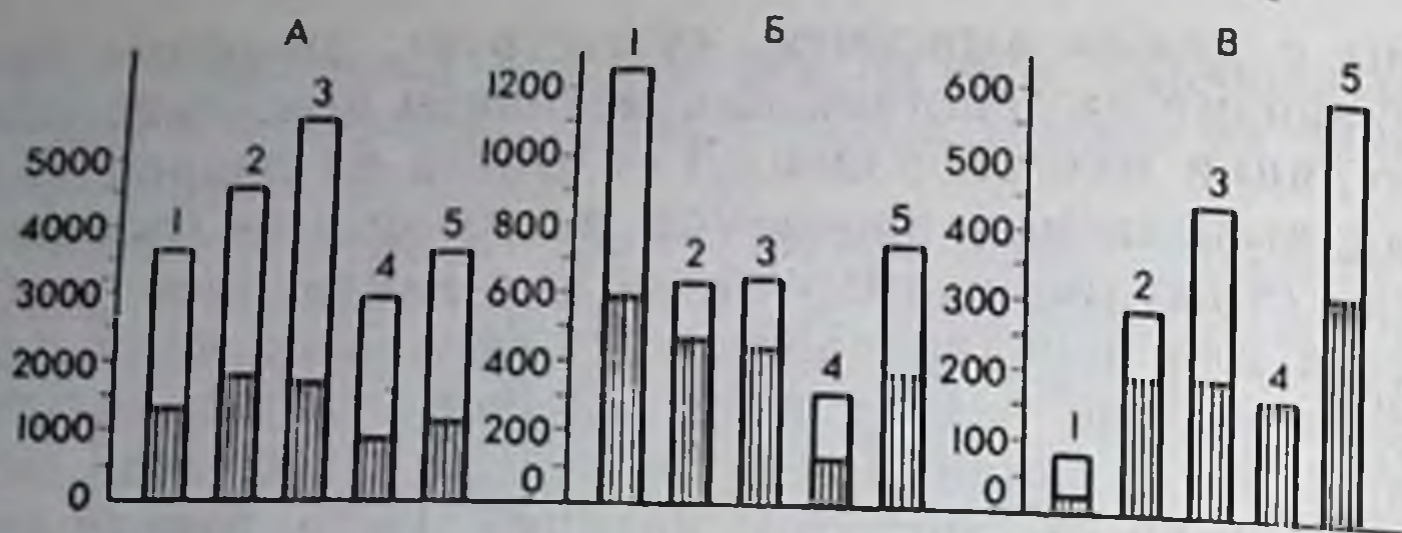


Рис. 18. Влияние адъювантов на поглощение ^{51}Cr -эритроцитов барана макрофагами *in vivo* (имп/мин/мг белка).

А — 30 мин; Б — 24 ч; В — 72 ч; 1 — контроль; 2 — адъювант Фрейнда; 3 — эндотоксин; 4 — сульфат кадмия; 5 — хлорид железа. Заштрихована лизосомная фракция.

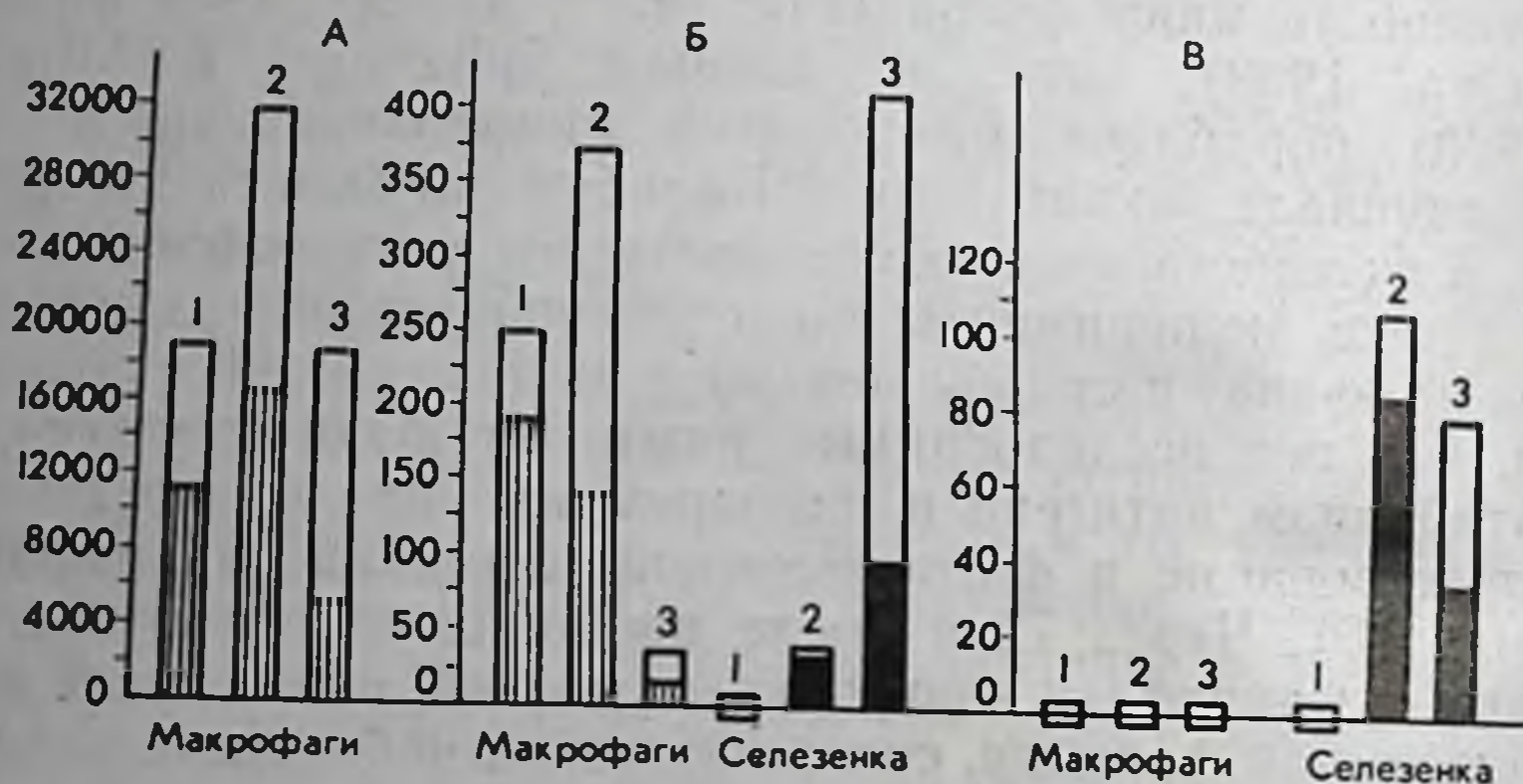


Рис. 19. Захват и распределение по субклеточным фракциям ^{14}C -тифозной вакцины (имп/мин/мг белка).

А — 30 мин; Б — 8-й день; В — 21-й день; 1 — контроль; 2 — эндотоксин; 3 — сульфат кадмия. Заштрихована лизосомная фракция макрофагов, зачернена — лизосомная фракция клеток селезенки.

антигена, в то время как у животных, которым вводили один антиген, обнаружить его в клетках селезенки в ощутимых количествах не удавалось.

На основании проведенных экспериментов мы пришли к заключению, что все исследованные адъюванты, несмотря на различное происхождение и физико-химическую природу, способствуют аккумуляции антигенов в фаголизосомной фракции макрофагов и клеток селезенки. Даже сульфат кадмия, который не стимулировал

фагоцитоз, вызывал аккумуляцию антигена в лизосомах клеток МФС.

Адьюванты не влияли на поступление меченого антигена в печень. Во всех группах подопытных животных обнаруживали одинаковые количества меченого антигена, связанного с лизосомной фракцией печени. Адьюванты не увеличивали захват меченых ^{51}Cr -эритроцитов барана макрофагами *in vitro* при добавлении их непосредственно в культуру макрофагов. Однако макрофаги, взятые от животных, обработанных адьювантами, определенное время сохраняют измененную способность к захвату антигена *in vitro*. Макрофаги, полученные у животных, которым адьюванты вводили за 30 мин, обладали пониженной способностью к фагоцитозу *in vitro*, тогда как макрофаги, взятые у мышей, стимулированных адьювантами за 24 ч до получения макрофагов, обладали повышенной способностью к поглощению эритроцитов барана *in vitro*.

На основании этих экспериментов можно предположить, что стимуляция адьювантами поглотительной способности макрофагов длится определенный отрезок времени, так как макрофаги, взятые у животных через 3 дня после введения им адьювантов, не отличаются по своей функциональной активности от макрофагов контрольных животных.

Обнаружив, что исследованные нами адьюванты способствуют задержке и накоплению антигена в лизосомной фракции макрофагов и клеток селезенки, мы решили проверить иммуногенность этого антигена. Учитывая полученные нами ранее данные, что антиген, связанный с фракциями лизосом и РНК, иммуногенен в равной степени (И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, 1969), в этих опытах исследовали также влияние адьювантов на иммуногенность комплекса АГ — РНК, полагая, что ускорение или увеличение связывания антигена с РНК должно отразиться на иммуногенности их комплекса. Однако фракции РНК, выделенные из макрофагов как контрольных, так и опытных групп животных, оказались иммуногенными в равной степени. Вероятно, на комплексообразование антигена с РНК макрофагов или клеток селезенки адьюванты не влияют. Интересно, что под влиянием эквимольных комплексов поли: А — поли: У, повышающих уровень как 19 S, так и 7 S антител, захват антигена макрофагами не усиливался, но стимулировался синтез РНК, и РНК, вы-

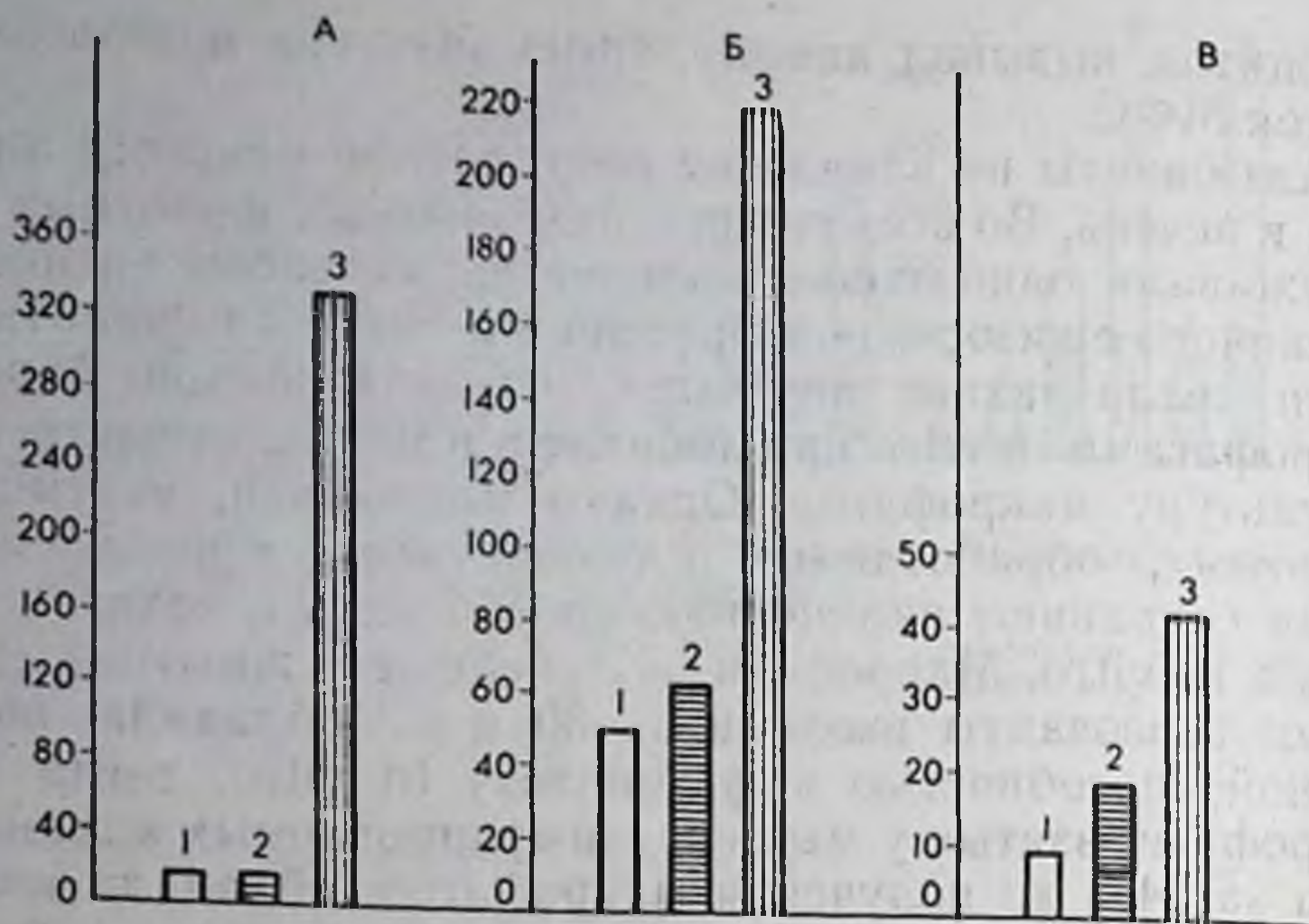


Рис. 20. Иммуногенность лизосомной фракции, выделенной из селезенки мышей в разные сроки после иммунизации их 3×10^8 эритроцитов барана одновременно с адьювантами (количество бляшек на 1 млн. клеток селезенки).

А — 24 ч; Б — 72 ч; В — 5-й день; 1 — контроль; 2 — эндотоксин; 3 — сульфат кадмия.

деленная из макрофагов, вызывала антителообразование при добавлении ее к клеткам сингенных мышей *in vitro* (Johnson et al., 1971).

Из данных, приведенных на рис. 20, видно, что во всех случаях иммуногенность антигена, связанного с фаголизосомной фракцией макрофагов и клеток селезенки, была выше, если антиген был введен одновременно с адьювантами. Вероятно, повышенная иммуногенность этих фракций объясняется накоплением в них под влиянием адьювантов большего количества антигена. Под влиянием эндотоксина основная масса иммуногенного материала оказывается связанной с лизосомной фракцией макрофагов в период исследования (24, 72 ч и 5-й день), в то время как сульфат кадмия способствует накоплению иммуногенных частей антигена в лизосомах селезенки. Установив, что под влиянием адьювантов происходит накопление антигена в фаголизосомных фракциях макрофагов и селезенки, мы решили выяснить, меняются ли под влиянием адьювантов биохимические функции лизосомного аппарата клеток МФС.

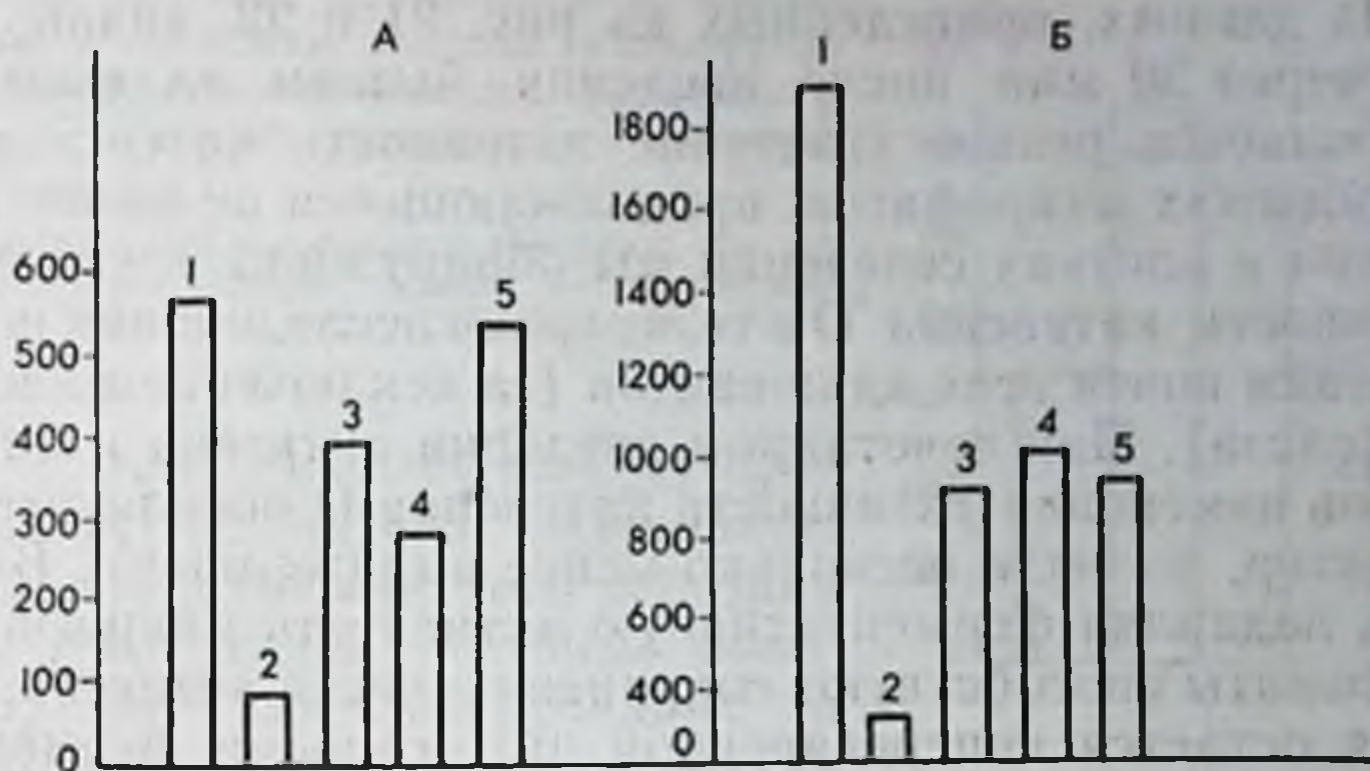


Рис. 21. Активность катепсина D в макрофагах через 30 мин после введения адъювантов (мкг тирозина на 1 мг белка).

А — цитоплазма; Б — лизосомы; 1 — контроль; 2 — адъювант Фрейнда; 3 — эндотоксин; 4 — сульфат кадмия; 5 — хлорид железа.

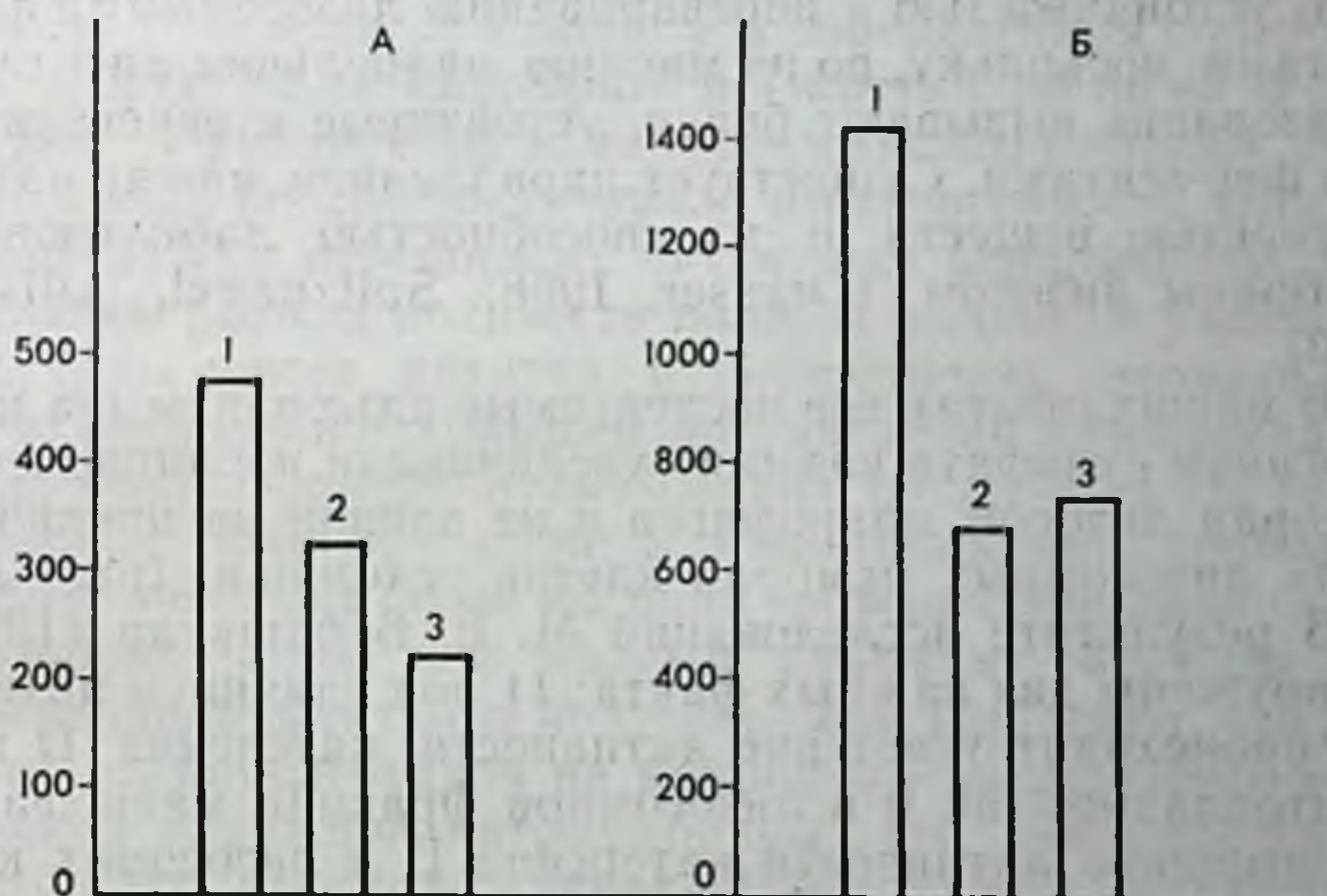


Рис. 22. Активность катепсина D в макрофагах через 3 ч после введения адъювантов (мкг тирозина на 1 мг белка).

А — цитоплазма; Б — лизосомы; 1 — контроль; 2 — эндотоксин; 3 — сульфат кадмия.

По данным литературы, в течение первых 2 дней после введения полного адъюванта Фрейнда происходит понижение активностей β -глюкуронидазы и катепсина D в лизосомах селезенки, восстановление которых происходит не ранее чем через 4 дня (Lee et al., 1970).

Из данных, приведенных на рис. 21 и 22, видно, что уже через 30 мин после введения мышам адьювантов наблюдается резкое угнетение активности катепсина D в лизосомах макрофагов, продолжающееся не менее 3 ч. Однако в клетках селезенки мы обнаружили повышение активности катепсина D в те же сроки исследования после введения почти всех адьювантов (за исключением хлорида железа). При сочетанном введении антигена и адьювантов изменения активности катепсина D носили тот же характер, но были несколько менее выраженными. Вероятно, подавляя ферментативную активность макрофагов, адьюванты способствуют сохранению части антигена, которая остается непереваренной лизосомными ферментами макрофагов и с которой связана выработка антител. Интересно в связи с этим вспомнить предположение некоторых авторов (Campbell, Garvey, 1963; Ryan, Lee, 1970; П. Грабар, 1976) о связи между иммуногенностью белка и его устойчивостью к перевариванию лизосомными ферментами, поскольку, по их мнению, наибольшее антителообразование вызывают белки, устойчивые к перевариванию ферментами. Существует параллелизм между адьювантностью веществ и их способностью лабильзовать мембраны лизосом (Dresser, 1968; Spitznagel, Allison, 1970).

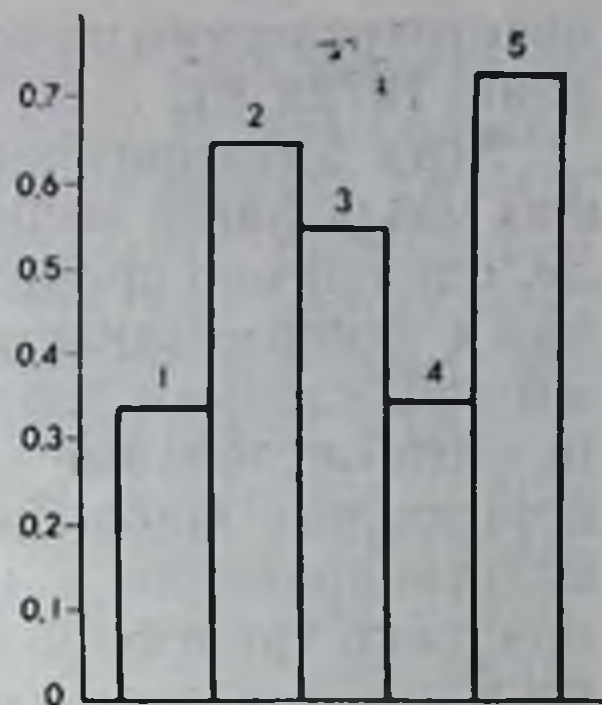
В наших опытах все исследуемые адьюванты (за исключением сульфата кадмия) увеличивали проницаемость мембран лизосом макрофагов и не влияли на проницаемость лизосомных мембран клеток селезенки (рис. 23).

В результате исследований М. Е. Бубашвили (1973) обнаружены два важных факта: 1) под влиянием антигенов происходит угнетение активности катепсина D как в цитоплазме, так и в лизосомной фракции макрофагов и повышение активности катепсина D в лизосомах клеток селезенки; 2) повышение проницаемости лизосомных мембран макрофагов под влиянием адьювантов может играть большую роль в реализации их адьювантного действия. Полученные материалы позволяют говорить не только о том, что адьюванты способствуют более длительному хранению антигена в организме, но и устанавливают его локализацию и механизмы, приводящие к задержке иммуногенных компонентов антигена.

Одной из главных точек приложения адьювантов различного происхождения и природы следует считать лизосомный аппарат клеток МФС, главным образом макрофа-

Рис. 23. Влияние адьювантов на проницаемость мембран лизосом макрофагов (по отношению активности фермента в цитоплазме к его активности в лизосомной фракции).

1 — контроль; 2 — адьювант Фрейнда; 3 — эндотоксин; 4 — сульфат кадмия; 5 — хлорид железа.



гов. К аналогичному выводу пришли исследователи, изучавшие механизм адьювантного действия полинуклеотидов, которые показали, что комплексообразование *in vitro* эквимоллярных количеств комплементарных гомополимеров (таких, как полиадениловая и полиуридиновые кислоты) увеличивает их адьювантность, вероятно, повышая их устойчивость к ферментному перевариванию (Braun et al., 1971). Установлено, что поли: А и поли: У в определенном соотношении действуют на макрофаги и Т-клетки, но не на В-лимфоциты. Прибавление к нормальным макрофагам антигена и этих кислот увеличивало иммуногенность этих макрофагов при переносе их интактным реципиентам. Под влиянием равных количеств поли: А и поли: У удавалось получить синтез антител у 5-недельных неонатально тимэктомированных мышей при введении адьюванта одновременно с эритроцитами барана (Johnson et al., 1971). Комплекс поли: А — поли: У в эквимоллярном соотношении обеспечивает более высокий уровень стимуляции антителообразования, чем полный адьювант Фрейнда или квасцы, но эффект этот кратковремен. Полагают, что действие полинуклеотидов на макрофаги заключается в изменении наружной цитомембраны, что сказывается на клеточных взаимодействиях. Обнаружены различия в действии полинуклеотидов на макрофаги разных видов животных. Однако эта разница скорее количественная, чем качественная, так как синтез белка усиливается под их влиянием в макрофагах разного происхождения, хотя и в разной степени (Morgell, 1971).

Большой интерес представляют наблюдения, свидетельствующие о том, что макрофаги, обработанные *in vitro* некоторыми адьювантными веществами (эндотоксин, РНК) или взятые от животных после введения последним адьюванта Фрейнда, выделяют фактор, обладающий

цитотоксическим действием на опухолевые клетки (Hibbs et al., 1972a, б).

Хотя цитотоксическое действие *in vitro* активированных макрофагов неспецифично в иммунологическом смысле, однако оно проявляется только по отношению к клеткам с ненормальными параметрами роста. Макрофаги от мышей, которым вводили адьювант Фрейнда, разрушают *in vitro* опухолевые клетки, но не действуют на культуру нормальных фибробластов. Как только при длительном культивировании в культуре фибробластов появляются признаки трансформации, они становятся чувствительными к цитотоксическому действию активированных макрофагов (Hibbs et al., 1972б).

Регуляция функции клеток моноклеарной фагоцитирующей системы антисыворотками к макрофагам или их субклеточным фракциям

Первые попытки использовать специфические антисыворотки для исследования роли разных типов клеток в иммунном ответе организма были предприняты еще И. И. Мечниковым в 1899 г. С тех пор антисыворотки к различным компонентам иммунной системы и других органов и тканей неоднократно привлекали внимание исследователей. В последние 10 лет резко возрос интерес к получению и исследованию механизма действия антилимфоцитарных сывороток (АЛС) в связи с широким использованием их в качестве иммунодепрессантов. По мере накопления данных о механизме действия АЛС стало очевидным, что при ее введении страдают не только клетки, проходящие дифференцировку в тимусе и обеспечивающие развитие трансплантационного иммунитета, но и клетки, участвующие в гуморальном ответе (Р. К. Андерсон, 1970; А. А. Вихман и др.; 1972; Chaffar, James, 1973, и др.).

Проявление иммунодепрессивного эффекта АЛС, главным образом во время начальных этапов антителообразования, заставляет предположить, что АЛС действуют не только на лимфоциты, но и на клетки МФС, поскольку функция макрофагов играет важную роль в развитии первичного иммунного ответа (Frei et al., 1965; Gallily et al., 1967; Argyris et al., 1969). При истощении АЛС клетками перитонеального экссудата титры их рез-

ко снижаются — примерно в 3—40 раз в зависимости от способа титрования (Л. Г. Зайцева, 1975). Однако попытки использовать антимакрофагальную сыворотку (АМС) в качестве иммунодепрессанта практически окончились неудачей. Рядом авторов показано, что для приготовления АЛС с хорошим иммунодепрессивным действием целесообразно использовать не целые лимфоциты, а их субклеточные фракции, главным образом мембраны (Lape et al., 1968; Fellenberg, 1971, и др). Возникло предположение, что использование субклеточных фракций макрофагов в качестве антигенов также может способствовать получению более эффективных антисывороток макрофагальной специфичности. Естественно, что в самые последние годы было предпринято несколько попыток получения антилизосомных сывороток и выяснения механизма их действия.

Получение антисывороток к различным субклеточным фракциям макрофагов и изучение их действия, помимо практических целей, могут способствовать выяснению роли макрофагов в иммунном ответе организма и дать исследователям способ регуляции их функций.

В обзоре, посвященном антилимфоцитарным антителам, Denman (1969) указывает на то, что они разрушают в основном длительно живущие малые лимфоциты, являющиеся инициаторами иммунологических реакций. Видимо, этим главным образом и объясняется иммунодепрессивное действие антилимфоцитарных антител, распространяющееся на первичный иммунный ответ и гиперчувствительность замедленного типа. На вторичный ответ антилимфоцитарные антитела оказывают очень незначительное действие. Но в то же время установлено, что вызванная АЛС иммуносупрессия связана с изменением функции МФС в результате антимакрофагальной активности, проявляемой АЛС (Marsman et al., 1970; Mucher et al., 1972; Tolnai, 1973). Тимоциты и лимфоциты были не способны восстановить иммунный ответ у обработанных АЛС крыс, в то время как введение макрофагов частично или полностью устраняло супрессию иммунного ответа, вызванную АЛС (Patterson et al., 1970).

Механизм действия АМС изучен мало, хотя следует предполагать, что действие ее направлено в основном на макрофаги. Еще менее исследован механизм действия антисывороток к субклеточным фракциям макрофагов. Известно, что АМС снижает количество макрофагов в пери-

тонеальном экссудате при внутрибрюшинном ее введении (Н. П. Лобасенко, Г. Г. Медведева, 1974), а также уменьшает количество моноцитов, циркулирующих в крови (Boros, Warron, 1971). При исследовании активности АМС *in vivo* было показано, что при внутрибрюшинном введении она вызывает агглютинацию перитонеальных макрофагов (Унапие, 1968; Boros, Warron, 1971; Isa, 1971).

Установлено, что АМС снижает фагоцитарную активность макрофагов (И. М. Поленова, 1971; Унапие, 1968; Gallily, 1971). Подавление фагоцитоза АМС, по мнению Schroit и Gallily (1974), может происходить двумя путями.

1. Конкурентное подавление. Антимакрофагальные антитела связываются с антигенными детерминантами, которые функционируют как фагоцитарные рецепторы.

2. Неконкурентное подавление, при котором антимакрофагальные антитела присоединяются к местам, отличным от фагоцитарных рецепторных участков.

Результаты их исследования с использованием *Shigella flexneri* в качестве конкурирующего агента показали, что антимакрофагальный глобулин прикрепляется к различным участкам наружной цитомембраны, подтверждая тем самым возможность неконкурентного подавления фагоцитоза. В подтверждение этого Schroit приводит данные Holland и соавт. (1972), показывающие, что обработка макрофагов антимакрофагальным иммуноглобулином не влияет на присоединение неопсонизированной *Mycoplasma pulmonis* к поверхности клетки: антимакрофагальный иммуноглобулин прикрепляется к мембранам макрофагов посредством Fab-фрагмента (Holland et al., 1972; Schroit, Gallily, 1974). Однако экспозиция макрофагов с АМС, а затем с эритроцитами барана, на которые нанесен кроличий гемолизин против эритроцитов барана, ослабляет прикрепление сенсibilизированных эритроцитов, что говорит о возможности конкуренции иммуноглобулинов в отношении места прикрепления к мембране макрофагов (Holland et al., 1972). Вероятно, существуют различия в механизме действия АМС на фагоцитоз опсонизированных и неопсонизированных антигенов. В первом случае АМС влияет на стадию прикрепления, а во втором — на стадию поглощения антигена макрофагом. По-видимому, конкурентное подавление фагоцитоза АМС происходит при поглощении опсонизированных

агентов, а в отсутствие опсопинов подавление осуществляется за счет присоединения антител к участкам мембраны, свободным от рецепторов, специализированных к фагоцитозу. Уменьшение скорости поглощения может быть связано с нарушением проницаемости липидного слоя клеточной мембраны вследствие изменения ее физико-химического состояния.

Действие АМС может быть направлено не только против цельной клетки (макрофага), но и различных ее компонентов, в том числе и лизосом. Антисыворотки, полученные к различным субклеточным фракциям макрофагов, могут связываться и менять функцию непосредственно тех органелл, против которых они выработаны. Так были получены антисыворотки против лизосом печени крыс, ингибирующие активность ДНК-азы и катепсинов.

При помощи антисывороток к лизосомным ферментам исследуют роль этих ферментов в патологии тканей. Так, антисыворотки оказывают ингибирующее действие на гидролиз лизосомными ферментами гемоглобина и некоторых гликопротеидов и на аутолитическое разрушение хряща (Weston et al., 1969; Poole, 1970).

При использовании специфического действия антисывороток к лизосомному катепсину D установлена идентичность его катепсину D, выделенному из многих тканей (сердце, печень, почки, мозг, селезенка, семенники) взрослых кур и костей конечностей эмбрионов (Weston, 1969).

В последнее время активно изучают антисыворотки, приготовленные к мембранам лизосом, однако данные о характере действия этих антисывороток немногочисленны и противоречивы. Persellin (1969) считает, что антилизосомные сыворотки вызывают уплотнение лизосомной мембраны, на основании чего рекомендует их в качестве терапевтического средства при различных патологических процессах, в основе патогенеза которых лежит повышение проницаемости лизосомных мембран. Однако исследование было проведено им на изолированных лизосомах, которые он обрабатывал антисыворотками, определяя затем их чувствительность к тритону X-100. Отсутствие комплемента в этой системе ставит под сомнение рекомендацию автора, тем более что ряд других авторов, изучавших влияние антилизосомных сывороток на макрофаги и изолированные лизосомы *in vitro*, представили доказательства литического действия антилизосомных

сывороток на мембрану лизосом (Х. М. Исина, 1974; Duttonal et al., 1965; Weiss et al., 1965, и др.).

Как уже упоминалось, антисыворотки к субклеточным фракциям макрофагов обладают значительно более выраженным иммунодепрессивным действием, чем АМС (Л. Г. Зайцева, М. Е. Бубашвили, 1972; Curtis, Ryan, 1973). Слабое иммунодепрессивное действие антисыворотки к целым макрофагам объясняют по-разному. Может быть, макрофаги могут восстанавливаться после отмывки клеток средой, не содержащей антисыворотки (Gallily, 1971). При отмывании прижизненно флюорохромированной культуры макрофагов, обработанных антисывороткой к лизосомам или их мембранам свежей средой, действительно наблюдали восстановление свечения гранул (Х. М. Исина, 1974), однако эти антисыворотки оказывали значительное иммунодепрессивное действие при их введении *in vivo*. Хотя многие объясняют иммунодепрессивный эффект АМС угнетением ею фагоцитоза, вероятно, все же большее значение имеет изменение нормальной функции лизосомного аппарата макрофагов, которое более резко выражено при обработке этих клеток антисыворотками к их органеллам.

Торможение фагоцитоза вызывает и АЛС, однако было показано, что оно преходящее. Через 48 ч способность клеток к фагоцитозу восстанавливается, так что это временное угнетение фагоцитоза не играет существенной роли в вызываемой этой сывороткой иммунодепрессии (Tolpaí, 1973). Возможно, АМС поражает главным образом зрелые макрофаги и другие клетки МФС могут брать на себя функции, необходимые для индукции антителиобразования (Feldman et al., 1972). Однако практически почти невозможно получить антисыворотку, строго специфичную для макрофагов. Обычно АМС реагируют с гранулоцитами, лимфоцитами и даже эритроцитами (Loewi et al., 1969; Mac Loughlin, Himm, 1970). По-видимому, получение строго специфичных антисывороток, действующих только на один тип клеток, затруднительно хотя бы потому, что макрофаги и лимфоциты имеют общий антиген (Marsman et al., 1970). Особенно трудно приготовить строго специфичные сыворотки к лизосомам и их мембранам, поскольку они практически идентичны мембранам эритроцитов. Поэтому попытки добиться получения моноспецифичных сывороток к клеткам МФС или их компонентам с помощью истощения другими клетками или

эритроцитами обычно не удаются, тем не менее титры антител к специфическому антигену значительно превышают их титры к перекрестно-реагирующему антигену. Это дает возможность направленно менять функцию клеток антисыворотками к ним и их органеллам и, следовательно, регулировать деятельность клеток МФС, что сулит большие перспективы в деле управления естественными механизмами иммунитета.

В нашей лаборатории была выполнена работа по получению, тестированию и изучению механизма действия антисывороток к макрофагам и различным компонентам их лизосомного аппарата (Х. М. Исина, 1974; Л. Г. Зайцева, 1975).

При сравнении разных схем и способов иммунизации оказалось, что для получения активных антисывороток к макрофагам или их субклеточным фракциям желательно наряду с внутримышечным введением антигена использовать полный адьювант Фрейнда (ПАФ), в то время как для получения АЛС предпочтительнее внутривенное введение клеток без адьюванта. Так, титры в реакции агглютинации с КПЭ для антилизосомной сыворотки составляли 1:8640, а для АЛС — 1:80 при внутримышечной иммунизации в ПАФ и соответственно 1:640 и 1:320 при внутривенной иммунизации.

Для определения активности испытуемых антисывороток необходим надежный метод титрования их *in vitro*. Чтобы иметь возможность выбора, было проведено сравнительное определение активности всех антисывороток по реакции агглютинации с КПЭ, по цитотоксическому и гемолитическому тестам и по действию на прижизненно флюорохромированную культуру макрофагов.

Из использованных методов определения активности наиболее просты и достаточно объективны реакция агглютинации с КПЭ и цитотоксический тест, хорошо коррелирующие с иммунодепрессивным действием антилизосомных сывороток (на гуморальные антитела). Однако титрование на прижизненно флюорохромированной культуре макрофагов (Х. М. Исина, М. Я. Корн, 1973) дает возможность определить не только антимacroфагальную, но и антилизосомную специфичность. Вероятно, именно поэтому этот тест выявляет разницу в характере действия АЛС и антилизосомных сывороток, что соответствует различиям между ними, полученным при использовании всех остальных тестов.

Антимакрофагальная сыворотка была практически во всех тестах менее активна, чем антисыворотки к субклеточным фракциям клеток МФС, как это было описано и при сравнении АЛС и антисывороток к субклеточным фракциям лимфоцитов (Lance et al., 1968; Sell et al., 1970; Fellenberg, 1971 и др.). Вместе с тем антилизосомные сыворотки, как уже упоминали, обладают макрофагальной специфичностью, о чем свидетельствует их способность агглютинировать макрофаги в значительно более высоких титрах (от 1:6280 до 1:10 240), чем лимфоциты (не более 1:40).

Интересно отметить, что антисыворотки к целым лимфоцитам или КПЭ резко отличались по активности в реакции агглютинации с КПЭ. Наиболее высокая антимакрофагальная активность обнаружена у антисывороток к лизосомам или их мембранам. Антитела к антигенам этих структур высокоспецифичны для макрофагов.

Можно предположить, что большая активность антисывороток к субфракциям как в тестах *in vitro*, так и *in vivo* связана с облегченными условиями пино- и фагоцитоза, так как вследствие более мелких размеров антигенной субстанции, взятой для получения этих сывороток, большее количество антигенного материала оказывается захваченным макрофагами. Высокая активность этих антисывороток может объясняться также их большей специфичностью по отношению к лизосомному аппарату по сравнению с АМС. Косвенно о меньшей специфичности АМС по отношению к лизосомам может свидетельствовать неспособность АМС лизировать мембрану эритроцитов, которая сходна с мембраной лизосом (Bernheimer, Schwartz, 1964), в то время как антилизосомные сыворотки обладают гемолитическим действием. Родство мембран эритроцитов и лизосом делает практически невозможным истощение антилизосомных сывороток эритроцитами. Резкое падение титров антилизосомных сывороток при истощении их эритроцитами мышей и барана как в реакции агглютинации КПЭ (с 1:8960 до 1:80), так и в гемолитическом тесте позволяет нам присоединиться к мнению Holland и соавт. (1972) о наличии общих антигенов у макрофагов и эритроцитов мышей и баранов. Однако это может объясняться не только общностью антигенов их мембран, но и хранением в фаголизосомах макрофагов остатков собственных отмерших эритроцитов.

Использование люминесцентно-серологического метода показало, что антисыворотки к мембранам и ферментам лизосом осаждаются на лизосомах фиксированных макрофагов, причем обнаружены морфологические отличия в локализации антисыворотки к мембранам лизосом и их ферментам (рис. 24). Цитоплазматические гранулы в фиксированных клетках, обработанных антисывороткой к мембранам лизосом (рис. 24, а), ярко светились по периферии и были более темными в центре (в виде «колец»). Гранулы в клетках, обработанных антисывороткой к ферментам лизосом (рис. 24, б), были окрашены равномерно и светились по всей площади.

При обработке культур макрофагов антисыворотками к мембранам лизосом было установлено, что антимембранная сыворотка (АМБС), так же как и кроличий глобулин (О. В. Чахава, Т. И. Цаценкина, 1970), пиноцитируется макрофагами и локализуется в лизосомах. В присутствии комплемента антисыворотка к мембранам лизосом, проникнув в глубь клетки, вызывала лизис лизосом, ферменты которых поступали в цитоплазму и разрушали клетку (рис. 24, в). В отсутствие комплемента пиноцитированная антимембранная сыворотка не лизировала лизосомы, однако оказывала действие на наружную цитомембрану, в результате чего на ней появлялись множественные выросты (рис. 24, г).

Прибавление к культуре макрофагов акридинового оранжевого приводило к аккумуляции красителя в лизосомах, отчего гранулы начинали ярко светиться красным светом (рис. 24, е) (А. В. Зеленин, 1965; Allison, Yong, 1964).

Исследования Х. М. Исиной показали, что в присутствии комплемента антилизосомные сыворотки вызывают лизис красных цитоплазматических гранул — лизосом (рис. 24, ж). Степень повреждения гранул зависит от дозы комплемента, а количество поврежденных клеток — от активности антилизосомных сывороток; и то и другое являются, вероятно, следствием реакции антиген — антитело (Х. М. Исиная, М. Я. Корн, 1975).

На основании зависимости литического действия антилизосомных сывороток в присутствии комплемента на красные цитоплазматические гранулы от концентрации антисыворотки был разработан метод определения активности антилизосомных сывороток на прижизненно флюорохромированных культурах макрофагов (см. гл. VII).

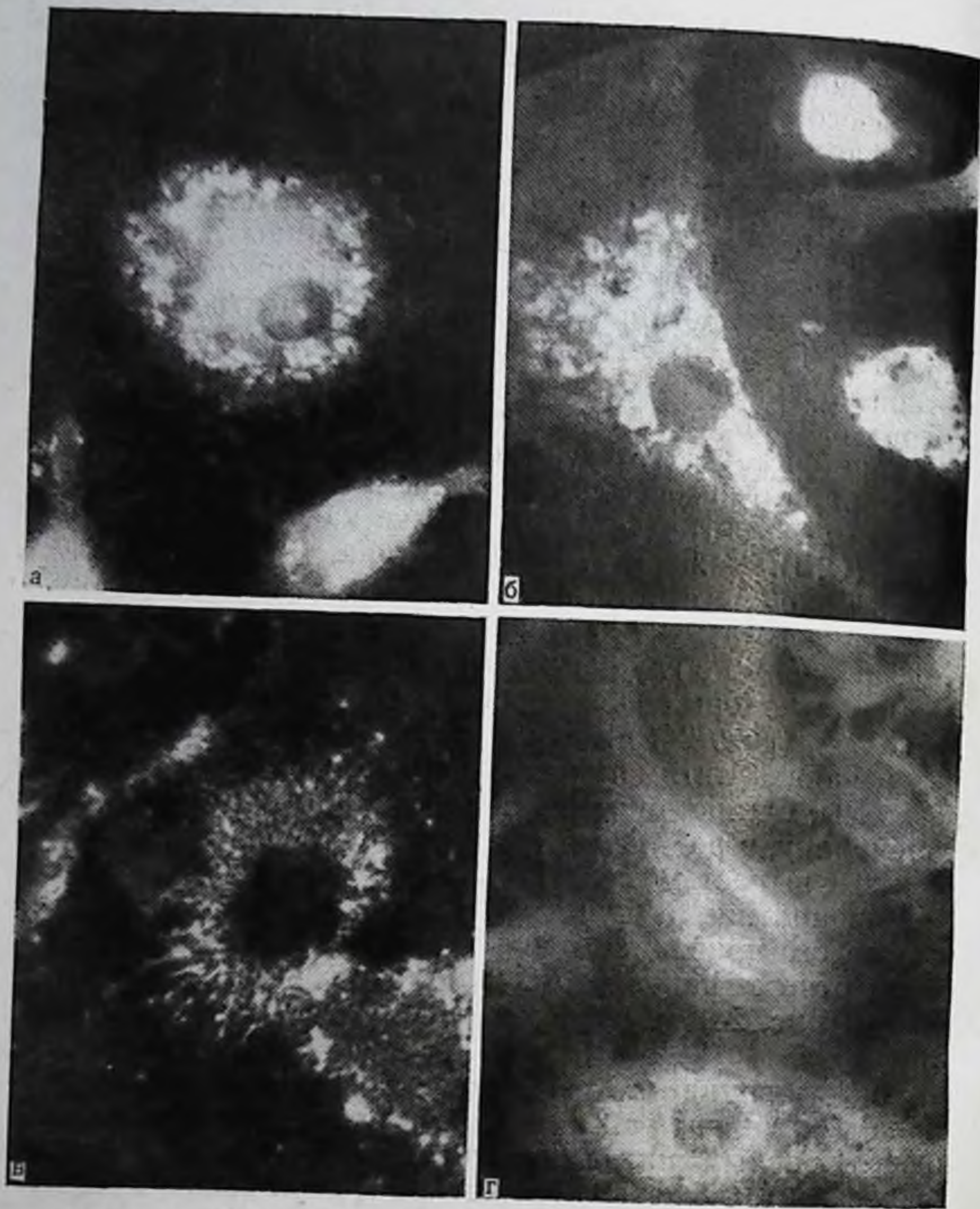


Рис. 24. Локализация и действие на макрофаги антисывороток к мембранам и ферментам лизосом при наличии и отсутствии комплемента. $\times 630$.

а — макрофаги, обработанные антисывороткой к мембранам лизосом; б — макрофаги, обработанные антисывороткой к ферментам лизосом; в — макрофаги, пиноцитировавшие антимембранную сыворотку в присутствии комплемента (инкубация 1 ч); г — макрофаги, пиноцитировавшие антимембранную сыворотку без комплемента (инкубация 1 ч).

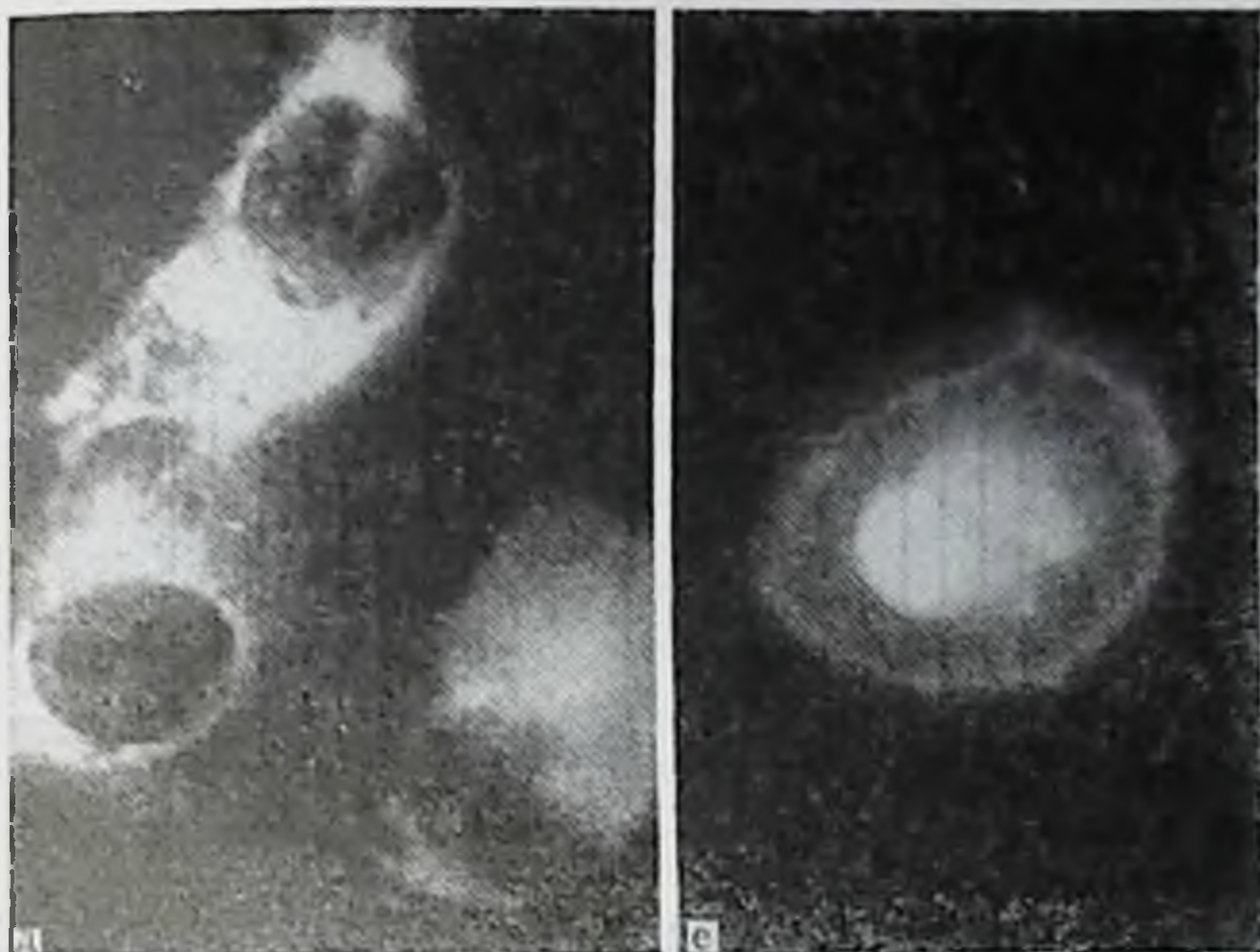


Рис. 24. (продолжение).

д — макрофаги, прижизненно флуорохромированные акридиновым оранжевым (контроль); е — флуорохромированные макрофаги, инкубированные с антисывороткой к мембранам лизосом в присутствии комплемента.

О специфичности действия антилизосомных сывороток на мембраны лизосом свидетельствует ослабление литического действия антисывороток в культурах макрофагов, обработанных различными дозами дексаметазона, который, как и другие кортикостероиды, стабилизирует мембрану лизосом.

Эксперименты по исследованию действия испытуемых антисывороток на антителообразование показали, что антисыворотки к субклеточным фракциям клеток МФС при введении их до антигена обладают значительно более сильным иммунодепрессивным действием, чем АМС и даже АЛС (рис. 25). Однако они не угнетают антителообразование при введении после антигена.

Для исследования захвата и катаболизма антигена Л. Г. Зайцевой (1975) были использованы меченные ^{51}Cr эритроциты барана и тифозная вакцина, меченная ^{14}C . Последнюю использовали с целью продления срока наблюдения. В качестве растворимого антигена был использован ^{14}C -альбумин. В этих опытах АЛС и антимембранные сыворотки (АМбС) угнетали захват антигенов КПЭ независимо от их физико-химической природы, в то время как антиферментная сыворотка (АФС) его увеличивала.

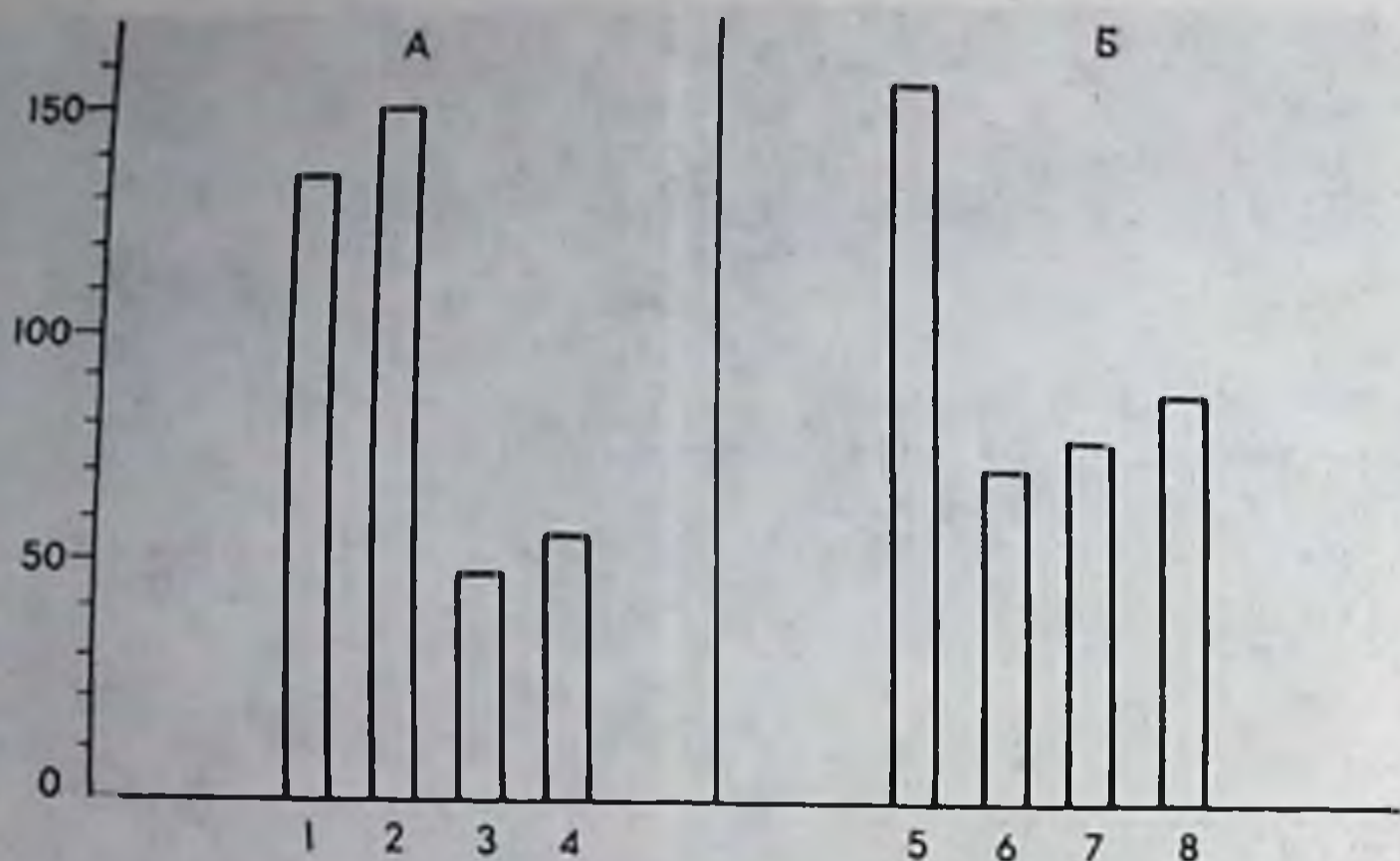


Рис. 25. Влияние антисывороток, введенных до и вместе с эритроцитами барана на продукцию антителообразующих клеток в селезенке (количество бляшек на 10^6 клеток селезенки через 72 ч после введения).

А — антисыворотки к субклеточным фракциям клеток селезенки; Б — антисыворотки к субклеточным фракциям макрофагов: 1, 5 — контроль; 2 — нормальная кроличья сыворотка; 3, 6 — антиферментные сыворотки; 4, 7 — антимембранные сыворотки; 8 — антилизосомная сыворотка.

Интересно отметить, что АЛС- и АФС- сыворотки оказывали прямо противоположное действие на захват и выведение антигенов клетками перитонеального экссудата. Анализ показал, что через неделю в КПЭ уже не удавалось обнаружить различий в содержании антигена между контрольной и опытной (АФС) группами животных. Действие АФС-сыворотки на КПЭ было кратковременным, в то время как АЛС не только угнетала захват антигена этими клетками, но и замедляла его элиминацию, так как через 8 дней под влиянием АЛС в клетках перитонеального экссудата оставалось больше меченого материала, чем в других группах. Однако изменение условий захвата и выведения антигена КПЭ под влиянием антисывороток сказывается на его персистенции в клетках селезенки и печени даже через 22 дня (срок исследования). Все исследованные антисыворотки способствовали задержке антигена в организме, так как в селезенке этих групп животных через 22 сут остается больше меченой вакцины, чем в группе животных, обработанных нормальной кроличьей сывороткой (НКС), а обработка животных АФС сывороткой сопровождается накоплением через 22 сут ме-

ченого альбумина в печени. Поскольку мы наблюдали замедление выведения антигенов из организма под влиянием антисывороток, большой интерес представляло исследование действия последних на функцию лизосомного аппарата клеток МФС. Все исследованные антисыворотки (АЛМ, АМС, АМБС) при введении их животным приводили к истинному снижению активности катепсинов в КПЭ, поскольку активность ее снижалась как в лизосомной, так и в цитоплазматической фракциях этих клеток (табл. 2). Вероятно, это в определенной мере может являться следствием пиноцитоза сывороток макрофагами. В нашей лаборатории было показано, что во время фагоцитоза активность катепсина в фагоцитирующих клетках понижается при стимуляции ее в интактных клетках МФС (Л. Г. Зайцева, 1969; И. Я. Учитель и др., 1974). Тем не менее самое значительное снижение активности (как общей, так и по фракциям) этой группы ферментов под влиянием АМБС — сыворотки, обладающей лизосомной специфичностью, приводит к мысли, что антисыворотка избирательно и направленно меняет функ-

Таблица 2

Активность катепсина D в макрофагах и клетках селезенки после введения антисывороток

Группы мышей, получивших различные сыворотки	Число мышей	Активность катепсина D в микрограммах тирозина на 1 мг белка					
		макрофаги			селезенка		
		I фракция	II фракция	I+II фракция	I фракция	II фракция	I+II фракция
Контроль	89	356	1274	1630	41	666	707
Нормальная кроличья	65	280	1109	1389	43	859	902
Антимембранная	65	102	325	427	56	936	992
p	—	0,001	0,001	—	—	—	—
Контроль	57	519	628	1145	65	384	449
Антимacroфагальная	96	336	474	810	64	375	439
p	—	0,001	0,001	—	—	—	—
Антилимфоцитарная	96	288	170	458	58	356	414
p	—	0,001	0,001	—	—	—	—

Примечание. I фракция — цитоплазма клеток; II фракция — лизосомы клеток.

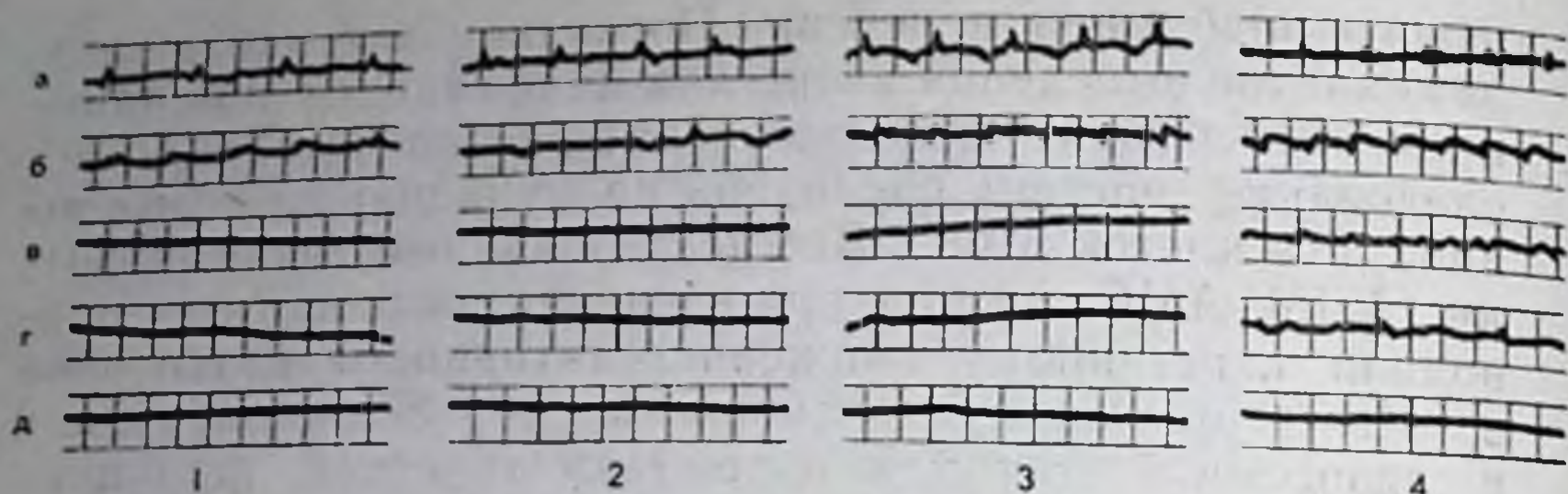


Рис. 26. Влияние антисывороток на время выживания аллотрансплантата сердца (ЭКГ).

1 — нормальная кроличья сыворотка; 2 — антиферментная сыворотка; 3 — антимембранная сыворотка; 4 — антилимфоцитарная сыворотка; а — 8-й, б — 10-й, в — 17-й, г — 18-й, д — 20-й день.

цию лизосомного аппарата клетки, тем более что АМбС-сыворотка вызывает повышение проницаемости мембран лизосом КПЭ, оказывая на них выраженное лабилизирующее действие.

Сильный иммунодепрессивный эффект антилизосомной сыворотки (АЛизС), АМбС- и АФС-сывороток на антителообразование, значительно превосходящий действие АЛС, заставил исследовать их влияние на приживление трансплантата. Для трансплантации было использовано сердце новорожденных (двух- и трехдневных) гибридов F_1 (СВА $\times$ С57В1), пересаживаемое под кожу уха мышей линии СВА (М. А. Фролова и др., 1972). Это давало возможность наглядно, с помощью ЭКГ следить за функцией трансплантата (рис. 26).

Ни одна из антисывороток, полученных к лизосомным фракциям, не вызывала статистически достоверного удлинения выживания аллотрансплантата. Этот факт косвенно свидетельствует как об избирательном действии антисывороток на клетки МФС, так и о том, что последние, видимо, играют значительную большую роль в гуморальном ответе, чем в трансплантационном иммунитете. В то время как в гуморальном иммунитете деятельность макрофагов направлена на переработку антигена и выделение из него высокоантигенных фрагментов или комплексов (И. Я. Учитель и др., 1969; Унапуе, Askonas, 1968; Mitchison, 1969), в трансплантационном иммунитете макрофаги, по-видимому, играют роль клеток-«мусорщиков», способных уничтожать чужеродные клетки и обломки и мертвые или умирающие клетки организма хозяина,

вероятно, не только с помощью фагоцитоза, но и благодаря цитотоксической активности.

Roulter и соавт. (1971) показали, что количество обнаруживаемых гистохимическими методами активных макрофагов при аллогенной пересадке быстро увеличивается и к 10-му дню после пересадки достигает 50% от всех инфильтрирующих клеток. Протеолитическая активность инфильтрирующих клеток повышается по мере развития инфильтрата.

Повышение проницаемости лизосомной мембраны, вероятно, приводит к утечке ферментов из лизосом и лизису элементов перемычек, соединяющих ложе аллотрансплантата с тканями, что приводит к отторжению трансплантата у реципиента.

Действие витаминов и кортикостероидов на клетки моноклеарной фагоцитирующей системы

Антивоспалительный эффект кортикостероидов хорошо известен, что привлекло внимание исследователей к изучению механизма формирования очага воспаления, его клеточного состава и состояния лизосомного аппарата клеток МФС.

Действие глюкокортикостероидов на клетки МФС было детально исследовано Thompson, van Furth (1970). Ими было установлено, что под влиянием глюкокортикостероидов резко уменьшается количество моноцитов в кровяном русле и очаге воспаления. Это снижение количества моноклеарных фагоцитов не связано с изменением проницаемости сосудистой стенки, что могло бы сказаться на миграции гранулоцитов, поступающих в очаг воспаления в первую фазу его формирования, но никак не на моноклеарной инфильтрации тканей, которая развивается значительно позже.

Введение животным кортизона препятствует накоплению макрофагов в брюшной полости после стимуляции, чем бы ее не вызывали (мясо-пептонным бульоном, гликогеном, сывороткой и др.). Это происходит главным образом за счет уменьшения притока моноклеарных фагоцитов из кровяного русла, который едва достигает 10% от нормального своего уровня.

Механизм влияния кортикостероидов на миграцию клеток МФС пока не ясен. Разрушения клеток МФС под влиянием кортикостероидов не происходит. Допускают,

что быстрое исчезновение моноцитов крови объясняется нарушением процесса их освобождения из костного мозга и перераспределением между другими органами и тканями, тем более что глюкокортикоиды не изменяют количества тканевых макрофагов, а уменьшают поступление в очаг воспаления, что связывают с резким падением числа моноцитов в кровяном русле.

Введение глюкокортикоидов заметно не влияет на способность клеток МФС к фагоцитозу различных бактерий (*Staph. albus* и *aureus*, *E. coli*, *S. typhi* *murium*, *Ps. aeruginosa*), но в некоторых случаях изменяет способность макрофагов к внутриклеточному их умерщвлению. Так, глюкокортикоиды не влияют на бактерицидность макрофагов по отношению к белому стафилококку, но резко угнетают ее по отношению к *S. typhi* *murium* или *Candida albicans*. Эти наблюдения позволяют думать, что общее понижение реактивности организма, вызываемое введением глюкокортикоидов, не является прямым следствием их действия на фагоцитоз или переваривающую способность клеток МФС (van Zwet et al., 1975). Вместе с тем при взаимодействии определенных видов микробов, особенно обладающих аналогами лизосом, с набором собственных гидролитических ферментов, с лизосомным аппаратом макрофагов процесс внутриклеточного переваривания микроорганизмов определяется как особенностями микробного раздражителя, так и исходной функциональной активностью макрофагов. При этом изменения активности лизосомных ферментов в пределах одной макрофагальной линии наиболее резко выражены при взаимодействии с живыми микроорганизмами и мало меняются при контакте с убитыми или разрушенными микробами (Е. А. Асташева, 1975). Некоторые функции макрофагов страдают более значительно. При исследовании клеточных взаимодействий было установлено, что кортикостероиды резко изменяют чувствительность макрофагов к так называемому «фактору вооружения», так что проявление цитотоксичности макрофага полностью угнетается введением кортикостероидов как *in vivo*, так и *in vitro* (Dimitriu, 1976). Особенно значительно угнетает цитотоксичность макрофагов ацетат кортизона, который вызывает длительное повышение в плазме уровня кортизона (Hunninghake, Fauci, 1977). Одновременно стероиды и ряд других лекарственных препаратов изменяют функцию лизосомного аппарата клеток МФС.

И. С. Фрейндлин (1974) было изучено действие на макрофаги большого количества биологически активных веществ. Ею показана возможность избирательного угнетения или активации лишь одной из функций макрофагов. Так, амантадин и оливомицин угнетают фагоцитоз при сохранении или даже усилении процессов деградации возбудителя. В то же время фракция гистона 2а, наоборот, может угнетать переваривание при усиленном захвате. Большинство препаратов (актиномицин D, рифамицин, хингамин или хлорохин, оливомицин), угнетающих захват и переваривание возбудителей в культурах макрофагов, понижают также скорость очищения от них кровотока. Аскорбиновая кислота, ФГА, ЛПС и малые дозы хингамина, стимулирующие функции макрофагов, ускоряют также их клиренс.

Возможность избирательного влияния на функции макрофагов интересна с точки зрения регуляции процессов естественной защиты от микроорганизмов. Конечно, очень важно выяснить пути реализации действия того или иного агента на лизосомный аппарат, так как они могут быть весьма разнообразными. Некоторые агенты (кортикостероиды, хингамин, сапонин, стрептолизин) регулируют освобождение ферментов из лизосом, другие могут влиять непосредственно на синтез или активность лизосомных ферментов за счет накопления в лизосомах (например, неорганические красители, золото и др.) или вследствие своих антиметаболических свойств (актиномицин D, рифамицин и др.). Возможно также действие на процессы образования фагосом, первичных и вторичных лизосом и их слияния между собой или непосредственно на образование первичных лизосом в пластинчатом комплексе. Еще de Duve и соавт. (1969), изучая влияние кортикостероидов на лизосомы печени крыс *in vitro*, обнаружили задержку поступления β -глицерофосфата в гранулы при кислом pH. В то же время было установлено, что предварительное введение крысам кортизона препятствует выходу катепсина D из больших гранул как у интактных, так и у облученных ультрафиолетовыми лучами животных (Weissmann, Dingle, 1961).

В дальнейшем многочисленными экспериментами было показано, что витамин A и кортикостероиды оказывают на лизосомы прямо противоположный эффект *in vivo* и *in vitro*. Введением кортизола вместе с витамином A можно предупредить вызываемые последним поражения

тканей и лизосом, снизить освобождение из них ферментов. Дальнейшие исследования на культурах тканей продемонстрировали, что различные производные гидрокортизона (кортизон, кортизол и их соли, β -метазон, преднизолон и др.) препятствуют выходу ферментов из лизосом, обработанных веществами, повышающими проницаемость их мембран (стрептолизин О, четыреххлористый углерод и др.) (Weissmann, 1969). Кортизон и его аналоги в концентрации от 10^{-3} до 10^{-6} М стабилизируют мембраны лизосом в культуре ткани. При действии на изолированные гранулы рабочие концентрации колеблются от 10^{-4} до 10^{-3} М. Приведенные выше наблюдения позволили связать противовоспалительный эффект, оказываемый производными кортикостероидов, с их способностью понижать проницаемость лизосомных мембран.

Физиологическое действие стероидных гормонов, вероятно, может иметь и другие точки приложения. Описаны наблюдения, согласно которым у мышей, обработанных кортикостероидами, тормозится процесс слияния лизосом с фагосомами при увеличении числа свободных лизосом в цитоплазме макрофагов в 2—3 раза.

Ряд стероидов (прогестерон, этиохоланолон и др.) оказывает на клеточные мембраны действие, прямо противоположное эффекту кортикостероидов. Они способствуют повышению проницаемости лизосомных мембран. Однако разделить стероиды на «литические» и «стабилизирующие» трудно, поскольку в ряде случаев обнаруживаемый эффект зависит от дозы препарата. Изучение механизма действия стероидов на искусственных липосомах показало, что вызываемые ими изменения в проницаемости мембран могут быть связаны со структурными перестройками в липидных слоях.

Weissmann (1969) было проведено исследование влияния на лизосомный аппарат ряда стероидов, желчных кислот и других агентов, обладающих противовоспалительным действием. Оказалось, что хингами, например, тоже стабилизируют мембраны лизосом и предохраняет их от действия стрептолизина О, этиохоланолона или прогестерона. Ряд авторов обнаружили патологические изменения в лизосомном аппарате больных, получавших хингамин. Этот препарат угнетает деление и трансформацию лимфоцитов, вызываемую ФГА, что тоже связывают с его действием на лизосомный аппарат клеток. Он изменяет освобождение лизосомных гидролаз в культуре фибро-

бластов и угнетает их способность к фагоцитозу (Weissmann, 1975). Нестероидные противовоспалительные средства, вероятно, хотя и не прямо, но тоже действуют на лизосомы. Хлорпромазин и некоторые антигистаминные препараты понижают проницаемость лизосомных мембран *in vivo* и *in vitro* так же, как некоторые фенотиазины. О механизме действия салицилатов единого мнения нет (Weissmann, 1969).

Как уже упоминалось ранее, некоторые канцерогены (кротоновое масло, твин-60 и др.) повышают проницаемость лизосомных мембран, что позволило Э. Аллисону (1969) предположить, что освобождение лизосомных гидролаз вызывает изменения в хромосомах и может играть роль в возникновении неоплазм.

Испытывая действие ряда аналогичных агентов на биологические и искусственные мембраны, Weissmann (1969) тоже обнаружил их способность увеличивать выход лизосомных ферментов из гранул. По его мнению, освобождение ферментов из лизосом повышает степень изменений ДНК, вызываемых веществами, индуцирующими соматические мутации, вследствие гидролиза репрессоров клеточного деления. Таким образом, агенты, взаимодействующие с биологическими мембранами, могут привести к снятию механизмов, контролирующих клеточное деление.

Лизосомный аппарат клеток МФС может повреждаться или по меньшей мере менять свою функциональную активность под влиянием различных агентов, накапливающихся в лизосомах (красители, антималярийные и другие препараты). Возможно, в ряде случаев именно способность концентрироваться в лизосомах обеспечивает терапевтическое действие этих веществ. Красители и неорганические вещества, накапливаясь в клетках МФС, вызывают прямое угнетение лизосомных гидролаз аналогично угнетению обмена в макрофагах, наблюдаемому при накоплении нейтральных липидов и углеводов в их цитоплазме после заражения некоторыми шигеллами. Изменения в содержании жира и гликогена в цитоплазме макрофагов могут служить чувствительным показателем некробиотических процессов в этих клетках (Н. Е. Максимович, Е. А. Суптель, 1976). Взаимодействие золота с сульфгидрильными группами ряда ферментов тоже сопровождается угнетением их активности. В некоторых случаях агенты первично и непосредственно дейст-

вуют на лизосомы, что влечет за собой вторичное поражение клетки в целом. Возможность искусственно разрушать лизосомы или обрабатывать их содержимым ткани может быть использована в клинической практике при профилактике или лечении келоидных рубцов, спаек (см. гл. II) и, по-видимому, опухолей, что должно привлечь пристальное внимание исследователей.

Наши опыты по предупреждению развития спаек в брюшной полости кроликов введением материала из лизосом (см. гл. II) увенчались успехом, что позволяет надеяться на возможность применения этого приема для профилактики спаек в клинической практике. Такой широко используемый иммунодепрессант, как циклофосфамид, вызывает резко выраженную аутофагию. Это лежит в основе механизма действия этого препарата на организм. Интересно, что образование большого числа аутофагических вакуолей с интенсивным разрушением внутриклеточных органелл наблюдали в альвеолярных макрофагах курящих гашиш (Raz, Goldman, 1976). Введение азатиоприна (имурана) в больших толерирующих дозах (200 мг/кг×9) приводит к полному исчезновению из кровяного русла моноцитов, количество которых скоро (через 1—2 сут) восстанавливается. КПЭ более устойчивы к действию азатиоприна, но и они страдают при длительном его введении. Опыты с меченым ³H-тимидином показали, что азатиоприн угнетает образование моноцитов как в норме, так и при воспалении. Поскольку он действует на синтез ДНК, то можно предположить, что азатиоприн угнетает митотическую активность прямых предшественников моноцитов в костном мозге — промоноцитов. Следствием этого являются все последующие изменения в системе клеток МФС, отсутствие лейкоцитоза при воспалении и макрофагов в его очаге (van Furth et al., 1975). Возможна компенсация иммунодепрессорных эффектов путем действия некоторых антибиотиков в сочетании с препаратами, активирующими функции макрофагов, например адьювантами (И. С. Фрейндлин, 1974).

Влияние агентов, повышающих проницаемость мембран лизосом

Изменения клеточных мембран под влиянием витамина А (ретинола) были описаны 50 лет назад. Уже в те годы обнаружили, что недостаток витамина А в организме вы-

зывает ксерофтальмию, поражения нервной и костной систем. Позже было показано, что избыток витамина А или его производных тормозит нормальный рост костной ткани *in vitro* и вызывает разрушение концевых хряща главным образом за счет растворения его гликопротеидов. При этом в культуральной среде наблюдали увеличение содержания кислоторастворимого азота, что свидетельствует о повышенной протеолитической активности. Прибавление ретинола *in vitro* изменяет лизосомы и способствует освобождению их кислых гидролаз в среду (Dingle, 1961). Действие витамина А не является строго специфичным, так как он разрушает также мембраны эритроцитов и других субклеточных частиц, например митохондрий. Однако это связано с тем, что мембраны лизосом, митохондрий и эритроцитов имеют сходное строение.

Введение больших доз витамина А *in vivo* приводит к выходу лизосомных ферментов в кровотоки благодаря повышенной проницаемости мембран лизосом. Такое же действие оказывают и другие поверхностно активные вещества, влияющие на мембраны аналогичным образом. Дефицит витамина А восстанавливает стабильность мембраны лизосом, их обычные размеры и плотность.

Изучение взаимодействия витаминов А и Е выявило регулируемую роль витамина А в проницаемости лизосомной мембраны, так как он повышает ее проницаемость только при чрезмерном поступлении с пищей витамина Е (Roels, 1969). Сам по себе витамин Е в больших дозах тоже вызывает повышенное выделение ферментов из лизосом при культивировании их при кислом рН и температуре 37° С, хотя его умеренные дозы в тех же условиях стабилизируют лизосомную мембрану. У животных с гиповитаминозом Е обычно наблюдается некоторое повышение активности ферментов лизосом, вероятно связанное с ослаблением их мембраны. В целостном организме конечный результат является часто следствием сложных взаимоотношений между рядом экзо- и эндогенных факторов.

Применение фотосенсибилизаторов и ультрафиолетовое облучение вызывают быстрое разрушение мембран лизосом и, вероятно, играют первичную роль в развитии поражений кожи. Вообще же выяснить, первично или вторично вовлекается лизосомный аппарат при поражениях тканей, вызываемых различными агентами, нелегко, тем более что некоторые вещества неодинаково влияют на

секрецию разных продуктов макрофагами. Колхицин, например, стимулирует секрецию панкреатопептидазы Е, клостридиопептидазы А и т. д., но угнетает продукцию лизоцима (Gordon, Werb, 1976).

Berenheimer и Schwartz (1964) было изучено действие 17 бактериальных токсинов на изолированные лизосомы лейкоцитов кроликов. Эффект регистрировали по двум показателям: падению мутности лизосомных суспензий и освобождению β -глюкуронидазы и кислой фосфатазы из печеночных лизосом под влиянием испытуемых токсинов. Выяснилось, что не все токсины вызывают одинаковые изменения лизосом. Стрептолизины О и S, стафилококковый α -токсин и α -токсин *Cl. perfringens* действовали в обеих системах, т. е. разрушали изолированные лизосомы. Стафилококковый β -токсин, лейкоцидин, энтеротоксин, нейротоксин *Sh. shiga*, дифтерийный и столбнячный токсины, ботулинический А-токсин и токсин *B. perfringens* Е не активны ни в одном из этих тестов. Остальные токсины изменяли лизосомы только в одной из проб. Следовательно, существует корреляция между гемолитическими свойствами токсинов и их способностью разрушать лизосомы. Это позволило предположить, что лизосомы и эритроциты окружены одинаковой мембраной.

Обширный и быстрый лизис цитоплазматических гранул с последующей гибелью клетки вызывает экзотоксин стрептококков — стрептолизин. При этом стрептолизины О и S, отличающиеся по своим свойствам, действуют независимо друг от друга. Стрептолизин S почти в 10 раз активнее по отношению к изолированным лизосомам, чем стрептолизин О. Однако эти различия заметны главным образом при небольших концентрациях токсинов. На лизосомный аппарат целых клеток стрептолизин S действует слабее стрептолизина О. Последний вызывает большие изменения в лизосомном аппарате клеток уже через 1 мин экспозиции с ними. При дальнейшей инкубации изменения нарастают, мембраны гранул разрушаются, нарушается и наружная цитомембрана клетки, митохондрии и другие элементы клетки начинают вытекать во внеклеточную среду.

Аналогичные изменения вызывает и действие стафилококкового лейкоцидина. Освобождение содержимого гранул и выход его за пределы клетки вызывают применение как стрептолизина О и лейкоцидина, так и витамина А. Процесс идет только в присутствии Ca^{2+} и может быть

активирован АТФ. Сходство между действием разных агентов позволило предположить, что это неспецифическая реакция лизосомного аппарата на повреждение, которая может лежать в основе нормальной функции клетки при освобождении содержимого лизосом в фагосому (Allen, 1969).

Стрептолизин О, в отличие от стрептолизина S, обладает антигенными свойствами, и индуцированные им антитела могут нейтрализовать его действие на лизосомы. Введение в суставы *in vivo* больших количеств лизосомного содержимого или стрептолизина S может вызвать экспериментальный артрит, близкий по гистологической картине к ревматоидному артриту. Механизм возникновения таких артритов неясен. Были высказаны предположения, что они развиваются по типу аутоиммунных поражений или в результате того, что фиксированные макрофаги синовиальных оболочек оказываются не в состоянии справиться с фагоцитозом и перевариванием скапливающихся в суставе патологических продуктов (Thomas, 1969). Последнее предположение кажется нам правдоподобным, потому что в многочисленных экспериментах мы наблюдали понижение активности лизосомных ферментов во время активного фагоцитоза разных агентов. Кроме того, макрофаги, полученные во время оперативного вмешательства на брюшной полости людей при различных воспалительных процессах, обладают резко сниженной активностью лизосомных ферментов (И. Я. Учитель и др., 1976).

Липополисахаридные эндотоксины грамотрицательных бактерий активизируют макрофаги, стимулируют их дифференциацию, вызывают гипертрофию пластинчатого комплекса и значительно увеличивают число и объемы цитоплазматических гранул. Аналогичные изменения в клетках МФС вызывает БЦЖ, что может быть одним из факторов, обусловивших использование БЦЖ с лечебными целями в онкологии, тем более что, как уже указывалось, оба агента способствуют выделению макрофагами фактора, действующего цитотоксически на клетки с нарушенным процессом деления (Hibbs et al., 1972 а, б).

Интересно, что быстрый и интенсивный захват клетками белка может приводить к тяжелым их поражениям. Так, уже через 5 мин после однократного внутривенного введения сывороточного альбумина человека ранее сенсibilизированным им крысам вызывает у них резкие из-

менения в клетках МФС, главным образом печени. Повторные многократные инъекции этого белка могут привести к циррозу печени. Вместе с тем такие токсические агенты, как четыреххлористый углерод или соли бериллия, введение которых сопровождается тяжелым поражением печени, вначале не оказывают заметного действия на состояние лизосомного аппарата, хотя и приводят к резкому угнетению клиренса, нормальное время которого восстанавливается только через 2 нед (Vacher et al., 1974). Изменение функции лизосом развивается на более поздних этапах и является, вероятно, опосредованным.

Анализ действия агентов, влияющих на функцию лизосомного аппарата, заставляет думать, что она регулируется многими факторами и обладает определенными возможностями саморегуляции, что особенно выявляется во время процессов пино- и фагоцитоза.

Глава VI

РОЛЬ КЛЕТОК

МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФАГОЦИТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ В СОХРАНЕНИИ ГОМЕОСТАЗА И ЦЕНТРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИХ ФУНКЦИЙ

Характерной чертой развития биологии последних лет является желание исследовать конкретные процессы в самой элементарной форме, т. е. на молекулярном уровне. Различные варианты редукции целого к части являются безусловно необходимой частью аналитического познания, однако не следует при этом забывать и образ целого. Особенно нельзя оставлять на будущее осмысливание интегрирующих механизмов, без которых невозможно нормальное функционирование системы при исследовании процессов защиты в высокоорганизованных организмах. Конечно, отсутствие точных знаний о конкретных молекулярных механизмах того или иного процесса ведет часто к созданию ошибочных теорий, но это необходимый этап в нашем стремлении осознать в целом все многообразие систем и функций целостного организма.

Сложная система клеток, обеспечивающая естественную и специфическую защиту организма, должна управляться четкими регулирующими механизмами, способными обеспечить быструю их реакцию на непрерывно меняющиеся условия внешней и внутренней среды и одновременно сохранить пролиферативный пул этих клеток в жизненно необходимых пределах.

Регуляция имеет несколько уровней и начинается с клеточных взаимодействий между собой и с окружающими клетками, которые лежат в основе клеточной дифференциации и клеточного гомеостаза. Многолетние исследования привели к заключению, что эритроциты, клетки МФС и лимфоидного ряда имеют общего родоначальника — стволовую кроветворную клетку. Детальный анализ свойств и функций стволовых клеток кроветворной и лимфоидной ткани дан А. Я. Фриденштейном и И. Л. Чертковым (1969, 1977). Стволовые клетки способны к самоподдержанию и дифференцировке, они чутко реагируют на изменение величины своего пула и чувстви-

тельны к различным индукторам, под влиянием которых и происходит их дифференцировка в клетки определенного вида, а иногда и дедифференцировка.

Основной проблемой, не решенной до сих пор, является определение природы специфических индукторов и репрессоров, которые определяют направление дифференцировки стволовой клетки на эритроциты, лимфоциты, плазматические клетки или макрофаги. Факторы, контролирующие пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток, интенсивно изучаются, однако остаются еще во многом непознанными. Главные из них определяются внутрипопуляционными взаимодействиями.

Путем исследования в культуре ткани было установлено, что микроокружение колоний гранулоцитов стимулирует пролиферацию потомков мононуклеарных клеток, образующих впоследствии колонии фагоцитирующих мононуклеарных клеток (Metcalf et al., 1967).

Как уже говорилось (см. гл. IV), при разборе клеточных взаимодействий в гомеостазе клеток МФС большую роль играют различные факторы, выделяемые другими клетками, медиаторы, гормоны и липиды. Во всяком случае пролиферация макрофагов не может быть объяснена единственно депрессией участка генома, ведущей к митозам, поскольку в сохранении гомеостаза принимают участие факторы, обеспечивающие миграцию моноцитов и макрофагов к очагу поражения, инфильтрацию его незрелыми моноцитами, которые впоследствии через кровоток достигают определенных тканей и превращаются в макрофаги.

Имеется много данных, указывающих на то, что зернистые лейкоциты выделяют факторы, способствующие дифференцировке определенных видов лимфоцитов в макрофаги. При длительном культивировании лимфоцитов крови трансформация их в макрофаги происходит только при добавлении гранулоцитов к чистой культуре лимфоцитов (Gough et al., 1965). Однако в этих опытах есть много моментов, заставляющих сомневаться в достоверности делаемых на их основании заключений.

Фибробласты выделяют в среду фактор (фактор роста макрофагов), стимулирующих пролиферацию сингенных или аллогенных (но не ксеногенных) макрофагов *in vitro*. В свою очередь при гибели макрофагов выделяются вещества, индуцирующие пролиферацию фибробластов и синтез коллагена. Лизаты макрофагов или их фермен-

ты способны вызывать пролиферацию лимфоцитов и плазматических клеток (Pearsall, Weiser, 1970). Все эти сложные межклеточные взаимодействия, несомненно, участвуют в регуляции гомеостаза и подчиняются более высоким уровням регуляции.

Основой интегрирования всех функций организма является их нервная регуляция. Уже многократно внимание ученых обращалось к осмысливанию роли нервной системы в различных отправлениях организма, но почти всегда это предшествовало накоплению точных фактов. Еще Клод Бернар, открыв межклеточный обмен (образование и расщепление гликогена), высказывал предположение, что регуляция этого процесса осуществляется рефлекторным путем после раздражения чувствительных окончаний в плевре воздухом легких.

Для отечественной школы биологов вообще характерно стремление к обобщениям и установлению общебиологических закономерностей. П. Ф. Здродовский (1963) впервые увидел приложимость теории Н. Е. Введенского, разработанной на нервно-мышечном препарате, о сопряженности процессов возбуждения и торможения и установленного И. М. Сеченовым правила «суммация раздражений» к деятельности иммунокомпетентной системы. Большой заслугой П. Ф. Здродовского является то, что он показал на огромном материале, накопленном иммунологией, что все факты, которыми она располагает, являются частным выражением общебиологических законов. Эти теоретические обобщения имеют большое практическое значение, так как позволили обосновать «закон интервалов» и «кратности прививок», на которых практически строятся схемы иммунизации и календари прививок. После многолетних исследований П. Ф. Здродовского и его учеников стало очевидным, что иммунитет как таковой и антителообразование, в частности, подчиняются общес-физиологическим закономерностям и нейрогуморальной регуляции (П. Ф. Здродовский, Г. А. Гурвич, 1972).

Деятельность иммунокомпетентной системы в значительной мере автономна, иначе она не могла бы работать в непрерывно меняющихся условиях. Ее функция и состоит в том, чтобы сохранить гомеостаз в организме, несмотря на многообразие импульсов, исходящих как из внешней среды, так и из многообразных систем органов и тканей.

Рассматривая физиологию ЦНС с эволюционных позиций, Л. А. Орбели (1942) указывал, что функция любых органов вначале характеризуется автономностью и связь с нервной системой возникает на более поздних ступенях эволюции.

Макрофаги и фагоцитоз, осуществляемый ими и родственными клетками, являются наиболее древней частью систем, обеспечивающих иммунитет и гомеостаз, что неоднократно заставляло исследователей искать пути центральной регуляции их деятельности. Если условнорефлекторное воспроизведение антител при методически правильной постановке опытов не удается, то большинству исследователей удалось получить условнорефлекторную стимуляцию лейкоцитоза, фагоцитоза и продукции лизоцима (Г. В. Выгодчиков, О. Барыкина, 1927; О. А. Островская, 1929; У. Г. Гасанов, 1953; Metalnicov, 1934; Venadato et al., 1953), что убедительно свидетельствует о существовании нервных механизмов регуляции факторов естественного иммунитета.

Тщательные исследования, проведенные в течение ряда лет под руководством П. Ф. Здродовского, подтвердили большую роль гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в деятельности механизмов защиты и компенсации, в том числе и в явлениях естественной и приобретенной невосприимчивости к инфекциям. Это дало возможность показать неотделимость проблемы специфического иммуногенеза от проблемы неспецифической регуляции его в целостном организме.

В нейрогуморальных механизмах регуляции иммунитета большое место занимает автономная нервная система, тесно связанная в своей деятельности с системой гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников. Исследование роли автономной нервной системы в иммунитете проводилось многочисленными авторами. Пользовались при этом двумя путями. Ряд авторов изучали влияние на естественный и специфический иммунитет раздражения или удаления различных участков вегетативной нервной системы, другие исследовали эффект от действия различных медиаторов или вегетативных ядов. Несмотря на некоторую разноречивость, большинство работ свидетельствует о том, что понижение парасимпатического тонуса активизирует естественные защитные механизмы иммунитета (фагоцитирующая способность фагоцитов, опсонины, бактерицидность сыворотки, комплемент и т. д.).

Наиболее стройную систему участия автономной нервной системы в регуляции иммунитета предложил Belak (1939, 1941). На основании многочисленных экспериментов, проведенных на различных животных, и частично наблюдений на человеке Belak пришел к выводу, что естественные защитные вещества, такие, как лексины, опсоны, комплемент, бактерицидины и т. д. (а теперь мы знаем, что большинство из них синтезируется в клетках МФС), увеличиваются в количестве при раздражении симпатической части нервной системы и угнетаются парасимпатическим отделом автономной нервной системы. Продукция же специфических антител, наоборот, активируется парасимпатическим и угнетается симпатическим отделами вегетативной нервной системы. Эти данные позволили Belak предположить, что все механизмы естественного иммунитета, среди которых клетки МФС играют ведущую роль, как и все функции организма, которые обеспечивают мгновенную защитную реакцию организма, подчиняются симпатико-адреналовой системе.

После работы Г. Селье об адаптационном синдроме (1950), являющемся стереотипным механизмом защиты организма, не возникает сомнений о важной роли в регуляции иммунитета гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Поскольку подбугорная область принимает непосредственное участие в регуляции трофики организма, ее роль в биологических процессах защиты в последнее десятилетие привлекла внимание многих исследователей. В работе Е. А. Корневой и Л. М. Хай (1963) было показано, что разрушение задних ядер подбугорной области угнетает образование антител. Впоследствии их данные были подтверждены рядом авторов, установивших, что электрокоагуляция задних ядер подбугорья угнетает также аллергические и гетероаллергические реакции у подопытных животных, замедляет образование антителопродуцирующих клеток и замедляет ход дифференцировки клеток плазмочитарного ряда (А. И. Поляк, 1969; Р. А. Беловолова, 1973; О. В. Кишковская, 1975, и др.). Установлено также, что разрушение ядер заднего отдела подбугорной области угнетает бактерицидную активность сыворотки крови и кожи, понижает уровень комплемента и интенсивность фагоцитоза (В. А. Шекоян, 1967; В. Н. Мальцев и др., 1970).

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что функция клеток МФС находится под непосредствен-

ным контролем нервной системы. Эти работы проанализированы в монографии А. Д. Адо «Патофизиология фагоцитов» (1961), под руководством которого было исследовано влияние раздражения хеморецепторов каротидного узла собаки полным дизентерийным антигеном Флекснера на фагоцитарную активность лейкоцитов, что позволило установить существование рефлекторной регуляции фагоцитоза.

Собственные экспериментальные данные и анализ опубликованных к тому времени работ позволили А. Д. Адо заключить, что изменение функционального состояния всех отделов нервной системы влияет на фагоцитарную деятельность соединительнотканых клеток как через нервные волокна, непосредственно оканчивающиеся в тканях, где локализуются фиксированные макрофаги, так и при помощи медиаторов нервного возбуждения и гормонов.

По мере накопления сведений о субклеточных и молекулярных механизмах, лежащих в основе фагоцитоза, появилась необходимость изучения на новом уровне конкретных путей регуляции отдельных звеньев многоступенчатого иммунного процесса, начиная со способности к распознаванию, захвата и элиминации чужеродного агента клетками МФС и кончая клеточными взаимодействиями, ведущими к биосинтезу специфической молекулы антитела.

О влиянии кортикостероидов на лизосомы и их мембраны *in vitro* и на функцию лизосомного аппарата *in vivo* говорилось в предыдущей главе. Было обнаружено, что лизосомы, выделенные из тканей адреналэктомированных животных, более хрупки и в печени таких крыс содержится больше катепсинов в свободном состоянии (Bird et al., 1968). Описаны различия в функциональной активности КПЭ в зависимости от пола животных. Среди мононуклеарных клеток брюшной полости нестимулированных самок значительно больше лимфоидных элементов, чем у самцов. Вместе с тем перитонеальные макрофаги самок проявляют большую способность к захвату введенной туши, чем макрофаги самцов, и эта повышенная способность к фагоцитозу не связана с разницей в абсолютном количестве макрофагов. Введение самцам эстрадиола приводит к увеличению захвата туши макрофагами ранее, чем увеличивается их число (Friedman, 1973). Эти данные свидетельствуют о том, что половые гормоны в ка-

кой-то мере определяют функциональную активность макрофагов. С подобными фактами, хотя они пока и недостаточно исследованы, нельзя не считаться. Ранее уже упоминалось (см. гл. VI), что функция клеток МФС может в значительной мере определять гомеостатические механизмы защиты от возникновения опухолей, локализация и частота появления которых часто оказываются связанными с полом. Поэтому половые различия в функциональной активности клеток МФС должны привлечь внимание исследователей и к этому аспекту их деятельности.

На базе нашей лаборатории В. А. Шекоян на протяжении ряда лет изучал роль заднего отдела подбугорной области в регуляции функции макрофагов (В. А. Шекоян и др., 1973, 1975, 1976).

Двустороннюю коагуляцию в области заднего и дорсального полюсов подбугорной области производили постоянным электрическим током силой 2 мА в течение 1 мин. Для определения координат пользовались стереотаксическим атласом. В конце исследований производили гистологический контроль величины и локализации повреждений мозга. Контролями служили интактные ложноперированные (коагуляция в другой области мозга) кролики и животные с коагуляцией переднего отдела подбугорья в области надзрительного (супраоптического) ядра. Было исследовано влияние структур переднего и заднего отделов подбугорной области на скорость очищения кровотока от введенной туши (клиренс), на способность макрофагов захватывать, переваривать и хранить антиген, на активность ферментов лизосом и проницаемость их мембран и, наконец на состояние наружной цитомембраны макрофагов, которое крайне важно для осуществления их кооперативных взаимодействий с другими клетками.

Исследование клиренса проводили на 7-й, 14-й и 21-й день после коагуляции подбугорной области путем внутривенного введения смеси туши с желатиной (2 мл туши с 5 мл 3% раствора желатины в физиологическом растворе) из расчета 2 мл смеси на 1 кг. Кровь брали из краевой вены уха через 10 с, 3, 6, 14, 20 и 25 мин и в количестве 0,2 мл прибавляли к 2,8 мл 0,1% раствора Na_2CO_3 , содержащего 3 ЕД гепарина. Результаты определяли на спектрофотометре при длине волны 675 нм.

Оказалось, что коагуляция заднего отдела подбугорной области не влияла на скорость очищения кровотока от туши, тогда как при разрушении надзрительного ядра клиренс туши осуществлялся практически вдвое быстрее.

Захват антигена макрофагами у оперированных кроликов существенно не менялся. В то же время коагуляция заднего ядра подбугорья приводила к более резкому

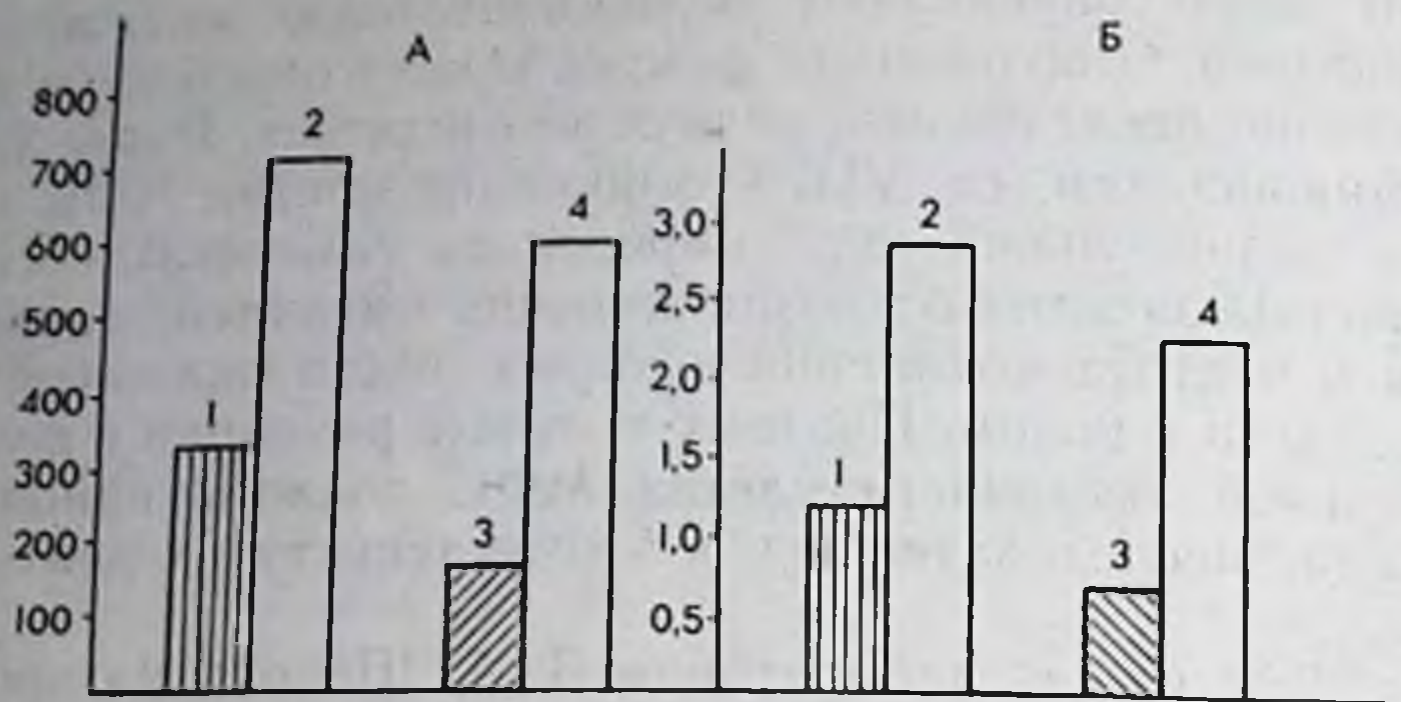


Рис. 27. Иммуногенность лизосомных и РНК-фракций макрофагов от кроликов с коагулированным задним отделом подбугорной области (гипоталамуса).

А — количество бляшек на селезенку; Б — количество бляшек на 10^6 клеток селезенки; лизосомы: 1 — опыт, 2 — контроль; РНК: 3 — опыт, 4 — контроль.

угнетению катаболизма антигена (меченных ^{51}C эритроцитов барана) и задержке его в субклеточных фракциях макрофагов, главным образом в фаголизосомах.

На 10—15-й день после двусторонней коагуляции заднего и дорсального полей подбугорной области у кроликов наблюдали отчетливое понижение активности катепсина D в лизосомной фракции макрофагов перитонеального экссудата. Это истинное снижение активности фермента, так как его обнаруживали одновременно в лизосомной и цитоплазматической фракциях макрофагов при выраженной стабилизации мембран лизосом.

Исследование иммуногенности антигена, связанного с фракциями лизосом и РНК макрофагов от животных с коагулированным задним отделом подбугорной области, показало, что иммуногенность их значительно ниже, чем у тех же фракций, выделенных от неоперированных и получивших то же количество антигена животных (рис. 27). Следовательно, в этом случае речь идет, вероятно, о недостаточном переваривании антигена, а не просто о его аккумуляции в фаголизосомной или РНК-фракции. Таким образом, коагуляция определенных зон подбугорной области оказывала значительное влияние на функции лизосомного аппарата. При культивировании макрофагов, взятых от оперированных животных через 2 нед после операции *in vitro* функция их лизосомного аппарата продолжала оставаться нарушенной. Следовательно, из-

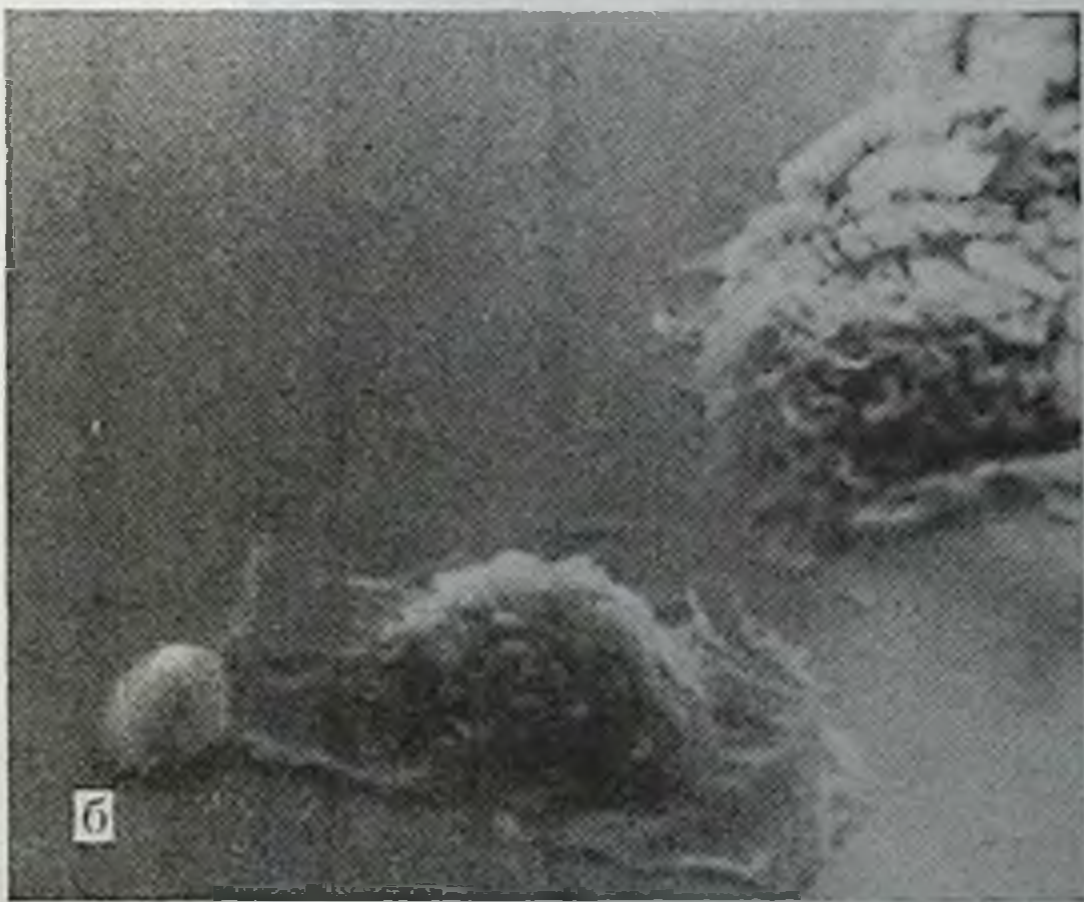
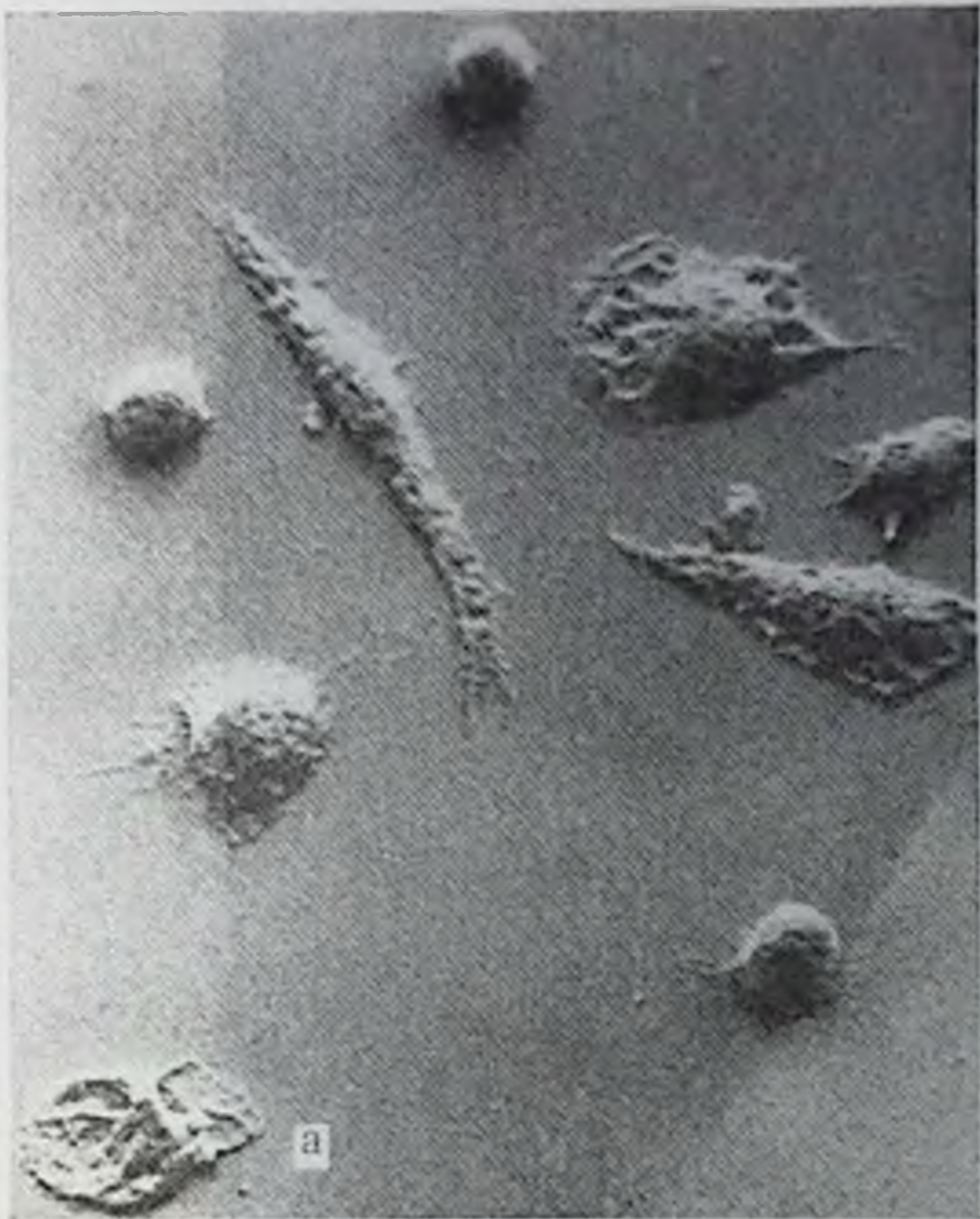


Рис. 28. Макрофаги от животных с коагулированным задним или передним отделом подбугорной области.
а — макрофаг (контроль). $\times 1000$; б — то же. $\times 3000$.

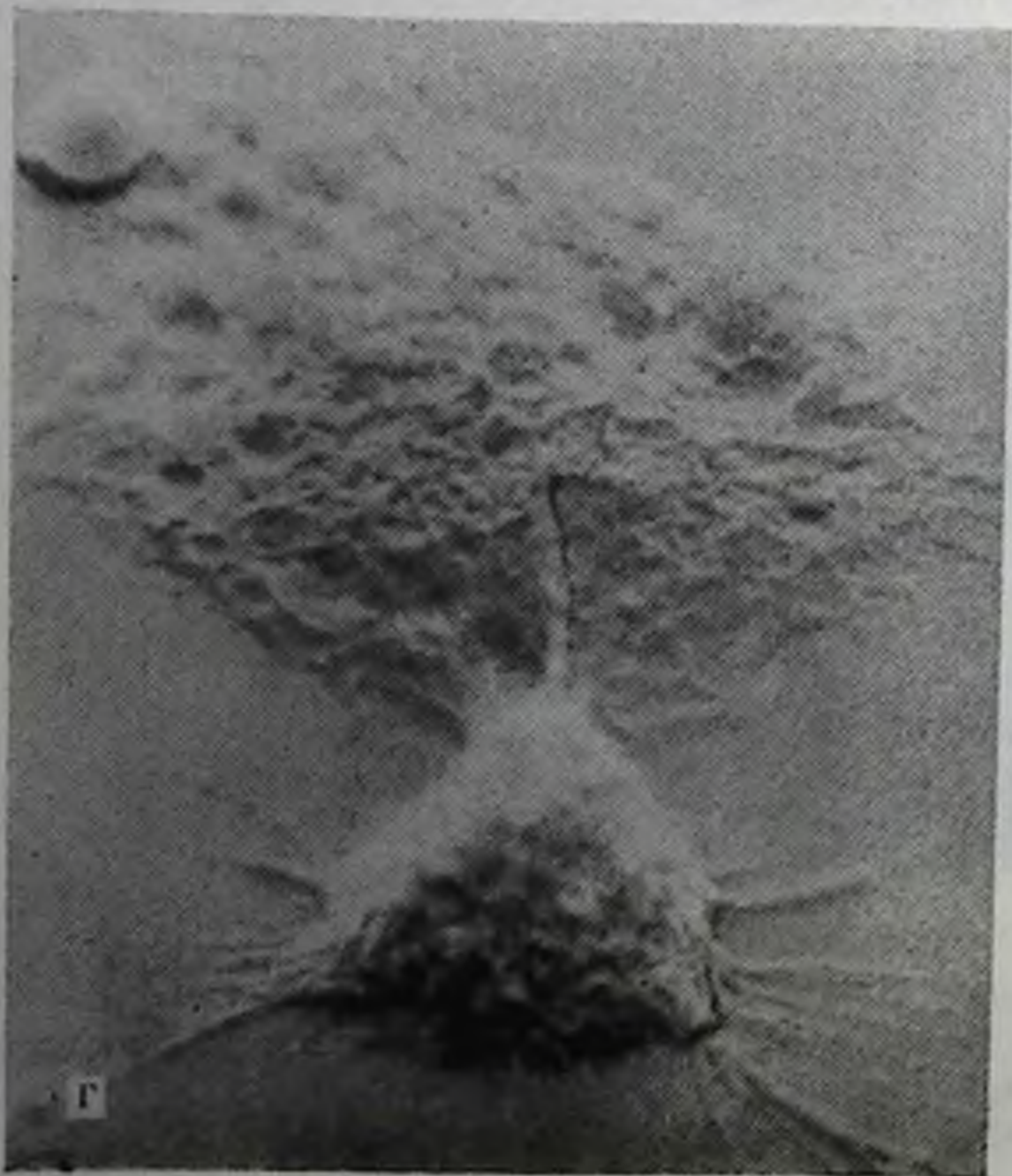


Рис. 28 (продол-
жение).

в — макрофаги после
коагуляции заднего
отдела подбугорной
области. $\times 1000$; г —
то же. $\times 3000$.

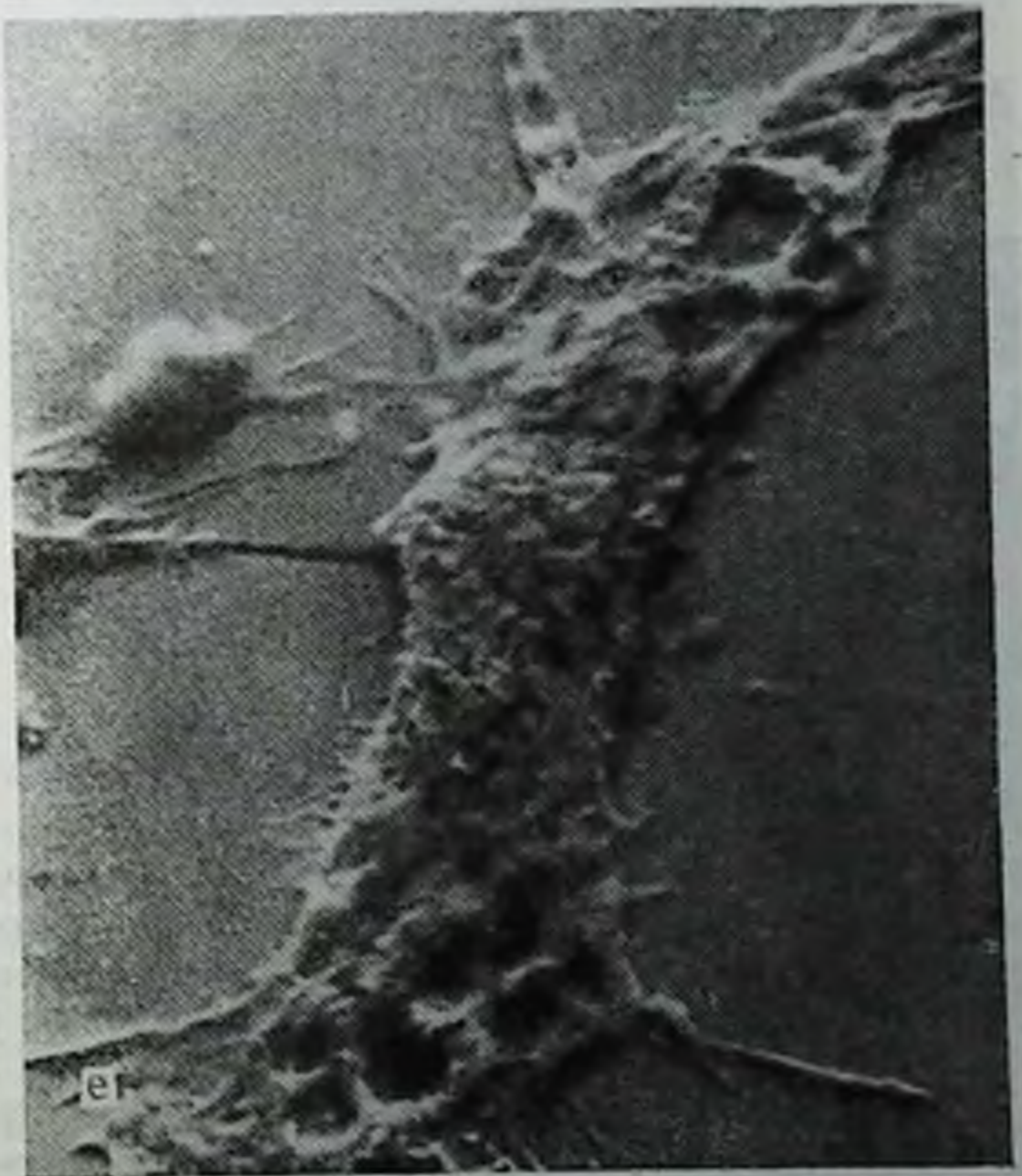


Рис. 28 (продол-
жение).

д — макрофаги после
коагуляции передне-
го отдела подбугор-
ной области. $\times 1000$;
е — то же. $\times 3000$.

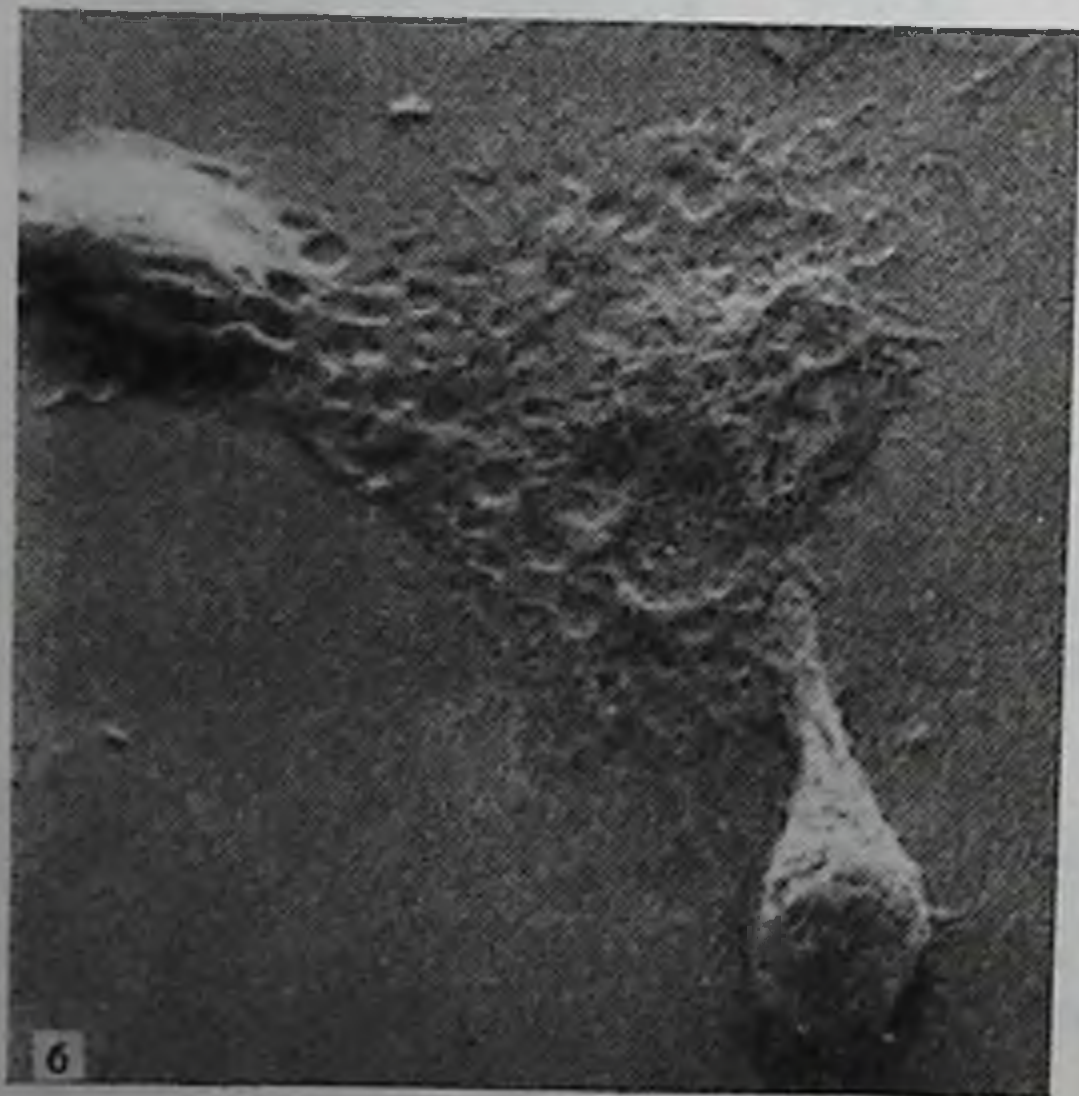
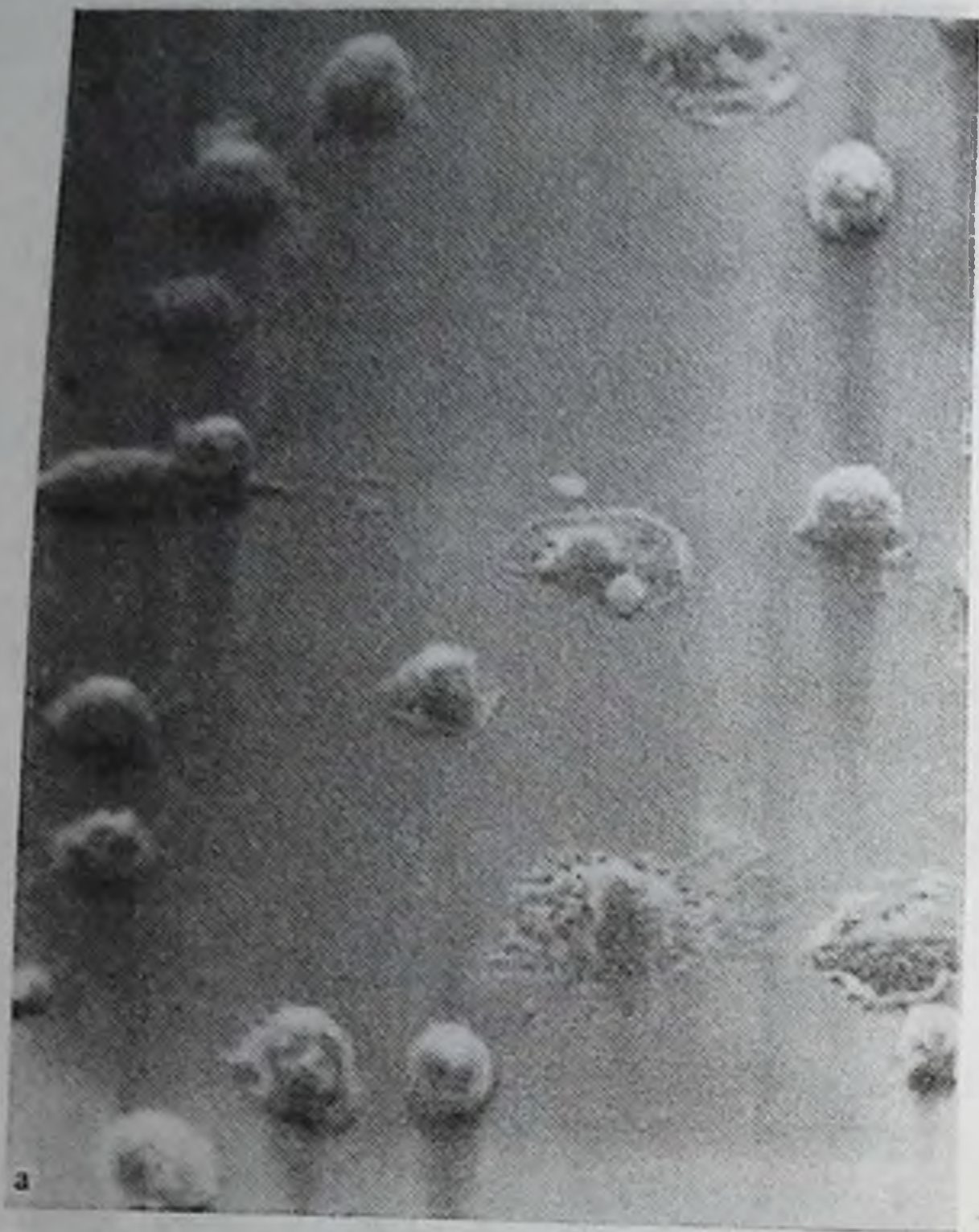


Рис. 29. Фагоцитоз макрофагами, полученными от животных с коагуляцией заднего и переднего отделов подбугорной области. а — контроль. $\times 1000$; б — то же. $\times 3000$.

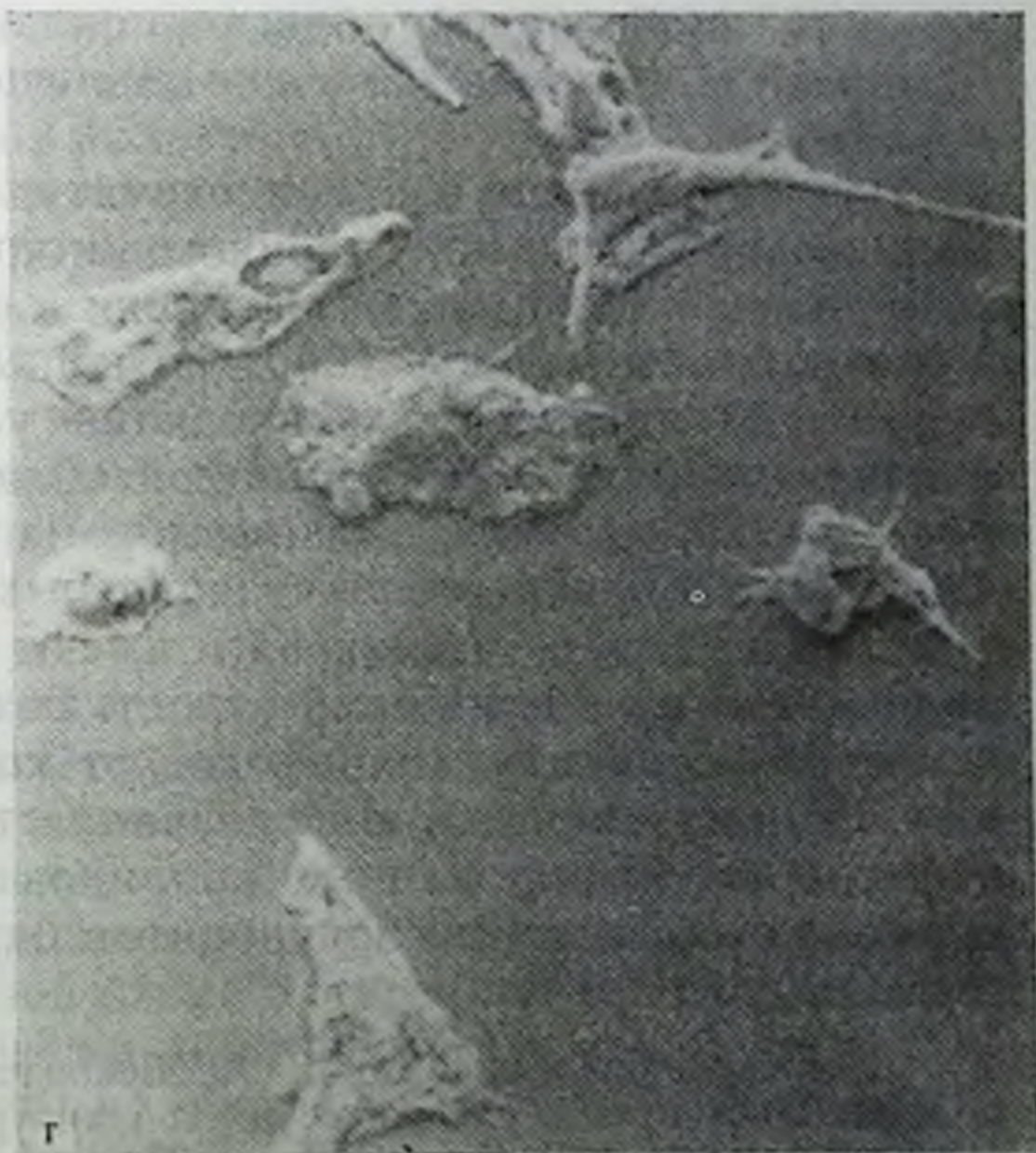
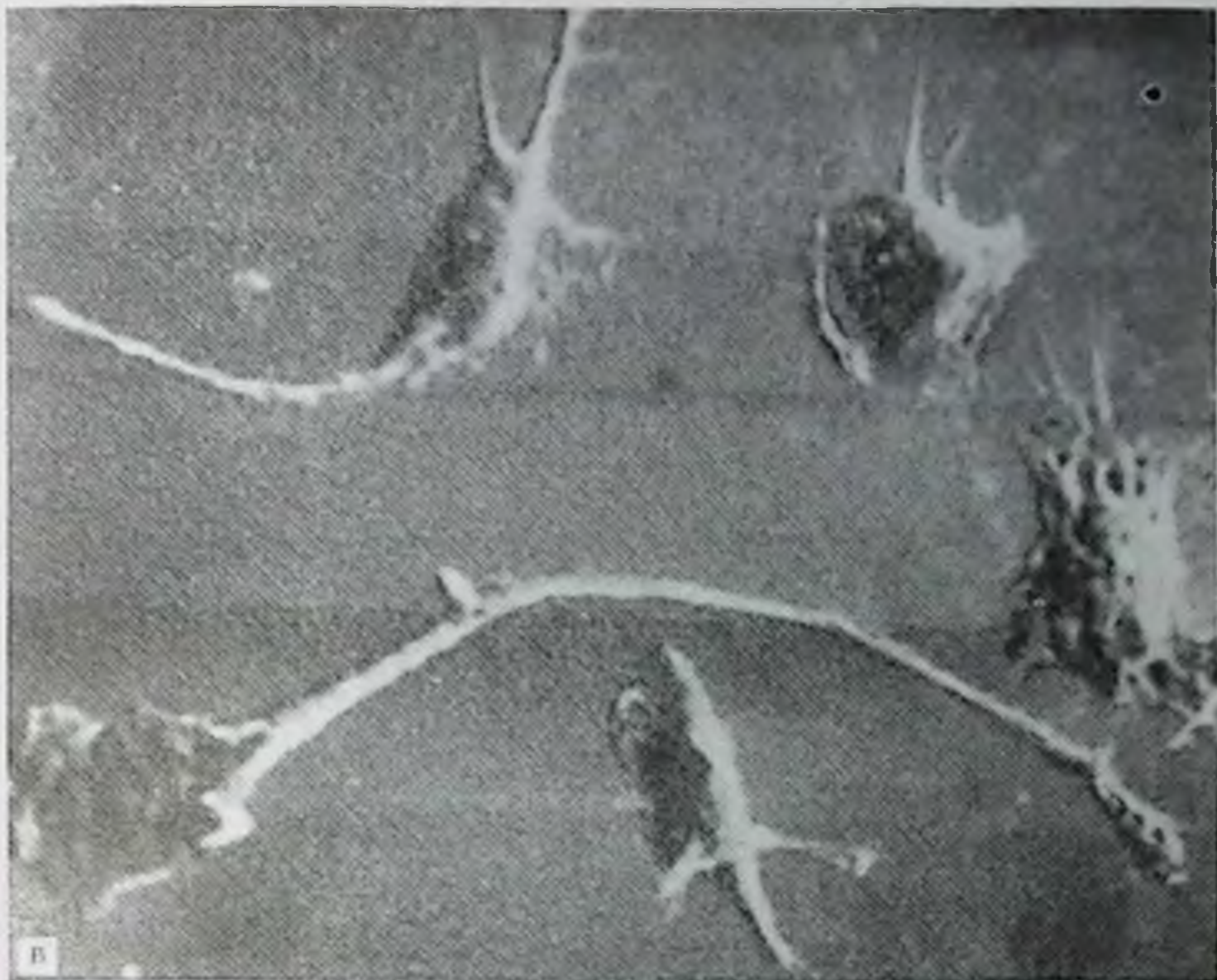


Рис. 29 (продол-
жение).

в — коагуляция пе-
реднего отдела под-
бугорной области.

Х1000; г — коагуля-
ция переднего отдела
подбугорной обла-
сти. Х1000.

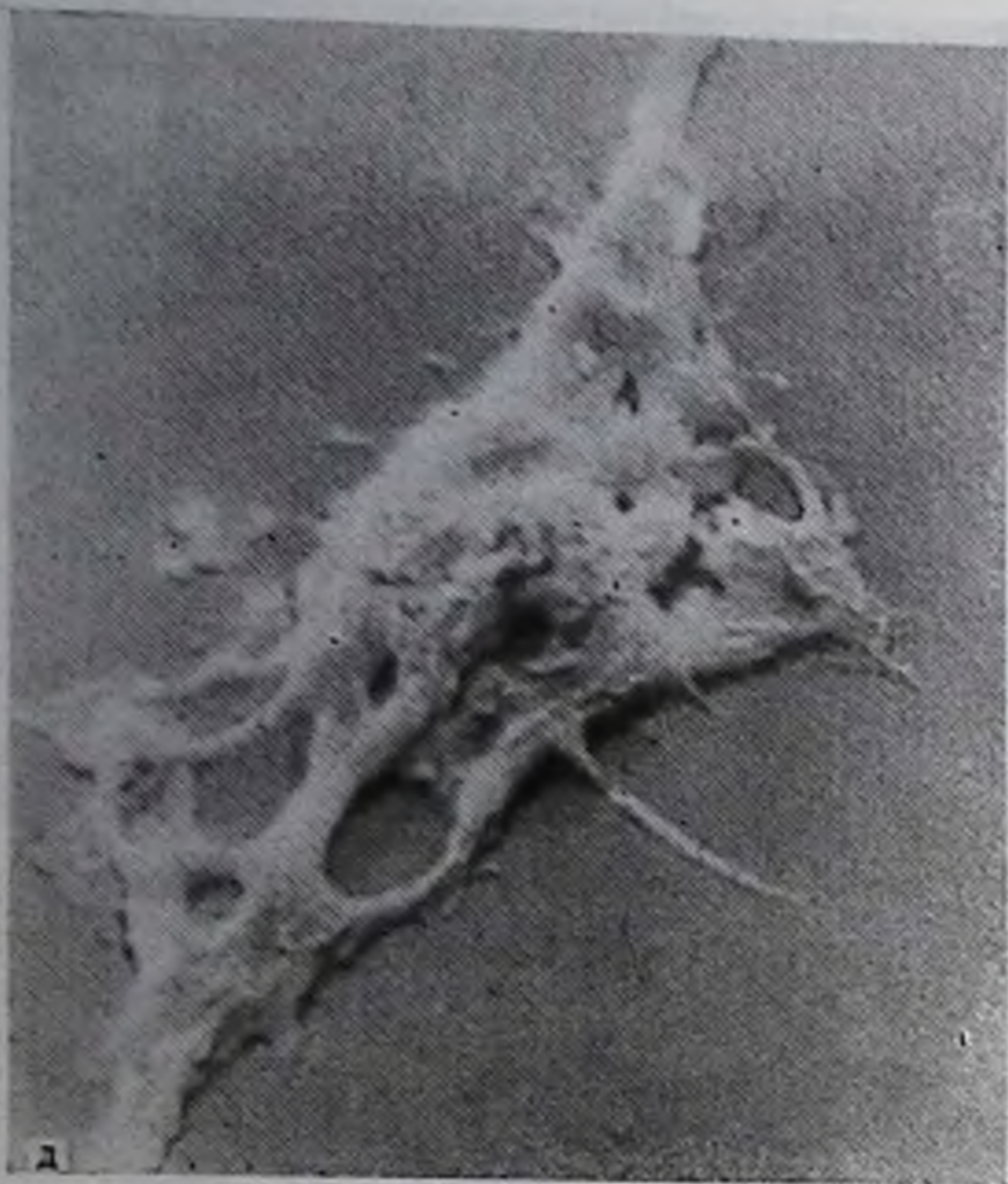


Рис. 29 (продолжение).

д — то же. $\times 3000$.

менения, вызываемые нарушениями модулирующего влияния подбугорной области, оказываются довольно стойкими и сохраняются после извлечения макрофагов из организма.

Изучение поверхностных структур макрофагов с помощью растрового электронного микроскопа¹ позволило установить существенные различия в строении наружной цитомембраны макрофагов, полученные от животных через 10—20 дней после коагуляции у них ядер заднего и переднего отделов подбугорной области. Как видно из рис. 28 и 29, наружная цитомембрана макрофагов, полученных от оперированных животных, резко изменена (рис. 28, в, г, д, е). Макрофаги имеют вытянутую ромбовидную форму с длинными отростками, которые никогда не обнаруживали у макрофагов от контрольных животных. Резкие отличия в конфигурации и поверхности макрофагов от оперированных кроликов сохраняются и во время фагоцитоза ими эритроцитов барана (рис. 29, в, г,

¹ Исследования выполнены В. А. Шекояном в лаборатории морфологии Института сердечно-сосудистой хирургии АМН СССР, руководимой проф. Л. Д. Крымским.

д, е). Таким образом, эксперименты В. А. Шекояна с соавт. (1975) убедительно демонстрируют, что коагуляция заднего отдела подбугорной области существенно сказывается на функции макрофагов, при этом страдает не процесс захвата макрофагами антигена, а их способность к его перевариванию. Вероятно, форма и функция макрофагов тесно связаны между собой и находятся под контролем ЦНС — ее подбугорной области и подчиняются нейрогуморальной регуляции.

Можно предположить, что изменение функции макрофагов имеет значение и для выработки специфического иммунитета, так что угнетение антителообразования, наблюдавшееся при разрушении определенных зон подбугорья рядом авторов, может быть связано с изменением функции лизосомного аппарата клеток МФС.

Разбирая вопрос о центральной регуляции функции клеток МФС, следует иметь в виду вероятность существования обратной связи, т. е. влияния клеток МФС с их сложной жизнедеятельностью и высокой синтетической активностью на центральные регуляторные механизмы. Весьма возможно, что на месте вопросительного знака, поставленного в схеме Г. Селье (1972), между стрессором и подбугорной областью, следует поместить клетки МФС, благодаря деятельности которых раздражение, вызываемое стрессором (обычно белковым продуктом), достигает подбугорной области.

Анализируя роль клеток МФС в поддержании гомеостаза, нельзя не упомянуть о гипотезах, которые приписывают им роль клеток памяти или анализируют механизм их действия с других общебиологических позиций. А так как природа часто использует одинаковые модели в строении материи и ее превращений, наиболее наглядным примером чего может служить строение атома и солнечной системы, то эти представления кажутся нам весьма интересными.

Роль макрофагов в иммунном ответе пытались сравнить с регуляторной функцией механизма обеспечения в электронике (*servomechanism*). Этот механизм получает и хранит сигналы, усиливает и трансформирует их и контролирует уровень ответа, влияя на вызывающий его сигнал. В данной схеме антиген играет роль сигнала, макрофаги фактически действуют как механизм обеспечения, а лимфоциты являются исполнителями информации (Schwartz et al., 1970).

Разные исследователи сходятся во мнении, что есть общие черты в механизмах памяти, будь то генетическая, иммунологическая или обычная память.

Занимаясь анализом функций различных систем нейронных структур, составляющих мозг, К. Прибрам (1975) пришел к заключению, что память формируется путем многократного перекодирования получаемой информации и многократной перестройки собственной активности мозга. При этом длительно сохраняющиеся изменения происходят и в синаптических аппаратах мозговой ткани. Это дает основание рассматривать долговременную память как функцию скорее синапсов, чем процессов в самой нервной клетке. Естественно, что в самой основе процесса лежат биохимические механизмы и мембранные взаимодействия.

Делались попытки аргументировать существование иммунохимических механизмов нейрологической памяти, поскольку образование условных рефлексов может ускоряться путем введения неспецифических стимуляторов иммуногенеза, например, адьюванта Фрейнда (И. П. Ашмарин, А. Е. Антипенко, 1973).

Наиболее интересная гипотеза о единых механизмах биологической памяти была сформулирована Л. Б. Меклером (1967), предположившим, что нейроны и макрофаги являются клетками со специализированной функцией — восприятия и передачи информации в направлении от белка к РНК.

Предполагается, что любой сигнал реализуется в появлении белка с новой конформацией. Данная конформация белка или информация о ней должны быть как-то зафиксированы, чему способствует возможность образования прочных связей между антигенной детерминантой (новой конформацией поверхности) и определенными аминокислотами, способными к образованию такой связи с этой детерминантой. В клетке аминокислоты находятся в комплексе с РНК и, таким образом, структура антигенной детерминанты переводится на язык нуклеотидной последовательности. Допускается, что на матрице ориентированных РНК происходит синтез мРНК, что ведет к образованию в дальнейшем стабильных структур. В таком случае комплекс антигена с РНК, образующийся в макрофагах, индуцирует синтез специфического белка в иммунокомпетентных клетках, именно за счет передачи подобной мРНК, синтезирующейся в макрофаге под

влиянием захваченного ими антигена. В последнее время эта возможность продолжает интенсивно изучаться и об-суждаться (см. гл. III). Конечно, для полного понимания механизмов регуляции деятельности фагоцитирующих и иммунокомпетентных клеток в целостном организме мы еще не располагаем достаточным количеством необходи-мых фактов. Гипотезы по мере накопления должны не-сколько опережать факты и приближать к пониманию истины каждый раз на новом уровне фактов. Но следует помнить, что накопление фактов далеко не всегда позво-ляет получить истинную картину событий без их об-общения.

Глава VII

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МАКРОФАГОВ И ИХ ЛИЗОСОМНОГО АППАРАТА

Получение перитонеальных макрофагов

Нестимулированные макрофаги можно получить путем промывания брюшной полости животных (путем ее вскрытия или через иглу) раствором Хенкса с гепарином (5 ЕД/мл). Раствор Хенкса лучше употреблять без индикатора, так как окраска мешает судить о загрязненности смыва эритроцитами. Наиболее удобны для получения нестимулированных макрофагов мыши, так как в зависимости от линии мышей от одного животного можно получить 1×10^6 — 5×10^6 клеток, из которых только 30—40% являются макрофагами, а остальные относятся к лимфоидному ряду. От крысы можно получить 2×10^7 клеток, однако макрофагов среди них меньше половины. От морской свинки в среднем получают до 5×10^7 клеток, из которых 50—70% являются макрофагами.

У нестимулированных кроликов содержание макрофагов в брюшной полости очень невелико, и для исследования приходится пользоваться пулом клеток, полученных от 2—3 животных.

Значительно большие количества перитонеальных макрофагов получают после стимуляции животных, т. е. на 4-й день после предварительного введения в брюшную полость животных различных раздражителей. В экссудатах, полученных от стимулированных животных, большая часть клеток относится к макрофагам (87—90%).

Для стимуляции кроликов используют стерильное минеральное масло (50 мл), гликоген в дозе до 200 мг на кролика и мясо-пептонный бульон в дозе 150—200 мл. Самый большой выход клеток дает введение минерального масла или его смесей — до 1 — 4×10^8 клеток, среди которых содержится более чем 90% макрофагов. Однако не менее 20—25% клеток содержат фагоцитированные капли масла, что делает этот способ получения макрофагов не всегда пригодным. При градиентном центрифугировании макрофаги, содержащие капли масла, остаются в самом верхнем слое.

У крыс, морских свинок и мышей чаще всего пользуются для стимуляции различными видами бульонов, которые внутрибрюшинно вводят крысам и морским свинкам по 5 мл, мышам — по 2 мл.

Мы в своих опытах использовали мясо-пептонный бульон, вводя его по 2 мл на мышь. На 4-е сутки животных убивают обезглавливанием. Брюшную полость промывают раствором Хенкса без индикатора с гепарином (5 ЕД/мл), обычно в дозах 2 мл на мышь, 10 мл на крысу, 20 мл на морскую свинку и 100—200 мл на кролика (Gesner, Howard, 1967).

Клетки для культивирования необходимо брать в стерильных условиях. Можно пользоваться отсасыванием введенной промывной жидкости через иглу, но часть клеток при этом травмируется. Поэтому лучше в стерильных условиях вскрыть брюшную полость и быстро отсосать содержимое стерильной пипеткой (моровской — у кроликов, пастеровской — у мышей). Сосуды, в которые берут экссудат, должны находиться во льду, чтобы избежать или свести до минимума прилипание макрофагов к стенкам сосуда. Можно пользоваться силиконированной посудой, что также препятствует прилипанию макрофагов. Смыв фильтруют через марлю. Количество клеток подсчитывают в камере Горяева. Клеточную суспензию центрифугируют при 1000 об/мин или 250—300 g в течение 10 мин, отмывают 1—2 раза от белков экссудата лучше всего 0,34 М раствором сахарозы, который препятствует агрегации клеток. Затем клетки ресуспендируют в необходимом количестве среды или используют в соответствии с условиями опыта.

Получение альвеолярных макрофагов

Достаточно чистую популяцию альвеолярных макрофагов можно получить от кроликов, морских свинок и крыс промыванием легких через трахею. Животных забивают эфиром или высоким обезглавливанием. Закрепляют верхний конец трахеи, отпрепаровывают и вынимают из грудной полости целиком сердечно-легочный препарат. Свободный конец трахей перевязывают шелком. Отмывают органы от крови, погружая их несколько раз в забуференный физиологический раствор. Затем через толстую иглу или канюлю вводят в трахею под давлением забуференный физиологический раствор до тех пор, пока легкие

целиком не расправятся (50—70 мл на кролика, 20—30 мл на морскую свинку). Затем подрезают трахею и промывная жидкость свободно стекает в подставленный сосуд. Процедуру можно повторить дважды для увеличения выхода клеток. Клетки центрифугируют, отмывают и ресуспендируют, как было описано для перитонеальных макрофагов. Прибавление к перфузионной жидкости 0,2% раствора версена несколько увеличивает выход макрофагов. Количество полученных таким образом клеток приблизительно одинаково для всех видов животных и равно $1-2 \times 10^7$ клеток, 90—95% которых являются макрофагами.

Для стимуляции животных с целью увеличения выхода макрофагов за 3 нед до получения клеток внутривенно вводят полный адьювант Фрейнда (0,2—0,3 мл) или двукратно лиофилизированную культуру БЦЖ (20 мг в 1 мл 0,01% раствора твина на кролика). Выход клеток достигает $1-3 \times 10^9$ у кроликов и примерно 1×10^8 у морских свинок. Содержание макрофагов в них колеблется от 80 до 85%.

Получение макрофагов из селезенки

Тщательная предварительная перфузия селезенки буферным физиологическим раствором облегчает эту процедуру. После освобождения от капсулы селезеночную ткань гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе и разводят в отношении 1:10 0,25 М раствора сахарозы. Суспензию выливают на чашки Петри, инкубируют 1—1½ ч при 37° С и затем сливают неприлипшие клетки. Осторожно, но тщательно троекратно промывают поверхность чашки раствором Хенкса и собирают прилипшие клетки с помощью резинового шпателя. На каждую чашку следует выливать не более 5 мл суспензии, иначе прилипающие клетки будут мешать хорошему распластыванию. Среди прилипших клеток много зернистых лейкоцитов. При культивировании в среде 199 с 10—20% бычьей сывороткой число макрофагов значительно возрастает.

Освобождение суспензии клеток селезенки от макрофагов и других прилипающих клеток

Для изучения роли макрофагов в осуществлении иммунного ответа, выяснения нужного количества этих клеток и степени их участия в индукции его на введение разных

антигенов необходимо иметь не только макрофаги, очищенные от лимфоцитов, но и суспензии лимфоцитов, полностью освобожденные от макрофагов.

Наиболее эффективным методом очистки от макрофагов суспензии клеток селезенки следует считать предложенную Ly и Mishell (1974) фильтрацию клеточной суспензии через сефадекс G-10.

Полученные описанным выше способом клетки селезенки суспендируют в буферном физиологическом растворе по Mishell и Dutton (1967). Суспензии дают несколько минут отстояться, чтобы осели грубые сгустки. Клетки осторожно сливают в чистые центрифужные пробирки и центрифугируют при 800 об/мин при температуре 4° С в течение 10 мин. Осевшие клетки до употребления хранят на льду. Перед фильтрацией удаляют буферный физиологический раствор и клетки суспендируют в свежей его порции, содержащей 1% пенициллина и стрептомицина и 5% сыворотки новорожденного теленка до концентрации $1,5 \times 10^8$ клеток на 1 мл.

Для подготовки сефадекса G-10 его помещают в буферный физиологический раствор определенного объема для набухания до тех пор, пока объем не увеличится в 3—4 раза. После набухания сефадекс трижды отмывают в том же объеме буферного физиологического раствора и ресуспендируют в $\frac{1}{3}$ его объема. Разливают по 35—40 мл во флаконы и автоклавируют при 110°С в течение 40 мин. В таком виде сефадекс может храниться несколько месяцев.

Для заполнения колонки в стерильный шприц емкостью 50 мл помещают около 10 г стеклянных бус класса IVA, туда же наливают смесь буферного физиологического раствора и сыворотки новорожденного теленка так, чтобы она покрывала бусы. Затем пипеткой осторожно наслаивают стерильный сефадекс в количестве 35—40 мл. После наложения удаляют со шприца колпачок и надевают иглу № 18. Выливают физиологический раствор и отмывают сефадекс 150 мл смеси буферного физиологического раствора с сывороткой новорожденного теленка. В конце промывания пипеткой равномерно распределяют верхний слой сефадекса, наслаивают на него от 2 до 4 мл суспензии клеток ($1,5 \times 10^8$ клеток на 1 мл) до проникновения их в верхний слой сефадекса. Через колонку свободно пропускают 20—25 мл буферного физиологического раствора с сывороткой новорожденного теленка. С фильт-

ратом выходит 30—40% клеток, среди которых практически отсутствуют прилипающие клетки.

Разделение клеток проходит успешнее, если пользуются прогретой до 50° С в течение 30 мин смесью буферного физиологического раствора с сывороткой новорожденного теленка или содержат всю колонку при 37° С.

Получение моноцитов и макрофагов из крови

Моноциты и макрофаги крови получают обычно из светлого слоя осадка, образовавшегося после центрифугирования гепаринизированной крови. Однако для получения монослоя моноцитов требуется довольно длительное культивирование клеток, позволяющее освободиться от зернистых лейкоцитов и лимфоцитов. Значительно удобнее и рентабельнее выделение и разделение белых клеток крови на колонках со стеклянной ватой. Оно основано на различной способности клеток прилипать к стеклу (Rabinowitz, 1964). Колонки желательно иметь из стекла рух. Оптимальные условия фильтрации достигаются при помещении 5 мл клеточной суспензии на колонку объемом 16 см × 1 см. Колонка должна оканчиваться тройником, нижний конец которого входит в пробирку через резиновую пробку, чтобы система была замкнутой и клетки можно было культивировать определенное время. Колонка наполняется перемежающимися слоями стеклянной ваты и стеклянных бус на 85% и помещается в кожух с водяным обогревом для регуляции температуры. Желательно всю посуду, включая бусы и вату, силиконировать.

В содержащую гепарин кровь (0,1 мл 1% раствора гепарина на 10 мл крови) прибавляют 5% декстрана в растворе Хенкса (1 мл на 5 мл крови) для лучшего осаждения эритроцитов и отстаивают при комнатной температуре в пробирках с притертыми пробками. Оставшуюся взвесь белых клеток центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин. Затем к осадку прибавляют необходимое количество супернатанта плазмы (следует учитывать размер колонки: на колонку длиной в 40 см — около 75 мл суспензии). Клеточную суспензию, доведенную до объема, подходящего для данной колонки, вводят в нее шприцем, который оставляют для образования замкнутой системы. Инкубируют в течение 30 мин при 37° С. В первую очередь собирают неприлипающие клетки — лимфоциты, для чего колонку промывают оставшейся пос-

ле осаждения клеток плазмой (37° С) через шприц. Скорость промывания зависит от величины колонки (для маленькой — 15—20 капель в 1 мин). Промывание прекращают после того, как начинают выходить зернистые лейкоциты (обычно при уравнивании залитого объема с объемом плазмы, затраченным на промывание). До начала сбора зернистых лейкоцитов колонку быстро промывают большим объемом (70—100 мл на малую колонку) 20% раствора той же плазмы в растворе Хенкса. Для сбора зернистых лейкоцитов колонку промывают 0,02% раствором версена (ЭДТА) в буферном растворе, свободном от Ca^{2+} и Mg^{2+} (пропись реактивов на 1 л раствора: 0,2 г ЭДТА, 8 г NaCl, 2 г KClO, 1,15 г Na_2HPO_4 , 0,2 г KH_2PO_4 и 0,2 г глюкозы; pH 7,4). Для лучшей сохранности клеток в пробирки с зернистыми лейкоцитами прибавляют сыворотку. При продолжительном промывании этим раствором начинают выходить моноциты, слегка загрязненные зернистыми лейкоцитами. Для дальнейшей очистки клетки центрифугируют 800 об/мин, ресуспендируют в 5 мл плазмы и повторно пропускают через малую колонку, инкубируют в течение 10 мин при 37° С и снимают тем же раствором версена. Моноциты за 6—7 дней культивирования превращаются в зрелые макрофаги. Следует иметь в виду, что на колонке не происходит отделения лимфоцитов от эритроцитов, от которых следует избавляться раньше. Крайне важно при работе пользоваться свежей плазмой.

Выделение макрофагов [звездчатых эндотелиоцитов] из печени

Наиболее подробно этот метод описан Garvey (1961). Животным до умерщвления вводят гепарин. Печень тщательно перфузируют через воротную вену, чтобы избавиться от крови. Затем печень нарезают маленькими кусочками (не более 2 мм толщиной) и инкубируют с 0,1—0,01% клостридиопептидазой А при 10° С при постоянном встряхивании в течение 3 ч. Затем клетки центрифугируют при 100 об/мин и инкубируют с 0,3% раствором трипсина при 37° С при встряхивании в течение 30 мин. Суспензию фильтруют через марлю, клетки четырехкратно отмывают с последующим центрифугированием. Выход клеток из одной печени мыши равен 2×10^7 ; макрофагов среди них около 90%.

Разделение клеток перитонеального экссудата методом градиентного центрифугирования

Для получения субклассов перитонеальных макрофагов используют фико́лловый и альбуминовый (V фракция сывороточного альбумина быка) градиенты плотности. Разделение в фико́лловом градиенте плотности подробно описано Walker (1973). До использования фико́лла рекомендуют растворить, диализовать против деионизированной воды, лиофилизировать, приготовить 20% раствор на растворителе Ф и хранить для нескольких опытов при -20°C . Растворитель Ф содержит на 1 л деионизированной воды: 8 г NaCl, 0,4 г KCl, 1,072 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,095 г KH_2PO_4 , 0,020 г фенолового красного и 1% сыворотки новорожденного теленка; pH доводят до 7,4 0,3 M растворами NaOH или HCl.

Перед использованием и проверкой основного раствора на рефрактометре при -24°C готовят необходимые концентрации на растворителе Ф: 5% — $R=1,3412$, 8% — $R=1,3452$, 9% — $R=1,3472$ и 100% — $R=1,3482$. Готовят прерывистый градиент в центрифужных пробирках емкостью 15 мл, наслаивая на 2 мл 10% раствора фико́лла по 3 мл каждого разведения (5,8 и 9%). Все операции проводят на холоду. В каждую центрифужную пробирку наслаивают по 2 мл клеточной суспензии на растворе фико́лла (1×10^7 мл), центрифугируют при 2000 об/мин в течение 15 мин при 4°C . В зависимости от условий опыта и вида разделяемых клеток режим центрифугирования может меняться.

Для разделения клеток в альбуминовом градиенте плотности были использованы как непрерывный, так и прерывистый градиенты (Rice, Fishman, 1974). Для приготовления градиента используют V фракцию бычьего сывороточного альбумина (Nutritional Biochemical calcs Corporation Ohio).

Буферные растворы:

Раствор R: на 1 л деионизированной воды берут 8,7 г NaCl (0,147 M), 0,4833 г KCl (0,0064 M), 1,6 мл 0,067 M раствора KH_2PO_4 , 28,4 мл 0,067 M раствора Na_2HPO_4 , pH 7,3. Рефрактометрический показатель 1,3342.

Раствор A: на 1 л деионизированной воды берут 8,7 г NaCl (0,147 M), 0,4833 г KCl (0,0064 M), 0,8 мл

0,067 М раствора KH_2PO_4 14,2 мл 0,067 М раствора Na_2HPO_4 . Воду добавляют до 990 мл и только после автоклавирования прибавляют 10 мл сыворотки телят, рН 7,2. Клетки перитонеального экссудата берут и суспендируют в растворе А. Для приготовления основного раствора V фракции сывороточного альбумина быка его растворяют в деионизированной воде до 15% (по соотношению массы к объему) и диализуют против 20 объемов деионизированной воды при 4°C в течение 2 сут, 4 раза меняя воду. Лиофилизируют, растворяют в растворе А до конечной концентрации 30% (по соотношению массы к объему); центрифугируют при 15 000 об/мин в течение 15 мин, супернатант сохраняют при —20° С и используют его как основной раствор (V фракция).

Непрерывный градиент плотности готовят путем наложения на 30% V фракцию сывороточного альбумина быка ту же 5—15% фракцию.

Пятую фракцию сывороточного альбумина быка для прерывистого градиента плотности (5, 8, 11, 15 и 20%) готовят из основного раствора при хорошем перемешивании с раствором Р и проверкой плотности на рефрактометре. Вся работа ведется при 4° С. Каждую концентрацию градиента в объеме 5 мл наслаивают на 2,5 мл 30% раствора V фракции сывороточного альбумина быка. Исследуемые клетки суспендируют в 5% растворе альбумина (2×10^7 мл) и 7,5 мл ($1,5 \times 10^8$ клеток) наслаивают на соответствующий раствор альбумина. Центрифугируют при 12 000 об/мин 30 мин на роторе SW25 («Spinco»). Субпопуляции клеток каждого слоя собирают через иглу № 18 в отдельные центрифужные пробирки, разводят до 50 мл раствором А и центрифугируют 12 мин при 1500 об/мин при 4° С. Затем осадок клеток суспендируют в 25 мл раствора А и центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Клетки суспендируют в 10 мл раствора А и подсчитывают их количество в камере Горяева. Во всех слоях определяют жизнеспособность клеток.

Определение жизнеспособности клеток моноклеарной фагоцитирующей системы

Метод основан на окрашивании трипановым или метиленовым синим только погибших клеток. В микропипетку набирают 0,01 мл клеточной взвеси, а затем до 0,1 мл 0,1%

раствора метиленового синего. Смешивают на стекле и подсчитывают общее количество клеток в камере Горяева и по отношению к ним вычисляют процент окрашенных клеток. Можно смешивать во влажной камере (предметное стекло с луночкой, прикрытой покровным, смазанным по краям вазелином стеклом) 3 капли клеточной суспензии с 1 каплей 1% раствора трипанового синего. Инкубируют 30 мин при 37° С и подсчитывают в камере Горяева процент окрашенных, т. е. погибших, клеток. Во влажных камерах под микроскопом определяют также подвижность клеток.

Культивирование макрофагов

Макрофаги можно культивировать *in vitro* гораздо дольше, чем лимфоциты. В специально подобранных средах продолжительность культивирования может достигать 200 дней (Chang, 1964). Желательно прибавление в среду до 40% нормальной лошадиной сыворотки и 10% экстракта коровьего эмбриона, разведенного физиологическим раствором в отношении 1:5. Обязательно прибавление антибиотиков: пенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Среду следует менять 2 раза в неделю.

Макрофаги, предназначенные для длительного культивирования, после прилипания лучше промыть средой, а не центрифугировать сразу после извлечения из брюшной полости.

В наших опытах (Х. М. Иси́на, 1974) для получения клеток перитонеального экссудата животных убивали эфиром, обрабатывали их тушки 5% раствором хлорамина и йодной настойки. В асептических условиях вскрывали послойно брюшную полость, промывали ее раствором Хенкса с гепарином (5 ЕД/мл). Промывную жидкость собирали во флакон, помещенный в ледяную баню. Подсчитывали количество клеток и разводили раствором Хенкса так, чтобы в 1 мл содержалось 1×10^6 клеток. 2 мл взвеси клеток (2×10^6) помещали в пробирки с покровными стеклами и инкубировали 1 ч при 37° С для прикрепления клеток к стеклу. Неприлипшие клетки отмывали средой 199 с 10% бычьей сывороткой, а макрофаги культивировали в той же среде. В процессе культивирования моноклеарные клетки превращаются в зрелые активные макрофаги.

Метка макрофагов

Изучение скорости синтеза ДНК у макрофагов по включению ^3H -тимидина довольно затруднительно, поскольку, как уже упоминалось (см. гл. I), метку включает менее 1% клеток. Однако синтез ДНК у макрофагов может быть стимулирован предварительным (за 2 сут) введением животным, служащим источником клеток, эндотоксина или антигена (за 1 сут), ранее сенсibilизированным им животным. Увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК макрофагов можно получить и при прибавлении антигена *in vitro* в культуру макрофагов от сенсibilизированных им животных. Иногда для метки макрофагов или других клеток МФС используют их способность фагоцитировать коллоидный уголь (^{14}C) или коллоидное золото (^{198}Au).

В своих опытах по изучению фагоцитоза и скорости переваривания макрофагами разных антигенов мы пользовались антигенами, мечеными ранее определенным радиоактивным элементом (эритроциты мышей или барана — ^{51}Cr , ^{14}C -тифозная вакцина и ^{14}C -альбумин). Для исследования захвата и переваривания антигена макрофагами *in vivo* и распределения его по субклеточным фракциям у исследуемых животных в разные сроки, начиная с 30 мин после введения меченых антигенов, брали КПЭ, клетки селезенки или макрофаги из других источников и кровь (радиоактивность белков сыворотки крови определяли для контроля).

Макрофаги осаждали центрифугированием после подсчета общего количества клеток в экссудате (при 1000 об/мин в течение 10 мин). Супернатант (бесклеточный экссудат) использовали для исследования. Макрофаги отмывали от белков экссудата 0,34 М раствором сахарозы трижды с последующим центрифугированием при том же режиме. Клетки гомогенизировали в течение 2 мин в стеклянном гомогенизаторе, гомогенат центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 мин. Осадок состоит из мембран, ядер и митохондрий. Супернатант центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 20 мин при 4° С. В осадок попадала лизосомная фракция, которую ресуспендировали в 0,34 М растворе сахарозы. Супернатант после этого центрифугирования представляет собой цитоплазматическую фракцию. Для выделения клеток МФС из селезенки последнюю после освобождения от капсулы

гомогенизировали в течение 1 мин, прибавляя на 1 г ткани 10 мл 0,25 М раствора сахарозы. Дальнейшие процедуры не отличались от описанных. Белки в каждой из исследуемых фракций осаждали 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в отношении 1:1, затем фильтровали через мембранные фильтры с величиной пор 0,3—0,5 мкм (исследование проводили в параллельных пробах). Каждый фильтр промывали 5% раствором ТХУ и спиртом.

После подсушивания фильтры помещали в стаканчики с толуолом и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике. Параллельно в каждой пробе определяли белок по Лоури и рассчитывали количество импульсов на 1 мг белка.

При использовании в качестве антигена ^{51}Cr -эритроцитов барана и наличии счетчика Nuclear Chicago можно поместить испытуемый материал в равном количестве в 2 параллельные пробирки, закрыть их пробками и подсчитать количество импульсов в 1 мин, которое затем пересчитать на 1 мг белка. При определении захвата и переваривания меченого антигена макрофагами *in vitro* можно пользоваться методом, описанным Schmidtke и Ulanue (1971), для изучения захвата макрофагами меченого гемоцианина с некоторыми видоизменениями. Испытуемые клетки помещают по 2×10^7 в 5 мл раствора Хенкса в культуральные пробирки и инкубируют 1 ч при 37°C для прикрепления клеток. Затем среду меняют на среду 199 с 10% бычьей сыворотки и прибавляют меченый антиген. Макрофаги инкубируют в его присутствии в течение 1 ч при 37°C , после чего клетки 3 раза отмывают средой 199 с 10% бычьей сывороткой, затем еще 3 раза физиологическим раствором для удаления белков среды. Снимают макрофаги со стенок пробирки резиновым шпателем и суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора. О величине захвата и переваривания антигена макрофагами судят по радиоактивности клеток и культуральной среды, взятых через определенные интервалы времени.

Обработку материала для пересчета радиоактивности проводят по описанному ранее способу. Пробы с малым содержанием белка желательно промывать горячей 5% ТХУ.

Техника изучения фагоцитоза

В качестве объекта фагоцитоза удобно пользоваться полистероловым латексом с определенным диаметром частиц (1,8—2 нм). К 2 мл цельной крови или к суспензии клеток (1×10^7) в 2 мл среды, содержащей бычью сыворотку и среду 199 в отношении 1:1, прибавляют 0,2 мл суспензии, содержащей 2×10^6 частиц латекса на 1 мл раствора Хенкса. Инкубируют 30 мин при 37°C при постоянном встряхивании. Определение интенсивности фагоцитоза ведут в фазово-контрастном микроскопе.

При определении фагоцитоза микроорганизмов клетками МФС крови в качестве тест-культуры удобнее пользоваться бактериями, а не кокками. Смесь 2 частей крови с 1 частью 2% цитрата натрия и 1 частью двухмиллиардной суточной культуры микроорганизма инкубируют 30 мин при 37°C . По окончании инкубации приготавливают мазки, которые после фиксирования смесью Никифорова окрашивают по Гимзе — Романовскому. Подсчет фагоцитированных микробов ведут в 50 фагоцитах. Показателем фагоцитарной активности служит среднее фагоцитарное число по Дэвису: количество микробов или частиц, поглощенных одной клеткой, умножают на число таких клеток и сумму произведений делят на 50, т. е. на общее число подсчитанных в каждой мазке клеток. Подсчет ведут в 2 параллельных мазках.

При исследовании фагоцитоза в монослое макрофагов очень важно использовать стандартные монослои одного и того же возраста. Поэтому сначала готовят монослой макрофагов. В пробирки с покровными стеклами наливают по 1,5 мл среды, содержащей $1,5 \times 2 \times 10^6$ клеток в 1 мл, инкубируют при 37°C в течение 1 сут, после чего среду меняют и используют монослой для исследования. Можно работать с монослоями, образующимися через 1 ч после инкубации клеток при 37°C . Важно, чтобы в однотипных опытах работали с монослоями клеток МФС одного возраста. Покровные стекла с прилипшими клетками осторожно промывают средой и переносят в пробирки с суспензией тест-микробов в раствор Тироде (1 мл) с учетом, чтобы в среднем на 1 клетку приходилось 100 микроорганизмов. Инкубируют в течение 1 ч при 37°C . При определении фагоцитоза с помощью грамотрицательных бактерий, у которых большую роль играет степень опсонизации, их целесообразно предварительно

инкубировать с нормальной сывороткой животных, служащих источником макрофагов в отношении 1:1 в течение 15 мин при 37°C, затем сыворотку следует удалить путем разведения раствором Тироде до отношения 1:200. Для контроля за размножением микроорганизмов во время инкубации с макрофагами одну из пробирок нагревают до 100° С в течение 15 мин, чтобы остановить рост микробов.

Для определения степени фагоцитоза клетками и выживания микробов внутри макрофагов рекомендованы следующие расчеты:

Если

N_1 — число микробов в супернатанте прогретого контроля,

N_2 — число микробов в супернатанте пробы,

C — число микробов в клетках пробы,

то $\frac{N_1 - N_2}{N_1} \cdot 100$ = процент микробов, фагоцитированных клетками,

и $\frac{C}{N_1 - N_2} \cdot 100$ = процент микробов, переживающих внутри клетки (Stuart, 1967).

Исследование скорости очищения кровотока от неорганических веществ (клиренс)

Очищение кровотока от внутривенно введенных неорганических веществ происходит главным образом благодаря захвату их фиксированными макрофагами сосудов в печени и селезенке. При этом звездчатые эндотелиоциты печени захватывают основную массу введенного материала (до 90%), а селезеночные макрофаги — остальное. В качестве тест-агента используют тушь, липидные эмульсии, вещества, меченные йодом или флюоресцентными красителями (Donald, Tennet, 1975).

В нашей лаборатории для изучения клиренса готовили смесь желатины с тушью. К 3 мл 3% раствора желатины добавляли 2 мл туши и полученную смесь в дозе 0,1 мл вводили в хвостовую вену мышам. Кровь из орбитальной вены начинали брать через 10 с после введения туши с интервалами в 3 мин в течение 20 мин.

Кровь в количестве 0,2 мл берут градуированной микропипеткой, промытой физиологическим раствором, содержащим гепарин (5 ЕД/мл), разводят в 2,8 мл того же

раствора. Наличие туши в пробах определяют на спектрофотометре при длине волны 650 нм. Контрольным фоном служат пробы крови, взятые от мышей, которым тушь не вводили. Сравнивая скорость очищения кровотока у разных линий мышей или разных видов животных, следует учитывать массу тела животного и массу его печени и селезенки и вести расчет исходя из соотношения между массой тела и суммарной массой этих органов.

Угнетение функции макрофагов («блокада» РЭС)

Полной блокады РЭС *in vivo* достичь не удастся. Для угнетения функции РЭС используют различные неорганические вещества, не перевариваемые клетками МФС.

Тушь в концентрации 10 мг/мл вводят мышам внутрибрюшинно или внутривенно в дозе 0,1 мл на мышь. Имеет значение доза туши и интервал времени между ее введением и тестированием блокады. Наибольшее угнетение антителообразования наблюдали при введении туши мышам за 1 день до антигена.

Кварц, накапливаясь в фаголизосомах, помимо блокады, может вызвать их разрывы, дегрануляцию макрофагов и, следовательно, гибель клеток. Это дает основание в ряде случаев использовать для инактивации макрофагов вместо туши частицы кварца (диаметром меньше 5 мкм). Вводят кремнезем внутрибрюшинно по 100 мг на мышь однократно или по 50 мг на мышь двукратно.

При прибавлении кварца в культуре клеток сначала готовят его взвесь из расчета 2 мг/мл, которую затем разводят используемой средой до конечной концентрации 100 мкг/мл.

В последнее время для инактивации макрофагов используют высокомолекулярную полигалактозу — каррагинан (Sigma Chem. Co), который оказывает цитотоксическое действие на макрофаги, не повреждая лимфоциты. Раствор каррагината 10 мг/мл вводят внутривенно в дозе 0,1 мл на мышь.

Определение цитотоксичности макрофагов

Цитотоксичность можно учитывать как по угнетению роста опухолевых клеток, так и по освобождению ^{51}Cr из заранее меченых клеток-мишеней. Последний метод поз-

воляет количественно оценить цитотоксичность испытуемых клеток.

Для культивирования макрофагов и различных клеток-мишеней в этих опытах пригодны среды Игла и 199, обогащенные прибавлением 10% инактивированной телячьей сыворотки. В среду можно прибавить пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (1000 мкг/мл).

На чашку Петри диаметром 3,5 см помещают 2×10^6 КПЭ в 0,5 мл и добавляют 1,5 мл среды. Инкубируют в течение 1—2 ч при 37°C для прилипания макрофагов, после чего монослой осторожно промывают средой для удаления лимфоцитов. На монослой помещают 5×10^4 используемых в опыте меченых клеток-мишеней в 2 мл среды и инкубируют в зависимости от цели опыта от 3 ч до 3 сут при 37°C .

Цитотоксическое действие макрофагов может проявиться уже при 10 макрофагах на одну клетку, но обычно применяют соотношение 40 макрофагов на одну клетку. После окончания инкубации жидкое содержимое чашки переносят в центрифужные пробирки, куда прибавляют по 1 мл охлажденной среды. Центрифугируют при 1500—2000 об/мин в течение 10 мин при 4°C . Из каждой пробирки 1 мл недостаточной жидкости переносят в пробирки для подсчета освободившегося в среду радиоактивного хрома.

Результаты выражают в процентах от максимального выхода хрома из клеток, наблюдающегося при четырехкратном замораживании и оттаивании того же количества клеток-мишеней, разведенных до замораживания дистиллированной водой в 4 раза.

Флюорохромирование культур макрофагов

Наиболее удобен метод, рекомендованный М. Я. Корном и соавт. (1970, 1971). Для приготовления акридинового оранжевого 0,1 г красителя растворяют в 100 мл подогретой бидистиллированной воды. После выдерживания в течение 1 сут фильтруют через бумажный фильтр в стерильный флакон из темного стекла, хранят при 4°C (основной раствор 1:1000). Для получения нужного разведения основной раствор разводят средой 199 до 2 мкг/мл (рабочее разведение). К 2 мл культуры макрофагов прибавляют по 0,2 мл раствора красителя в разведении 1:50 000 до конечного разведения 1:500 000. Клетки инку-

бируют с акридиновым оранжевым в течение 30 мин при 37° С, после чего препараты дважды отмывают средой без красителя и оставляют в свежей порции среды на 18 ч при 37° С.

Под люминесцентным микроскопом в цитоплазме клеток отчетливо видны красные цитоплазматические гранулы, которые, по данным ряда авторов, являются лизосомами. Метод позволяет судить о действии различных агентов на лизосомный аппарат макрофагов.

Метод титрования антисывороток к субклеточным фракциям клеток МФС на прижизненно флюорохромированной культуре макрофагов

Метод разработан в нашей лаборатории Х. М. Исиной и М. Я. Корном (1973). Двукратные разведения испытуемых антисывороток прибавляли к предварительно флюорохромированным культурам макрофагов. Антисыворотки разводили средой 199, содержащей 10% бычьей сыворотки. К разведениям антисыворотки, предварительно прогретой при 56° С в течение 30 мин, прибавляли стандартный лиофилизированный комплемент в разведении 1:10 и инкубировали в течение 2 ч при 37° С. После инкубации культуры макрофагов на покровных стеклах трижды отмывали средой и помещали клетками вниз на предметное стекло, оставив капиллярное пространство, заполненное средой 199. Препараты просматривали под люминесцентным микроскопом (об.×10, ок.×7). Подсчитывали число клеток, содержащих красные цитоплазматические гранулы и не имеющих их (остающихся зелеными). Количество «красных» и «зеленых» макрофагов выражали в процентах. Подсчет необходимо проводить в 3—4 параллельных препаратах. За титр антисыворотки принимали разведение, при котором количество «зеленых» клеток (т. е. не содержащих гранул) равно 50%. В качестве контроля использовали флюорохромированные макрофаги: 1) не обработанные антисыворотками, но с добавлением комплемента, 2) с добавлением нормальной кроличьей сыворотки и комплемента, 3) с добавлением антисыворотки без комплемента. Процесс идет только в присутствии комплемента, что указывает на иммунологический характер реакции.

Определение чистоты лизосомных фракций с помощью акридинового оранжевого

Аккумуляция акридинового оранжевого в цитоплазматических гранулах клеток МФС происходит как при 37° С, так и при 4° С, что свидетельствует о пассивном характере процесса. Это позволило рекомендовать данный тест для быстрого определения чистоты лизосомных фракций, выделяемых из клеток, поскольку изолированные гранулы окрашиваются так же, как и гранулы неразрушенной клетки.

Субклеточные фракции, полученные при дифференциальном центрифугировании гомогенатов клеток, в объеме 0,02 мл смешивают на предметном стекле с раствором акридинового оранжевого в суспензионной среде до концентрации 50 мкг красителя в 1 мл среды. Через 5 мин препараты исследуют под люминесцентным микроскопом. В этих условиях ядра, митохондрии и мембраны светятся зеленым, в то время как лизосомы — ярко-красным светом, что позволяет идентифицировать фракции и судить об их чистоте.

Фракционирование клеток моноклеарной фагоцитирующей системы

Для выделения лизосом и других субклеточных фракций большое значение имеет метод гомогенизации тканей. Желательно как можно меньше повреждать клетки, которые обладают неодинаковой прочностью в разных тканях, что должно учитываться при гомогенизации. Для создания наиболее удовлетворительного осмотического потенциала в среде обычно используют растворы сахарозы. Это позволяет предохранить клетки и их гранулы от разбухания и разрывов. Подробно методы выделения лизосом были описаны ранее (Cohn, Hirsch, 1960; Weissmann, Thomas, 1962).

Макрофаги и клетки селезенки гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе (макрофаги в 5 мл 0,34 М раствора сахарозы, а селезенку в 0,25 М раствора сахарозы из расчета 10 мл на 1 г ткани). Все процедуры производят при 4° С. Гомогенаты центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин. Осадок состоит из обломков клеток, ядер и митохондрий (нулевая фракция). Супернатант центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 20 мин.

Полученный супернатант представляет собой цитоплазматическую фракцию (I фракция), а осадок, состоящий из лизосом (II фракция), еще раз отмывают 0,25 М раствором сахарозы, а затем разводят в 10 мл для селезенки и в 5 мл 0,25 М раствора сахарозы для макрофагов и используют в необходимых целях.

Для получения мембран и ферментов лизосом последние лизируют шестикратным замораживанием и оттаиванием или лизированием бидистиллированной водой (лизосомы селезенки в отношении 1:10, а макрофагов — 1:5) в течение 30 мин при 4° С. Для осаждения мембран лизосом лизат центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 20 мин. В супернатанте содержатся ферменты лизосом, а осадок состоит из разрушенных мембран этих структур. Мембраны лизосом отмывают от ферментов 0,25 М раствором сахарозы при том же режиме. В выделенных субклеточных фракциях (ферменты и мембраны лизосом и лизосомы клеток селезенки и перитонеального экссудата) определяют содержание белка по Лоури (Folin, Ciocalteu, 1927). Степень разрушения клеток контролируют с помощью фазово-контрастного микроскопа. Чистоту фракций контролируют электронномикроскопически, флюорохромированием с акридиновым оранжевым и биохимически (по активности ферментов и их соотношению в цитоплазматической и лизосомных фракциях клеток). Наличие и активность лизосомных ферментов испытывают соответствующими гистохимическими и биохимическими методами. В качестве типичного примера может быть приведено определение активности катепсина D по Ансону (Anson, 1936).

В качестве субстрата используют 2,5% раствор гемоглобина в кислой среде. Навеску гемоглобина растирают в ступке в 1,35 М растворе уксусной кислоты в 0,02 М сульфате аммония. На 10 мл раствора берут 250 мг гемоглобина, 2,5 мл 1,35 М раствора уксусной кислоты и доводят до 10 мл дистиллированной водой. Воду добавляют после растирания гемоглобина до гомогенной массы. Раствор гемоглобина помещают в термостат при температуре 37° С на 30 мин. Все последующие манипуляции проводят на холоду. В опытные и контрольные пробирки наливают по 0,5 мл раствора гемоглобина, затем приливают по 0,5 мл исследуемого лизата. В контрольные пробирки добавляют сразу по 5 мл 0,35 М раствора ТХУ. Полученный депротенинизированный субстрат фильтруют

через бумажные фильтры и в фильтрате определяют продукты распада по тирозину, используя реактив Фолина. Для этого к 0,6 мл фильтрата добавляют 0,65 мл 0,35 М ТХУ и 2,5 мл 0,62 N NaOH. Поскольку сахароза, которая использовалась для выделения лизосом, сильно гидролизует в ТХУ, приводя к увеличению содержания гексоз, вызывающих значительное восстановление реактива Фолина, то химический анализ проводят на холоду до момента добавления щелочи. После этого при комнатной температуре прибавляют по 0,75 мл 1/N реактива Фолина. Инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Измерение концентрации проводят на фотоэлектроколориметре. Результаты выражают в микрограммах тирозина на 1 мг белка, который определяют в фильтрате по Лоури.

Получение антисывороток к макрофагам и их субклеточным фракциям

Клетки и их субклеточные фракции получают описанными выше способами. Иммунизация субклеточными фракциями позволяет получить более активные антисыворотки. Схемы процесса иммунизации могут быть разными. В нашей лаборатории первичную иммунизацию проводили путем троекратного еженедельного внутримышечного введения, дважды вводили антиген в смеси с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), через 1 мес делали еще одну внутримышечную инъекцию антигена в ПАФ. Сыворотки получали через 10 дней после конца каждого цикла инъекций, инактивировали при 56° С в течение 30 мин и хранили при —20° С. Методы их титрования и тестирования описаны на с. 183.

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Адо А. Д. Патифизиология фагоцитов. М., Медгиз, 1961, 295 с.
- Ашмарин И. П., Антипенко А. Е. Существуют ли иммунологические механизмы нейробиологической памяти.— «Журн. микробиол.», 1973, № 12, с. 59.
- Бабаянскас М., Коткес Ф., Мошков С. Бласттрансформация лимфоцитов, индуцированная монослоем макрофагов, обработанных различными митогенами.— «Бюлл. экспер. биол. мед.», 1972, т. 74, с. 79.
- Бубашвили М. Е., Хасман Э. Л., Учитель И. Я. Влияние адьювантов на функцию клеток моноцитарной фагоцитирующей системы.— «Журн. микробиол.», 1975, № 8, с. 116.
- Бухарин О. В. Неспецифический иммунитет.— В кн.: Труды кафедры микробиологии Оренбургского мед. ин-та. Под ред. О. В. Бухарина. Оренбург, 1973, 152 с.
- Грбар П. Н. Аутоантитела и иммунологические теории.— «Онтогенез», 1975, т. 6, с. 112.
- Зайцева Л. Г., Бубашвили М. Е. Влияние антисыворотки против лизосомных энзимов селезенки на антителообразование.— В кн.: Цитотоксины в современной медицине. В. 6. Киев, 1972, с. 124.
- Здродовский П. Ф., Гурвич Г. А. Физиологические основы иммуногенеза и его регуляция. М., «Медицина», 1972, 88 с.
- Зеленин А. В. Морфологическая и цитохимическая природа красных акридиновых гранул.— «Изв. АН СССР». Сер. биол., 1965, т. 6, с. 977.
- Исина Х. М., Корн М. Я. Фиксация антилизосомных сывороток на структурах макрофагов.— «Цитология», 1975, т. 5, с. 26.
- Кириянова Е. А., Зеленин А. В. Некоторые закономерности накопления инородных для клетки веществ в лизосомах.— «ДАН СССР», 1970, т. 190, с. 451.
- Кульберг А. Я. Иммуноглобулины как биологические регуляторы М., «Медицина», 1975, 100 с.
- Лобасенко Н. П., Медведева Г. Г. Изучение характера воздействия АМС на морфофункциональные свойства макрофагов мышей.— В кн.: Материалы конф. по общей и прикл. иммунол. Ч. 1. М., 1974, с. 89.
- Ляшенко В. А. Иммуногенная РНК — ее свойства и роль в иммуногенезе. Автореф. дис. докт. М., 1973.
- Максимович Н. Е., Сунтель Е. А. Метаболические характеристики перитопеальных макрофагов, зараженных *Shigella sonnei* — «Микроб. журн.». Т. 38. Киев, 1976, с. 93.
- Мальцев В. Н., Цыпин А. Б., Плющев А. К. Влияние повреждения центров гипоталамуса на иммунологическую реактивность организма.— «ЖМЭИ», 1970, № 8, с. 8.

- Мечников И. И. Об иммунитете при инфекционных заболеваниях. Собр. соч. Т. 7. Изд-во АМН СССР, 1952, с. 99.
- Островская О. А. Условный рефлекс и реакции иммунитета.— «Журн. exper. биол. и мед.», 1929, № 12, с. 174.
- Петров Р. В., Чередеев А. Н., Михайлова А. А. Взаимодействие и ко-операция клеток при иммунном ответе.— В кн.: Общие вопросы патологии. Под ред. Р. В. Петрова и К. Н. Монакова. М., ВИНТИ, 1972, с. 106.
- Пинчук В. Г., Зотиков Л. А. Характеристика лизосомного аппарата клеток индуцированных гепатом.— В кн.: Канцерогенез, методы диагностики и лечения опухолей. Киев, 1969, с. 107.
- Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М., «Наука», 1976, 378 с.
- Поленова И. М. Действие АМС и АЛС на фагоцитоз.— В кн.: Инфекционная и неинфекционная иммунология. М., «Медицина», 1971, с. 98.
- Рахлин Н. Т. Лизосомы в норме и патологии (обзор).— «Арх. патол.», 1971, т. 33, с. 7.
- Розенфельд Е. Л. Наследственные заболевания, вызванные нарушениями в обмене гликоконъюгатов.— «Вопр. мед. химии», 1977, т. 1, с. 8.
- Учитель И. Я. Роль лизосом клеток РЭС в иммуногенезе.— «Вестн. АМН СССР», 1970, № 7, с. 65.
- Учитель И. Я. Лизосомы и иммунитет.— «Журн. микробиол.», 1973, № 8, с. 64.
- Учитель И. Я., Хасман Э. Л. Механизм аутоиммунизации и лизосомы.— «Вопр. ревматизма», 1969, № 3, с. 3.
- Учитель И. Я., Хасман Э. Л. Иммунный ответ и активность катепсина клеток РЭС у инбредных мышей разных линий.— «Журн. микробиол.», 1972, № 10, с. 32.
- Учитель И. Я., Хасман Э. Л. Роль макрофагов в распознавании чужеродности.— В кн.: Клеточные основы иммунитета. Под ред. Ю. А. Афанасьева. Т. 2. Новосибирск, «Наука», 1972, с. 59.
- Учитель И. Я., Бубашвили М. Е., Хасман Э. Л. Влияние адьювантов на функцию лизосомного аппарата КПЭ, на персистенцию антигена и его комплексирование с РНК макрофагов.— «Журн. микробиол.», 1975, № 8, с. 16.
- Учитель И. Я., Харитонова А. М., Исина Х. М. Общие закономерности реакции макрофагов при введении различных антигенов и фагоцитозе микроорганизмов.— «Журн. микробиол.», 1976, № 2, с. 29.
- Фаворская Ю. Н., Крымский Л. Д., Нестайко Г. В. Поверхностная структура макрофагов и лимфоцитов при их взаимодействиях в условиях антигенной стимуляции по наблюдениям в растровом электронном микроскопе.— «Арх. патол.», 1975, т. 27, с. 33.
- Фаворская Ю. Н., Зайцева Л. Г., Учитель И. Я. Пределы фагоцитирующей способности макрофагов.— «Бюлл. exper. биол. и мед.», 1977, № 7, с. 34.
- Фриденштейн А. Я., Чертков И. Л. Клеточные основы иммунитета. М., «Медицина», 1969, с. 255.
- Фролова М. А., Гудкова Р. Г., Большухина Л. А. Влияние степени гистосовместимости донора и реципиента на функцию трансплантата сердца у мышей.— «Экспер. хир. и анестез.», 1972, № 3, с. 11.
- Фукс Б. Б., Константинова И. В., Цыганков А. П. Иммунологическое и гистохимическое изучение процесса биосинтеза специфических антител, вызванного РНК из клеток иммунизированного животного.— «Вестн. АМН СССР», 1964, № 12, с. 28.

- Хасман Э. Л., Фрязинова И. Б., Учитель И. Я. Исследование эндогенных факторов, участвующих в стимуляции образования антител.— В кн.: Вопросы инфекционной патологии и иммунологии. Под ред. П. Ф. Здродовского. М., 1968, с. 56.
- Чахава О. В., Цаценкина Т. И. Пиноцитоз сывороточных глобулинов макрофагами.— «Бюлл. exper. биол. и мед.», 1970, № 9, с. 55.
- Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Кооперативное взаимодействие клеток при иммунном ответе.— «Успехи совр. биол.», 1972, т. 74, с. 292.
- Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. М., «Медицина». 1977, 271 с.
- Шекоян В. А., Крымский Л. Д., Нестайко Г. В. Поверхностная структура кроличьих перитонеальных макрофагов при повреждении гипоталамических структур.— «Арх. патол.», 1976, т. 38, № 11, с. 66.
- Шекоян В. А., Морарь Т. Ф., Хасман Э. Л. О роли заднего гипоталамуса в регуляции функции макрофагов.— В кн.: Вопросы инфекционной патологии и иммунологии. Под ред. И. Н. Кокорина. 1976, в. 5, с. 76.
- Шекоян В. А., Хасман Э. Л. О роли заднего гипоталамуса в регуляции функции макрофагов.— «Бюлл. exper. биол. и мед.», 1973, № 8, с. 93.
- Шекоян В. А., Хасман Э. Л., Учитель И. Я. Влияние структур переднего и заднего гипоталамуса на захват и переваривание антигена макрофагами и клиренс туши.— «Журн. микробиол.», 1975, № 3, с. 131.

- Ada G., Parish C., Nossal G. The tissue localization immunogenic and tolerance-inducing properties of antigens and antigen-fragments.— «Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.», 1967, v. 32, p. 381.
- Adler F., Fishman M., Dray S. Antibody formation initiated in vitro. III.— «J. Immunol.», 1966, v. 97, p. 554.
- Albrecht R., Hinsdill R., Sandok P. A comparative study of the surface morphology of stimulated and unstimulated macrophages prepared without chemical fixation for scanning electron microscopy.— «Exp. Cell. Res.», 1972, v. 70, p. 230.
- Allen J. Lysosomes in bacterial infection.— In: Lysosomes in biology and pathology. Ed. J. Dingle, H. Fell. Amsterdam—London, Amer. Els. Publ. Co., 1969, v. 2, p. 41.
- (Allison A.) Аллисон Э. Лизосомы и болезни.— В кн.: Молекулы и клетки. Под ред. Г. М. Франка. Вып. 4. Пер. с англ. М., «Мир», 1969, с. 196.
- Andersen H., Matthiessen M. The histocyte in human foetal tissues. Its morphology, cytochemistry, origin, function and fate.— «Z. Zellforsch.», 1966, Bd 72, S. 193.
- Argyris B., Plotkin D. Effects of antimacrophage serum antibody production and phagocytosis in mice.— «J. Immunol.», 1969, v. 103, p. 372.
- Asherson G., Zembala M. T-cell-suppression of contact sensitivity in the mouse. III.— «Eur. J. Immunol.», 1974, v. 4, p. 804.
- Axlne St., Cohn Z. In vitro induction of lysosomal enzymes by phagocytosis.— «J. Exp. Med.», 1970, v. 131, p. 1239.
- Balrd L., Kaplan A. Macrophage regulation of mitogeninduced blastogenesis. I, II.— «Cell. Immunol.», 1977, v. 28, p. 22.

- Bell C., Dray S.* Conversion of non-immune rabbit spleen cells by RNA acid of lymphoid cells from an immunized rabbit to produce IgG antibody of foreign light chain allotype. — «J. Immunol.», 1970, v. 105, p. 541.
- Benetato Gr., Baciú I., Budai R.* К вопросу о первичном механизме регуляции иммунологических процессов. Роль ЦНС в деятельности фиксированной фагоцитарной системы. — «Bull. Stiintif. A. R. P. Romine», 1955, v. 7, p. 349.
- Bennett B.* Comparative morphology of macrophages in tissue culture. — «Adv. Exp. Med. Biol.», 1967, v. 1, p. 74.
- Boros D., Warran K.* Effect of macrophage serum on hypersensitivity (schistosome mausoni egg) and foreign body granulomas. — «J. Immunol.», 1971, v. 107, p. 534.
- Binlaminov M., Ramot B., Rosenthal E.* Galactose oxidase induced blastogenesis of human lymphocytes a. the effect of macrophages on the reaction. — «Clin. exp. Immunol.», 1975, v. 19, p. 93.
- Bird J., Berg T., Leathem H.* Cathepsin activity of liver a. muscle fractions of adrenalectomized rats. — «Proc. Soc. exp. Biol.», 1968, v. 127, p. 182.
- Bishop D., Pisciotta A., Abramoff P.* Synthesis of normal and «immunogenic RNA» in peritoneal macrophage cells. — «J. Immunol.», 1967, v. 99, p. 751.
- Bona C., Auteunls A., Robineaux R.* Transfer of antigenic macromolecules from macrophages to lymphocytes. — «Immunol.», 1972, v. 23, p. 799.
- Braun W., Ishizuka M., Yajima Y.* Spectrum and mode of action of poly A:U in the stimulation of immune responses. — In: Biol. effects of polynucleotides. Ed. R. Beers, W. Braun, New York, 1971, p. 6.
- Calderon J., Unanue E.* Two biological activities regulating cell proliferation found in cultures of peritoneal exudate cells. — «Nature», 1975, v. 253, p. 359.
- Cerottini J. Ch., Brunner K.* Cell-Mediated cytotoxicity allograft rejection and tumor immunity. — «Adv. in Immunol.», v. 18, New York Acad. Press, 1974 p. 67.
- Chaffar A., James K.* The effect of antilymphocytic antibody on the humoral immune response in different strains of mice. III. — «Immunol.», 1973, v. 24, p. 1075.
- Chaout G., Howard J.* Influence of RES-blockade on the induction of tolerance and immunity by polysaccharides. — «Immunol.», 1976, v. 30, p. 221.
- Chused Th., Kassan St., Mosier D.* Macrophage requirement for the in vitro response to TNP-Ficoll and thymic independent antigen. — «J. Immunol.», 1976, v. 116, p. 1579.
- Coffey J., de Duve Ch.* Digestive activity of lysosomes. — «J. Biol. Chem.», 1968, v. 243, p. 3255.
- Cohn Z., Fedorko M.* The formation and fate of lysosomes. — In: Lysosomes in biology and pathology. Ed. J. Dingle, H. Fell Part I. New York, Amer. Els. Publ. Co., 1969, p. 43.
- Cohn Z., Parks E.* The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. — «J. exp. Med.», 1967, v. 125, p. 213, 457, 1091.
- Coombs R., Fell H.* Lysosomes in tissue damage mediated by allergic reactions. — In: Lysosomes in biology and pathology. Ed. J. Dingle a. H. Fell. V. 2. Amsterdam, 1969, p. 3.

- Cruchaud A., Unanue E.* Fate and immunogenicity of antigens endocytosed by macrophages: a study using foreign red cells and immunoglobulin G.—«J. Immunol.», 1971, v. 107, p. 1329.
- Currie G., Basham C.* Activated macrophages release a factor which lyses malignant cells but not normal cells.—«J. exp. Med.», 1975, v. 142, p. 1600.
- Curtis G., Ryan W.* Antisera to lysosomes a effect on allograft rejection.—«Transplant.», 1973, v. 15, p. 1.
- Dimitriu A.* Suppression of macrophage arming by corticosteroids.—«Cell. Immunol.», 1976, v. 21, p. 79.
- Donald K., Tennet R.* The relative roles of platelets and macrophages in clearing particles from blood; the value of carbon clearance as a measure of reticuloendothelial phagocytosis.—«J. Pathol.», 1975, v. 117, p. 235.
- Dresser D., Mitchison N.* The mechanism of Immunological paralysis. Adv. in Immunol. Ed. F. Dixon a. H. Kunkel. V. 8. New York, Acad. Press., 1968, p. 129.
- De Duve C.* The lysosome in retrospect.—«In: Lysosomes in biology and pathology. Ed. J. Dingle, H. Fell. V. I. New York, Amer. Els. Publ. Co., 1969, p. 3.
- Ehrenreich B., Cohn Z.* The fate of peptides pinocytosed by macrophages in vitro.—«J. Exp. Med.», 1969, v. 129, p. 227.
- Ellner L., Rosenthal A.* Quantitative and immunologic aspects of handling of 2,4-dinitrophenylguinea pig albumin by macrophages.—«J. Immunol.», 1975, v. 114, p. 1563.
- Evans R., Alexander P.* Role macrophages in tumor immunity. I.—«J. Immunol.», 1972, v. 23, p. 615.
- Farr A., De Buyn P.* Macrophage lymphocyte clusters in lymph nodes: a possible substrate for cellular interactions in the immune response.—«Am. J. Anat.», 1975, v. 144, p. 209.
- Feldman L., Tubergen D., Unanue E.* Distribution of a macrophage-specific antigen.—«Cell. Immunol.», 1972, v. 5, p. 325.
- Fellenberg R., Briner H., Guggisberg E.* Immunochem. assay of ALS with subcellular fractions and purified membranes.—«J. Immunol.», 1971, v. 107, p. 751.
- Fishman M., Adler F.* The formation of immunogenic RNA-antigen complexes in a cell free system.—«Cell. Immunol.», 1973, v. 8, p. 221.
- Folin O., Clocalteu J.* Tyrosine and tryptophane determinations in proteins.—«J. Biol. Chem.», 1927, v. 73, p. 627.
- Torbes I.* Mitosis in mouse peritoneal macrophages. I.—«J. Immunol.», 1966, v. 96, p. 734.
- Friedman H., Sabet T.* Effects of RES blockade on antibody formation.—«Immunol.», 1970, v. 18, p. 883.
- Frisch A., Wilson B.* Transfer studies in immunosuppressed mice: the role of the macrophage.—«Proc. Soc. exp. Biol.» (N. Y.), 1969, v. 132, p. 42.
- Fruhman G.* Peritoneal macrophages in male and female mice.—(J. Res.», 1973, v. 14, p. 371.
- (Fudenberg H.) Фьюденберг Х., Пинк Д., Стайфмс Д., Ан-Чуан Ванг.* Введение в иммуногенетику. Под ред. Р. С. Незлина. Пер. с англ. М., «Мир», 1975, 225 с.
- van Furth R., Dieselhoff-Den Dulk M.* The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow.—«J. Exp. Med.», 1970, v. 132, p. 813.

- van Furth R., Gassmann A., Diesellhoff-Den Dulk M.* The effect of azathioprine (Imuran) on the cell cycle of promonocytes and the production of monocytes in the bone marrow.—«J. exp. Med.», 1975, v. 141, p. 531.
- van Furth R., Thompson J.* Review of the origin and kinetics of the promocytes, monocytes and mononuclear phagocyte system.—«Ann. de l'Inst. Pasteur», 1971, v. 120, p. 337.
- Gallily R.* In vitro and in vivo studies of the properties and effects of antimacrophage sera.—«Clin. exp. Immunol.», 1971, v. 9, p. 381.
- Gallily R., Ben-Ishay Z.* Interaction between normal or irradiated macrophages and lymphocytes in mice.—«Cell. Immunol.», 1974, v. 11, p. 314.
- Gemsa D., Steggemann L., Menzel J.* Release of cyclic AMP from macrophages by stimulation with prostaglandine.—«J. Immunol.», 1975, v. 114, p. 1422.
- Gery I., Wiener E.* Potentiation of T-lymphocyte response to mitogens: relationship between LAF production and «activation» of macrophages.—«J. REC.», 1975, v. 18, p. 252.
- Gillete R., Lance E.* Kinetic studies of macrophages. I.—«J. REC.», 1971, v. 10, p. 223.
- Glaumann H., Berezsky I., Ericsson J.* Lysosomal degradation of cell organelles. I, II, III.—«Lab. Invest.», 1975, v. 33, p. 239.
- Gordon S., Werb Z.* Secretion of macrophage neutral proteinase is enhanced by colchicine.—«Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.», 1976, v. 73, p. 872.
- Gottlieb A.* Antigen capture by unique ribonucleoprotein of macrophage cells.—In: Biological effects of polynucleotides. Ed. R. Beers, W. Braun. New York, p. 5, 1971, p. 293.
- Greineder D., Rosenthal A.* Macrophage activation of allogeneic lymphocyte proliferation in the guinea pig mixed leucocyte culture.—«J. Immunol.», 1975, v. 114, p. 1541.
- Greineder D., Rosenthal A.* The requirement for macrophagelymphocyte interaction in T-lymphocyte proliferation induced by generation of aldehydes on cell membranes.—«J. Immunol.», 1975, v. 115, p. 932.
- Haskill J., Radov L., Yamamura J.* Experimental solid tumors: the role of macrophages and lymphocytes as effector cells.—«J. REC.», 1976, v. 20, p. 233.
- Hess M., Roos B., Cottier H.* Kinetics of peripheral macrophages: facts and working hypothesis.—«Ann. Inst. Pasteur», 1971, v. 120, p. 367.
- Hibbs I., Lambert L., Remington I.* Control of cancerogenesis: a possible role for the activating macrophages.—«Science», 1972, v. 117, p. 998.
- Hirschhorn R., Grossman J., Welssmann G.* Effect of cyclic 3,5-adenosine monophosphate and theophylline on lymphocyte transformation.—«Proc. Soc. exp. Biol. Med.», 1970, v. 133, p. 1361.
- Hirt E., Bonventure P.* Cultural, phagocytic and bactericidal characteristics of peritoneal macrophages.—«J. REC.», 1973, v. 13, p. 27.
- Holland P., Holland M., Cohn Z.* The selective inhibition of macrophage phagocytic receptors by antimembrane antibodies.—«J. exp. Med.», 1972, v. 135, p. 458.

- Horton J., Oppenheim J., Mergenhagen St.* Macrophage-lymphocyte synergy in the production of osteoclast activating factor.—«J. Immunol.», 1974, v. 113, p. 1278.
- Huard M., Siebeling R.* Depressed cellular a. humoral hemolysin responses of rabbits injected intraperitoneally with mineral oil before immunization.—«J. Immunol.», 1971, v. 106, p. 266.
- Hunninghake G., Fauci A.* Immunologic reactivity of lung. III.—«J. Immunol.», 1977, v. 118, p. 146.
- Igrashi S., Okada M., Kishimoto T.* In vitro induction of polyclonal killer T cells with 2-mercaptoethanol and the essential role of macrophage in this process.—«J. Immunol.», 1977, v. 118, p. 1697.
- Isa A., Sanders B.* Enhancement of tumor growth in allogenic mice following impairment of macrophage function.—«Transplant.», 1975, v. 20, p. 296.
- Johnson A., Cone R., Friedman H.* Stimulation of the immune system by homopolyribonucleotides. — In: Biological effects of polynucleotides. Ed. R. Beers, W. Braun, New York. 1971, p. 157.
- Jülich W., Weuffen W., Jenssen H.* Correlations between the results of the macrophage electrophoretic mobility (MEM) test and the rhodanide level in patients with malignant tumors, autoaggression diseases and following transplantations.—«Acta biol. med. germ.», 1975, v. 34, p. 1541.
- Kersey J., Booth G.* Cellular recognition and activation within the lymphoid system. — «Amer. J. clin. Path.», 1975, v. 63, p. 629.
- Kishimoto T., Miyake T., Nishizawa Y.* Triggering mechanism of B lymphocytes.—«J. Immunol.», 1975, v. 115, p. 1179.
- Kunin S., Shearer G., Gloverson A.* Immunogenic function of macrophages: in vitro production of antibodies to hapten-carrier conjugate.—«Cell. Immunol.», 1972, v. 5, p. 288.
- Lackmann P., Munn E., Weissmann G.* Complement-mediated lysis of lysosomes produced by the reactive lysis procedure.—«Immunol.», 1970, v. 19, p. 983.
- Lane F., Unanue E.* Role of theta positive lymphocytes in mediation of immune response to listeria monocytogenes.—«Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol.», 1972, v. 31, p. 610.
- Lee J., Metcalf R., Ryan W.* Effect of freunds complete adjuvant on lysosomal enzymes.—«Intern. Arch. Aller.», 1970, v. 39, p. 609.
- Lipsky P., Rosenthal A.* Macrophage-lymphocyte interaction. I.—«J. exp. Med.», 1973, v. 138, p. 900.
- Lipsky P., Rosenthal A.* Macrophage-lymphocyte interaction: antigen-independent bending of guinea pig lymph node lymphocytes by macrophages.—«J. Immunol.», 1975, v. 115, p. 440.
- Loewi L., Temple A., Nind A.* A study of the effect of antimacrophage sera.—«Immunol.», 1969, v. 16, p. 99.
- Lyll., Mishell R.* Separation of mouse spleen cells by passage through columns of sephadex G-10.—«J. Immunol. Methods», 1974, v. 5, p. 239.
- MacClain D., Wang J., Edelman G.* The effects of sodium metaperiodate on T and B lymphocytes.—«Cell. Immunol.», 1975, v. 15, p. 287.
- MacLaurin B., Humm J.* Macrophages specificity of antiserum against thymus lymphocytes.—«Clin. exp. Immunol.», 1970, v. 6, p. 126.
- Marsman A., van der Hart M., van Loghem J.* Antigenic differences between macrophages and lymphocytes. — «Clin. exp. Immunol.», 1970, v. 6, p. 899.

- Miller H., Aarameas S.* Association between macrophages and specific antibody producing cells.—«Nat. New Biol.», 1971, v. 229, p. 184.
- Mitchell M., Kirkpatrick D., Birnbaum-Mokyr M.* On the mode of action of BCG.—«Nature» (New Biol.), 1973, v. 243, p. 216.
- Morahan P., Glasgow L., Crane I.* Comparison of antiviral a. anti-tumor activated macrophages.—«Cell. Immunol.», 1977, v. 28, p. 404.
- Morrell R.* Effect of polynucleotides (poly I:C a. poly A:U) on protein, RNA and polysomal synthesis in rabbit and human lung a. rat and human peritoneal macrophages.—«In: Biol. Effects of polynucleotides. Ed. R. Beers, W. Braun. New York, 1971, p. 27.
- Mosier D., Pierce C.* Functional maturation of thymic lymphocyte populations in vitro.—«J. exp. Med.», 1972, v. 136, p. 1484.
- Mosier D., Johnson B., Paul W.* Cellular requirements for the primary in vitro antibody response to DNP-Ficoll.—«J. exp. Med.», 1974, v. 139, p. 1354.
- Mucher D., Hensch C., Weinstein L.* Effects of various antisera on morphology, phagocytic ability and metabolism of guinea pig peritoneal macrophages.—«J. Inf. Dis.», 1972, v. 125, p. 6.
- Nelson D.* Macrophages and Immunity. Amsterdam, Worth-Holland Publ., 1969, 235 p.
- Neilsen M., Jensen H., Braendstrup O.* Macrophage-lymphocyte clusters in the Immune response to soluble protein antigen in vitro.—«J. exp. Med.», 1974, v. 140, p. 1260.
- North R., Kirstein D.* T-cell-mediated conconutant immunity of syngenic tumors. I. Activated macrophages as the expressors of non-specific immunity to unrelated tumors and bacterial parasites.—«J. exp. Med.», 1977, v. 145, p. 275.
- Oppenheim J.* Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity in guinea pigs and man.—«Fed. Proc.», 1968, v. 27, p. 21.
- Patterson J., Plisano J., Di Luzio N.* Reversal of antilymphocyte serum induced immunosuppression by macrophage administration.—«Proc. Soc. exp. Biol.», 1970, v. 135, p. 831.
- Pearsall N., Weiser R.* The macrophage. Philadelphia. Lea and Febiger, 1970, 204 p.
- Poole A.* The degradation of cartilage matrix by a lysosomal preparation, isolated from a malignant tumour and its inhibition by an antiserum to this preparation.—«Histochem. J.», 1970, v. 2, p. 431.
- Poulter L., Bradly N., Turk J.* The role of macrophages in skin allograft rejection. I.—«Transplant.», 1971, v. 12, p. 40.
- (Prilbram K.) Прибрам К.* Языкн мозга. Пер. с англ. М., «Прогресс», 1975, 464 с.
- Plak W., Gershon R.* Immunosuppression effected by macrophage surfaces.—«J. Immunol.», 1975, v. 115, p. 1346.
- Rabinovitch M.* Uptake of aldehyde-treated erythrocytes by L 2 cells: inhibition by antired cell antibody or by coating the erythrocytes with purified proteins.—«Exp. Cell. Res.», 1969, v. 54, p. 210.
- Raz A., Goldman R.* Effect of hashish compounds on mouse peritoneal macrophages.—«Lab. Invest.», 1976, v. 34, p. 69.
- Rhodes J.* Effect of ferritin and ferric chloride on the in vivo uptake of I^{125} HSA by mouse peritoneal cells.—«J. REC.», 1970, v. 8, p. 248.

- Remold H.* Studies on the interaction of macrophage inhibitory factor (MIF) with the macrophage. — «Clin. Immunol. Immunopathol.», 1975, v. 4, p. 573.
- Remold H.* Chemical treatment of macrophages increases their responsiveness to migration inhibitory factor (MIF). — «J. Immunol.», 1977, v. 118, p. 1.
- Remold H., David R., David J.* Characterization of migration inhibitory factor (MIF) from guinea pig lymphocytes stimulated with concanavalin A. — «J. Immunol.», 1972, v. 109, p. 578.
- Rice St., Fishman M.* Functional and morphological heterogeneity among rabbit peritoneal macrophages. — «Cell. Immunol.», 1974, v. 11, p. 130.
- Riley V., Braun W., Ischizuka M., Spackman D.* Antibody-producing cells: virus-induced alteration of response to antigen. — «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.», 1976, v. 73, p. 1707.
- (Robertson J.) Робертсон Дж.* Мембрана живой клетки. — В кн.: Структура и функция клетки. Под ред. Г. М. Франка. Пер. с англ. М., «Мир», 1964, с. 159.
- Roelants G., Askonas B.* Immunological B memory in thymus derived mice. — «Nature» (New Biol.), 1972, v. 239, p. 63.
- Rosenstreich D., Rosenthal A.* Peritoneal exudate lymphocyte. II. — «J. Immunol.», 1973, v. 110, p. 934.
- Rosenthal A., Shevach E.* Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T-lymphocytes. — «J. exp. Med.», 1973, v. 138, p. 1124.
- Russell St., Gillespie G., McIntosh A.* Inflammatory cells in solid murine neoplasms. — «Immunol.», 1977, v. 118, p. 1574.
- Roser B.* The origin, kinetics and fate of macrophage populations. — «J. REC.», 1970, v. 8, p. 139.
- Ryan W., Lee J.* Antigen catabolism by lysosomal enzymes. — «Immunochem.», 1970, v. 7, p. 251.
- Schmidt M., Douglas S.* Disappearance and recovery of human monocyte IgG receptor activity after phagocytosis. — «J. Immunol.», 1972, v. 109, p. 914.
- Schmidtke J., Dixon F.* The functional capacity of X-irradiated macrophages. — «J. Immunol.», 1972, v. 108, p. 1624.
- Schorlemmer H., Edwards I., Davies P.* Macrophage responses to mouldy hay dust, Micropolyspora faeni a. zymosan, activators of complement by the alternative pathway. — «Clin. Exp. Immunol.», 1977, v. 27, p. 198.
- Schroit A., Gallily R.* Studies on the binding and phagocytic inhibition properties of AMG. — «Immunol.», 1974, v. 26, p. 971.
- Schultz R., Papamatheakis I., Luetzeler I.* Macrophage involvement in the protective effect of pyran copolymer against the Madison lung carcinoma (M109). — «Canc. Res.», 1977, v. 37, p. 358.
- Schwartz R., Ryder R., Gottlieb A.* Macrophages and antibody synthesis. — «Progr. Allergy», 1970, v. 14, p. 81.
- Seeger R., Oppenheim J.* Macrophage-bound antigens. I. a. II. — «J. Immunol.», 1972, v. 109, p. 244.
- Sell S., Mascari R., Goldblatt P.* The in vitro effects of goat antisera to rabbit thymocyte subcellular fractions. — «J. Immunol.», 1970, v. 105, p. 6.
- Shevach E., Rosenthal A.* Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T-lymphocytes. II. — «J. exp. Med.», 1973, v. 138, p. 1213.

- Siegel I.* Natural and antibody-induced adherence of guinea pig phagocytic cells to autologous and heterologous thymocytes.—«J. Immunol.», 1970, v. 105, p. 879.
- Steinman R., Cohn Z.* Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.—II.—«J. exp. Med.», 1974, v. 139, p. 380.
- Stinnett J., Kaplan A., Morahn P.* Identification of macrophage-specific cell surface antigen.—«J. Immunol.», 1976, v. 116, p. 273.
- Sulitzeanu D., Kleiman R., Benezza D.* Cellular interactions and the secondary response in vitro.—«Nat. New Biol.», 1971, v. 229, p. 254.
- Thompson J., van Furth R.* The effect of glucocorticosteroids on the kinetics of mononuclear phagocytes.—«J. exp. Med.», 1970, v. 131, p. 429.
- Tolnai S.* Phagocytosis of latex particles in vitro. Effects of anti-lymphocyte and antithymocyte serum.—«Separat. Experientia», 1973, v. 29, p. 217.
- Unanue E.* The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation.—«Adv. in Immunol.». New York, 1972, v. 15, p. 95.
- Unanue E.* Secretory function of mononuclear phagocytes.—«Am. J. Path.», 1976, v. 83, p. 396.
- Unanue E., Gerotolini J.* The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages.—«J. exp. Med.», 1970, v. 131, p. 711.
- Unanue E., Feldman J.* Role of macrophages in delayed hypersensitivity. I.—«Cell. Immunol.», 1971, v. 2, p. 269.
- Vassalli J., Reich E.* Macrophage plasminogen activator: induction by products of activated lymphoid cells.—«J. exp. Med.», 1977, v. 145, p. 429.
- Virolainen M.* Blast transformation in vivo and in vitro in carbomazoprin hypersensitivity.—«Clin. exp. Immunol.», 1971, v. 9, p. 429.
- Vriesendorp H., Lowenberg B., Visser T.* Influence of genetic resistance and silica particles on survival after bone marrow transplantation.—«Transplant. Proc.», 1976, v. 8, p. 483.
- Wahl S., Wilton M., Rosenstreich D.* The role of macrophages in the production of lymphokines by T and B lymphocytes.—«J. Immunol.», 1975, v. 114, p. 1296.
- Waldman S., Gottlieb A.* Macrophage regulation of DNA synthesis in lymphoid cells: effects of a soluble factor from macrophages.—«Cell. Immunol.», 1973, v. 9, p. 142.
- Waldron J., Horn R., Rosenthal A.* Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: functional aspects of antigen handling by macrophages.—«J. Immunol.», 1974, v. 112, p. 746.
- Walker W.* Functional heterogeneity of macrophages: subclasses of peritoneal macrophages with different antigen-binding activities and immune complex receptors.—«Immunol.», 1974, v. 26, p. 1025.
- Ward P., Hill J.* C⁵ chemotactic fragments produced by an enzyme in lysosomal granules of neutrophils.—«J. Immunol.», 1970, v. 104, p. 535.
- Weismann U., Di Donato St., Herschkowitz N.* Effect of chloroquine on cultured fibroblasts: release of lysosomal hydrolases and inhibition of their uptake.—«Biochem. Biophys. Research Comm.», 1975, v. 66, p. 1338.

- Weissmann G., Dukor P. The role of lysosomes in immune responses.—«Adv. in Immunol.», New York, 1970, v. 12, p. 283.
- Wellek B., Hohn H., Opterkuch W. Evidence for macrophage C3d receptor active in phagocytosis.—«J. Immunol.», 1975, v. 114, p. 1643.
- Werdell O., Braendstrup O., Pedersen E. Macrophage—lymphocyte clusters in the immune response to soluble protein antigen in vitro.—«J. exp. Med.», 1974, v. 140, p. 1245.
- Wilton J., Rosenstreich D., Oppenheim J. Activation of duinea pig macrophages by bacterial lipopolysaccharide requires bone marrow—derived lymphocytes.—«J. Immunol.», 1975, v. 114, p. 388.
- Yokomuro K., Nozima T. Bridge foamation between mouse peritoneal macrophage—macrophage and macrophage—lymph node cells and influence of various chemicals.—«J. REC.», 1972, v. 11, p. 579.
- Zembala M., Asherson G. T-cell suppression of contact sensitivity in the mouse. II.—«Eur. J. Immunol.», 1974, v. 4, p. 799.
- van Zwet Th., Thompson J., van Furth R. Effect of glucocorticosteroids on the phagocytosis and intracellular killing by peritoneal macrophages.—«Infect. Immunol.», 1975, v. 12, p. 699.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава I. Клетки мононуклеарной фагоцитирующей системы	6
Происхождение, созревание и классификация	6
Структура и функция	12
Глава II. Лизосомный аппарат макрофагов	26
Структура и функция	26
Наследственные изменения и их роль в патологии	31
Глава III. Роль макрофагов и их лизосомного аппарата в иммунитете	49
Естественные механизмы защиты	49
Участие макрофагов в распознавании чужеродности	51
Обработка антигенов макрофагами	57
Роль макрофагов в антителообразовании	68
Блокада клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы	74
Связь антигена с различными субклеточными фракциями макрофагов и их значение в иммуногенезе	79
Комплексирование антигена с РНК макрофагов	79
Антиген, связанный с мембранами макрофагов	84
Антиген, связанный с фаголизосомной фракцией макрофагов	87
Глава IV. Участие макрофагов в кооперативных взаимодействиях клеток при иммуногенезе	93
Взаимодействие между макрофагами и лимфоцитами	93
Растворимые факторы, выделяемые во время клеточных взаимодействий	106
Глава V. Способы регуляции функции макрофагов	116
Действие адьювантов на клетки мононуклеарной фагоцитирующей системы	116
Регуляция функции клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы антисыворотками к макрофагам или их субклеточным фракциям	128
Действие витаминов и кортикостероидов на клетки мононуклеарной фагоцитирующей системы	141
Влияние агентов, повышающих проницаемость мембран лизосом	146
Глава VI. Роль клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы в сохранении гомеостаза и центральные механизмы регуляции их функции	151
Глава VII. Методы изучения макрофагов и их лизосомного аппарата	168
Получение перитонеальных макрофагов	168

Получение альвеолярных макрофагов	169
Получение макрофагов из селезенки	170
Освобождение суспензии клеток селезенки от макрофагов и других прилипающих клеток	170
Получение моноцитов и макрофагов из крови	172
Выделение макрофагов (звездчатых эндотелиоцитов) из печени	173
Разделение клеток перитонеального экссудата методом градиентного центрифугирования	174
Определение жизнеспособности клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы	175
Культивирование макрофагов	176
Метка макрофагов	177
Техника изучения фагоцитоза	179
Исследование скорости очищения кровотока от неоргани- ческих веществ (клиренс)	180
Угнетение функции макрофагов («блокада» РЭС)	181
Определение цитотоксичности макрофагов	181
Флюорохромирование культур макрофагов	182
Метод титрования антисывороток к субклеточным фрак- циям клеток МФС на прижизненно флюорохромирован- ной культуре макрофагов	183
Определение чистоты лизосомных фракций с помощью акридинового оранжевого	184
Фракционирование клеток мононуклеарной фагоцитирую- щей системы	184
Получение антисывороток к макрофагам и их субклеточ- ным фракциям	186
Основная литература	187

ИБ № 1023

ИДА ЯКОВЛЕВНА УЧИТЕЛЬ

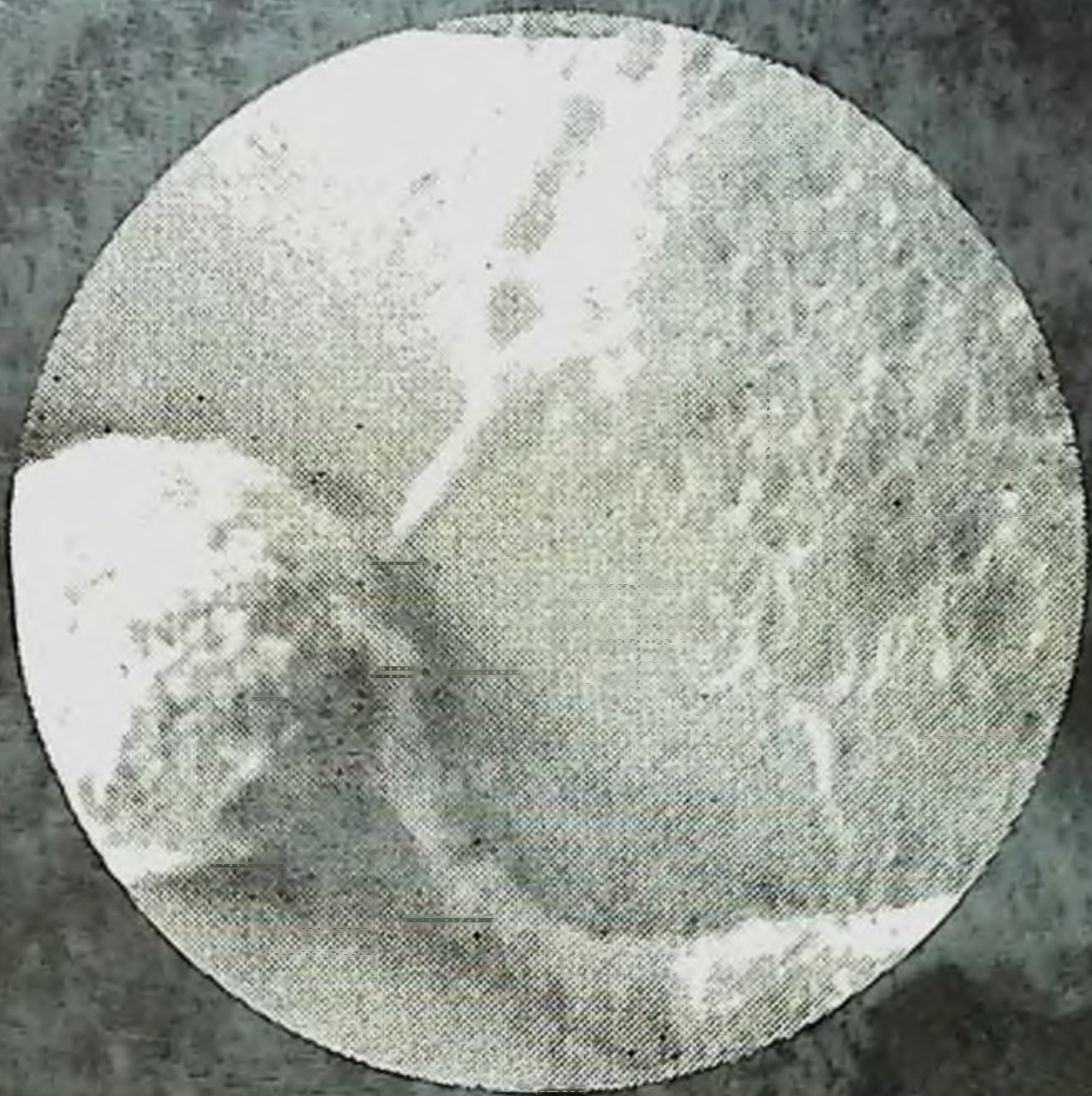
Макрофаги в иммунитете

Редактор *Е. М. Кедрова*
Техн. редактор *С. П. Танцева*
Художественный редактор *Т. М. Смага*
Корректор *В. И. Федорова*
Обложка художника *И. М. Ивановой*

Сдано в набор 25.11.77. Подписано к печати 07.04.78.
Т-08602. Формат бумаги 84×108¹/₃₂. Бум. тип. № 1.
Лит. гарн. Печать высокая. Усл. печ. л. 10,5;
уч.-изд. л. 11,09. Тираж 5000 экз. Заказ 5579.
Цена 1 р. 30 к.

Издательство «Медицина».
Москва, Петроверигский пер., 6/8.
Типография издательства «Горьковская правда»,
г. Горький, ул. Фигнер 32.

Тр.30 к.



МЕДИЦИНА-1978