

по времени оправданны, так как именно в этот период на клетках плода экспрессируются антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA) [10]. Однако, если говорить о патологической беременности, как в случае с гемолитической болезнью новорожденных, то простое сопоставление сроков появления фетальных эритроцитов в кровотоке матери (15 нед беременности [3]) показывает, что процессы формирования вторичного иммунного ответа выходят за временные рамки действия высокой дозы ХГ. Можно предполагать, что такое несоответствие способствует при определенных условиях развитию иммунопатологического процесса.

Выводы

1. ХГ оказывает угнетающее действие на процессы формирования вторичного иммунного ответа в дозе, соответствующей его концентрации в 7—10 нед беременности (200 МЕ).

2. ХГ (200 МЕ) способен избирательно угнетать либо М-АОК, либо G-АОК. Такая селективность зависит от времени воздействия гормона относительно момента повторной иммунизации.

3. ХГ (200 МЕ) снижает клеточность селезенки, на территории которой формируются АОК при вторичном иммунном ответе.

4. Иммуномодулирующее влияние ХГ на процессы формирования вторичного иммунного ответа не зависит от половых стероидов яичников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Димитров Д. Я. Хориальный гонадотропин человека: Пер. с болг. — М., 1979.
2. Кеворков Н. Н., Ширшев С. В., Князев Ю. А. // Пробл. эндокринол. — 1988. — № 6. — С. 79—83.
3. Милер И. Иммуитет человеческого плода и новорожденного. — 1-е изд. — Прага, 1983.
4. Трунова Л. А. Иммунология репродукции. — Новосибирск, 1984.

5. Ширшев С. В., Кеворков Н. Н. // Успехи соврем. биол. — 1991 — Т. 3, № 5. — С. 683—697.
6. Dresser D. W., Wortis H. H. // Nature. — 1965. — Vol. 208, N 5013. — P. 859—861.
7. Han T. // J. Immunol. — 1975. — Vol. 29, N 3. — P. 509—515.
8. Jerne N. K., Nordin A. A. // Science. — 1963. — Vol. 140, N 3365. — P. 405—405.
9. Kevorkov N. N., Shilov Ju. I., Shirshov S. V. // Brain Behav. Immun. — 1991. — Vol. 5. — P. 149—161.
10. Seigler H. F., Metzgar R. S. // Transplantation. — 1970. — Vol. 9. — P. 478—486.
11. Sulke A. N., Jones D. B., Wood P. J. // J. Reprod. Immunol. — 1985. — Vol. 7, N 2. — P. 105—110.
12. Wide L. // Acta endocr. (Kbh.). — 1962 — Suppl. 70. — P. 1—100.

Поступила 30.06.92

S. V. Shirshov — CHORIONIC GONADOTROPIN EFFECT ON SECONDARY IMMUNE RESPONSE FORMATION

Experiments were carried out *in vivo* and *in vitro*. Secondary immune response to sheep red cells was assessed on day 5 after repeated immunization by IgM and IgG antibody-producing cells. Chorionic gonadotropin was injected after reimmunization to intact and ovariectomized animals in doses compatible to those in normal pregnancy. *In vitro* chorionic gonadotropin was added for one h into sensitized splenocyte cultures and then its effects were assessed in syngeneic transfer system by the same parameters. Experiments have demonstrated that in dose 40 MU chorionic gonadotropin cannot influence secondary immune response formation. All hormonal effects are related to 200 MU dose extrapolated from the maximal level of this hormone during pregnancy. In this dose gonadotropin reduced splenocyte counts and inhibited the formation of IgG-antibody-producing cells. Ovarian sex steroids do not mediate chorionic gonadotropin immunomodulating effects. An hour's contact of sensitized splenocytes with the hormone in a high dose resulted in a statistically significant inhibition of the formation of IgM-antibody-producing cells. Hence, if chorionic gonadotropin interacted with immunocompetent cells before their repeated contact with the antigen, IgM-antibody-producing cells suffer, and if this exposure occurs after this contact, IgG-antibody-producing cells decrease in number. The role of chorionic gonadotropin in development of normal pregnancy and that complicated by immunopathologic processes is discussed.

© Т. М. МИШУНИНА, В. Я. КОНОНЕНКО, 1993

УДК 616.433.008.6-07:[616.154:577.175.53+616.154:577.175.325]-092.9

Т. М. Мишунина, В. Я. Кононенко

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕЦЕПТОРНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ГАМК МЕМБРАНАМИ АДЕНОГИПОФИЗА КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЕЙ КОРТИКОСТЕРОИДОВ И АКТГ В ОРГАНИЗМЕ

Лаборатория нейрехимии (руководитель — доктор мед. наук В. Я. Кононенко) Украинского НИИ эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко (дир. — член-корр. АН Украины Н. Д. Тронько) Минздрава Украины

Несмотря на то что факт участия гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в регуляции секреции АКТГ можно считать доказанным, многие вопросы, относящиеся к механизмам реализации ингибиторного ГАМК-ергического контроля функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), остаются невыясненными. Один из них — вопрос о роли ГАМК в процессах регуляции секреции АКТГ кортикостероидами по принципу обратной связи. Предполагают, что кортикостероиды могут ингибировать секрецию АКТГ, изменяя синтез ГАМК [8]. Ранее нами при экспериментальном моделировании различного уровня кортикостероидов и АКТГ в организме крыс было показано изменение синтеза,

метаболизма, а также транспорта медиатора синапсом гипоталамуса [4, 5], что, несомненно, играет определенную роль в процессах регуляции кортикостероидами секреции АКТГ на уровне гипоталамуса. Особое значение при этом имеет состояние рецепторов ГАМК с учетом их центральной роли в молекулярных механизмах гуморальной регуляции физиологических процессов [7]. Установлено существенное влияние кортикостероидов и АКТГ на уровень специфического связывания ^3H -ГАМК синаптическими мембранами гипоталамуса [6]. Роль ГАМК-рецепторов аденогипофиза в механизмах регуляции кортикостероидами секреции АКТГ неизвестна.

Автордиографическими, электрофизиологиче-

Таблица 1

Кинетические параметры специфического связывания ^{14}C -ГАМК плазматическими мембранами аденогипофиза после адrenaлэктомии и введения гидрокортизона и АКТГ intactным и адrenaлэктомизированным крысам

Условия эксперимента	Высокоаффинные ГАМК-рецепторы		Низкоаффинные ГАМК-рецепторы	
	K_d	$B_{\max}$	K_d	$B_{\max}$
Физиологический раствор, 4 ч	0,87	1,12	24,4	1,45
Гидрокортизон, 4 ч	0,98	3,73*	49,5	1,67
АКТГ, 4 ч	1,05	2,47	51,0	2,13
Физиологический раствор, 7 дней	0,94	1,27	15,6	1,41
Гидрокортизон, 7 дней	0,80*	1,88	347,3*	0,32*
АКТГ, 7 дней	1,37	1,74	32,0	1,76
Ложная адrenaлэктомия	0,97	2,91	20,0	1,22
Адrenaлэктомия	5,13*	1,83*	16,1	2,09*
Адrenaлэктомия + гидрокортизон, 4 ч	0,91**	2,06	17,0	0,85**

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, две — $p < 0,05$ по сравнению с адrenaлэктомией.

и низкоаффинных ГАМК-рецепторов; количество первых ($B_{\max}$) при этом увеличивалось. Величина эффективности связывания для высокоаффинных ГАМК-рецепторов повышалась в 10 раз, для низкоаффинных снижалась в 1,5 раза (табл. 2). Многократное введение гидрокортизона сопровождалось снижением K_d для высокоаффинных ГАМК-рецепторов и существенным (в 22 раза) повышением K_d для низкоаффинных рецепторов. Количество последних при этом снижалось. Эффективность связывания для низкоаффинных ГАМК-рецепторов резко уменьшалась (в 423 раза), а для высокоаффинных увеличивалась в 2,6 раза. Введение АКТГ не изменяло величины кинетических параметров связывания ГАМК с рецепторами. Количество высокоаффинных ГАМК-рецепторов ($B_{\max}$) и их сродство (K_d) снижались после удаления надпочечников, эффективность связывания изменялась незначительно. Количество низкоаффинных рецепторов и эффективность связывания ими ГАМК при этом повышались. Однократное вве-

Таблица 2

Эффективность связывания ^{14}C -ГАМК плазматическими мембранами аденогипофиза после адrenaлэктомии и введения гидрокортизона и АКТГ intactным и адrenaлэктомизированным крысам ($B_{\max}^2:K_d$)

Условия эксперимента	Высокоаффинные ГАМК-рецепторы	Низкоаффинные ГАМК-рецепторы
Физиологический раствор, 4 ч	1,44	0,086
Гидрокортизон, 4 ч	14,20	0,056
АКТГ, 4 ч	5,81	0,089
Физиологический раствор, 7 дней	1,72	0,127
Гидрокортизон, 7 дней	4,42	0,0003
АКТГ, 7 дней	2,21	0,097
Ложная адrenaлэктомия	8,73	0,074
Адrenaлэктомия	6,53	0,270
Адrenaлэктомия + гидрокортизон, 4 ч	4,66	0,043

сками и фармакологическими исследованиями доказано присутствие ГАМК-рецепторов обоих типов (ГАМК_A и ГАМК_B) в аденогипофизе, изучаются их характеристики, влияние на экспрессию генов пролактина, участие в регуляции некоторых других гормонов аденогипофиза (гонадотропинов, соматотропина) [9].

Целью данной работы явилось исследование кинетических параметров специфического связывания ^{14}C -ГАМК плазматическими мембранами аденогипофиза крыс при моделировании в организме животных различных уровней кортикостероидов и АКТГ.

Материалы и методы

Опыты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. Надпочечники удаляли у животных под эфирным наркозом за 8 дней до опыта. Гидрокортизон («Gedeon Richter», Венгрия) в дозе 5 мг на 100 г массы тела, кортикотропин и кортикотропин-цинк-фосфат (Каунасский завод эндокринных препаратов) в дозе 2,5 ЕД на 100 г массы тела вводили внутримышечно. Крыс декапитировали через 4 ч после однократного введения и через 24 ч после последней инъекции гормонов при многократном введении препаратов в течение 7 дней. Контролем служили ложнопериоварирующие крысы и крысы, которым однократно или многократно вводили соответствующий объем физиологического раствора.

Для получения плазматических мембран использовали ткань аденогипофиза от 5–8 животных. Гомогенаты готовили в 50 мМ трис-цитратном буфере pH 7,1, центрифугировали при 40 000 g в течение 20 мин (4 °C). Осадок мембран суспендировали в трис-цитратном буфере, замораживали при –20 °C; после оттаивания пробы центрифугировали при тех же условиях, трижды промывали с последующим осаждением и хранили при –20 °C. Осадок плазматических мембран перед использованием суспендировали в свежем буфере. Аликвоты (100 мкг белка) мембран инкубировали 15 мин при 0 °C в 50 мМ трис-цитратном буфере pH 7,1, содержащем различные концентрации ^{14}C -ГАМК (1–512 пМ, удельная радиоактивность 200 Ки/мМ; «Amersham», Великобритания), используя пробирки фирмы «Beckman» (США). Реакцию останавливали центрифугированием проб в течение 10 мин при 40 000 g. Супернатант сливали, остаток жидкости тщательно удаляли фильтровальной бумагой, а к осадку приливали сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Подсчет радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS 500 TA («Beckman»). Специфическое связывание определяли как разницу между общим (в отсутствие ГАМК) и неспецифическим (в присутствии 10^{-3} М немеченой ГАМК) связыванием. Величины K_d и $B_{\max}$ рассчитывали, используя метод Корниш–Боуден [3]. При статистической обработке данных в качестве значения изучаемой величины рассматривали медиану [2]; сравнение парных рядов величин K_d и $B_{\max}$ проводили методом критерия знаков [1]. Рассчитывали также величину эффективности связывания медиатора ($B_{\max}^2:K(d)$ [10] и коэффициент корреляции между изменениями уровня гормонов в крови и изменениями исследуемых кинетических параметров связывания меченой ГАМК [1].

Результаты и их обсуждение

При определении кинетических параметров специфического связывания ^{14}C -ГАМК плазматическими мембранами аденогипофиза intactных крыс выявлены 2 популяции рецепторов соответственно с низким ($K_d=20,0$ пМ, $B_{\max}=1,36$ пмоль на 1 мг белка) и высоким ($K_d=0,92$ пМ, $B_{\max}=1,77$ пмоль на 1 мг белка) сродством к лиганду. Эффективность связывания медиатора рецепторами с низким сродством в 40 раз ниже таковой высокоаффинных рецепторов (соответственно 0,096 и 3,96).

Как видно из табл. 1, однократное введение гидрокортизона не изменяло K_d для высоко-

Таблица 3

Корреляционная связь между изменениями содержания гормонов ГГНС в плазме крови и изменениями величин кинетических параметров рецепторного связывания ^{14}C -ГАМК плазматическими мембранами аденогипофиза (коэффициент Спирмена)

Гормон	Высокоаффинные ГАМК-рецепторы		Низкоаффинные ГАМК-рецепторы	
	K_d	B_{max}	K_d	B_{max}
АКТГ	+0,886*	—0,486	—0,486	+0,771*
Кортизол	—0,943*	+0,600	+0,543	—0,886*
Кортикостерон	—0,086	+0,604	—0,714	—0,143

Примечание. Звездочка — уровень корреляционной связи между сравниваемыми показателями статистически значим ($p < 0,05$).

дение гидрокортизона адrenaлэктомированным крысам оказывало нормализующее действие на состояние ГАМК-рецепторов аденогипофиза.

При сопоставлении полученных результатов с изменениями уровня АКТГ, кортизола и кортикостерона в крови установлено [4], что изменение сродства высокоаффинных и количества низкоаффинных ГАМК-рецепторов аденогипофиза коррелировало с изменениями содержания АКТГ и кортизола (табл. 3).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ГАМК-рецепторы аденогипофиза, вероятно, принимают участие в механизмах регуляции кортикостероидами секреции АКТГ по типу обратной связи. Следует отметить, что повышение уровня АКТГ в организме после введения экзогенного гормона не влияло на кинетические параметры специфического связывания меченой ГАМК мембранами аденогипофиза, но изменение уровня эндогенного гормона связано с изменениями состояния рецепторов ГАМК. Предполагают, что в гипоталамусе состояние ГАМК-рецепторов в большей степени зависит от уровня АКТГ, чем от уровня кортикостероидов [6, 10], хотя в литературе это мнение дискутируется [11]. При этом общим можно считать вывод о том, что эффект как глюкокортикоидов, так и АКТГ обусловлен прямым аллостерическим действием гормонов на мембраны и модификацией сродства ГАМК-рецепторов к медиатору, характеризующейся к тому же выраженными регионарными различиями [11]. Это тем более интересно, что местом локализации глюкокортикоидных рецепторов на мембране нейрона является локус, принадлежащий олигомерному рецепторному комплексу ГАМК—бензодиазепин— Cl^- -канал [13].

В аденогипофизе нами выявлены изменения не только сродства, но и количества ГАМК-рецепторов. Анализ полученных данных позволяет предположить, что кратковременное действие глюкокортикоидов затрагивает состояние высокоаффинных рецепторов, характер изменений которого предполагает активацию ГАМКергических механизмов торможения секреции АКТГ. При длительном избытке кортикостероидов в организме наряду с повышением сродства высокоаффинных ГАМК-рецепторов наблюдаются резкие изменения в состоянии низкоаффинных

ГАМК-рецепторов. Связывание медиатора этим типом рецепторов практически отсутствует (см. табл. 2); возможно, такая реакция является компенсаторной, препятствующей глубокому торможению функции ГГНС (уровень АКТГ снижается в этих условиях эксперимента почти в 6 раз [4]). При этом необходимо отметить, что в состав рецепторного комплекса ГАМК—бензодиазепин— Cl^- -канал входят преимущественно низкоаффинные ГАМК-рецепторы [12], роль которых в механизмах влияния кортикостероидов на мозг доказана [11]. В условиях адrenaлэктомии при низком уровне глюкокортикоидов в организме и высоком содержании АКТГ оба типа ГАМК-рецепторов реагируют изменением своего функционального состояния, причем направленность сдвигов для низко- и высокоаффинных рецепторов противоположна (см. табл. 1), что может свидетельствовать о различных функциях подтипов ГАМК-рецепторов в механизмах регуляции секреции АКТГ на уровне аденогипофиза.

Выводы

1. Однократное введение гидрокортизона не изменяло сродство низко- и высокоаффинных ГАМК-рецепторов в аденогипофизе крыс; количество последних при этом увеличивалось.

2. Многократное введение гидрокортизона сопровождалось повышением сродства высокоаффинных ГАМК-рецепторов и резким снижением сродства и количества низкоаффинных ГАМК-рецепторов аденогипофиза.

3. Введение АКТГ не изменяло величину кинетических параметров связывания ^{14}C -ГАМК с рецепторами аденогипофиза крыс.

4. Количество высокоаффинных ГАМК-рецепторов и их сродство снижались после удаления надпочечников; количество низкоаффинных рецепторов при этом повышалось. Однократное введение гидрокортизона адrenaлэктомированным крысам оказывало нормализующее действие на состояние ГАМК-рецепторов аденогипофиза крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кириаков Г. В., Никурадз В. О., Рожанец В. В. Эффективность связывания — новый показатель для сравнения состояния рецепторов. — М., 1985. (Рукопись деп. в ВИНТИ, № 6182—85 Деп.)
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М., 1980.
3. Машилов К. В., Кириаков Г. В., Малин К. М. и др. // Бюл. exper. биол. — 1987. — № 4. — С. 506—508.
4. Мишунина Т. М., Кононенко В. Я. // Укр. бнохим. журн. — 1990. — Т. 62, № 6. — С. 71—79.
5. Мишунина Т. М., Кононенко В. Я. // Докл. АН УССР. — 1990. — № 10. — С. 63—66.
6. Мишунина Т. М., Кононенко В. Я. // Бюл. exper. биол. — 1991. — № 1. — С. 42—43.
7. Сергеев П. В., Шимановский Н. Л. Рецепторы физиологически активных веществ. — М., 1987.
8. Acs Z., Stark E. // J. Endocr. — 1978. — Vol. 77, N 1. — P. 137—141.
9. Demeneix B., Feltz P., Loeffler J. // GABAergic Mechanism in the Mammalian Periphery / Eds S. Erdo, N. Boery. — New York, 1986. — P. 261—289.
10. Kendal D., McEwen B., Enna S. // Brain Res. — 1982. — Vol. 236, N 2. — P. 365—374.
11. Majewska M., Bissler J.-C., Eskay R. // Ibid. — 1985. — Vol. 339, N 1. — P. 178—182.

12. Supaviali P., Cortes R., Palacios J. et al. // Modulation of Central and Peripheral Transmitter Function / Eds G. Biggio et al.— New York, 1986.— P. 453—457.
13. Sutanto W., Handelsman G., De Kloet E. // Neuroendocr. Lett.— 1988.— Vol. 10, N 4.— P. 280.

Поступила 07.05.93

T. M. Mishunina, V. Ya. Kononenko — KINETIC PARAMETERS OF GABA RECEPTOR BINDING BY RAT ADENOHYPOPHYSAL MEMBRANES UNDER CONDITIONS OF MODELLING VARIOUS CORTICOSTEROID AND ACTH LEVELS IN THE BODY

Kinetic parameters of ^{14}C -GABA specific binding by rat adenohypophyseal plasma membranes were studied in experiments on modelling various corticosteroid and ACTH

levels in animal body. A single hydrocortisone injection did not change K_d for high- and low-affinity GABA receptors, the number of the former (B_{max}) increasing in this case. Repeated hydrocortisone injections were associated with K_d reduction for high-affinity GABA receptors and a noticeable increase of K_d for low-affinity receptors, with their number reducing. ACTH injection did not change the kinetic parameters of GABA binding with receptors. The number of high-affinity GABA receptors and their affinity reduced after removal of adrenals whereas the number of low-affinity receptors in this case was increasing. A single hydrocortisone injection to adrenalectomized rats had a normalizing effect on adenohypophyseal GABA receptors. Analysis of the results and changes in blood hormonal levels indicated that affinity changes in high-affinity receptors and changed number of low-affinity adenohypophyseal GABA receptors correlated with changes in ACTH and hydrocortisone changes.

© С. И. КРАЙНОВА, В. И. КАНДРОР, 1993

УДК 616.441-006.5-07:616.153.96-097-078.33

С. И. Крайнова, В. И. Кандор

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИТЕЛ ИЗ СЫВОРОТОК БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМИ ТИРЕОПАТИЯМИ С ИЗОЛИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ДИФфуЗНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ЭУТИРЕОИДНОГО УЗЛОВОГО ЗОБА

Лаборатория патофизиологии (зав.— проф. В. И. Кандор) Эндокринологического научного центра (дир.— член-корр. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Основные аутоиммунные заболевания щитовидной железы (ЩЖ) включают диффузный токсический зоб — ДТЗ (болезнь Грейвса) и хронический тиреоидит (болезнь Хашимото) с его вариантами. В последние годы наблюдается отчетливый рост распространенности этих заболеваний [3], что делает актуальным углубленное изучение их патогенеза.

Несмотря на некоторые общие черты в клинической картине и морфологии ЩЖ при двух указанных заболеваниях, дифференциальный диагноз между ними в большинстве случаев вполне возможен. ДТЗ, как известно, характеризуется гиперплазией тиреоидной паренхимы с частым присутствием в ней того или иного количества лимфоидных элементов. При тиреоидите Хашимото (ТХ), наоборот, наблюдаются уменьшение функционирующих элементов тиреоидной ткани с замещением их лимфоцитами различных субпопуляций, а также более или менее выраженный фиброз железы.

Учитывая доказанную роль аутоиммунных механизмов в патогенезе обоих заболеваний, можно было предполагать, что такие механизмы при каждом из них отличаются своеобразием, приводя в одном случае (ТХ) к убыли функциональных элементов тиреоидной паренхимы, а в другом (ДТЗ) — к их активации и гиперплазии. В связи с этим нам представлялось целесообразным оценить возможные различия в эффективности иммунологических механизмов цитотоксичности по отношению к изолированным тиреоцитам при обоих заболеваниях.

Известно существование ряда видов цитотоксичности: клеточной, антителозависимой клеточно-опосредованной (АЗКЛОЦ) и, наконец, антителозависимой комплементопосредованной (АЗКОЦ). В данной работе мы проанализировали только последний вид цитотоксичности, поскольку при тиреоидной патологии он получил наименьшее освещение в литературе [10].

Материалы и методы

Пациенты. Сыворотки были получены от 46 больных ДТЗ (41 женщина и 6 мужчин в возрасте 21—60 лет) и от 48 больных ТХ (42 женщины и 6 мужчин в возрасте 15—65 лет) с впервые выявленными заболеваниями, обследованных в клинических подразделениях Эндокринологического научного центра (ЭНЦ) РАМН (канд. мед. наук Н. Ю. Свириденко) с использованием данных гормональных и гистологических исследований.

Первичные клеточные культуры. Клетки выделяли из наиболее доступной ткани ДТЗ (полученной при операции). Учитывая возможные изменения антигенного состава поверхности таких клеток, мы сочли целесообразным проверить действие испытываемых сывороток и на относительно нормальных тиреоцитах. Материалом для получения последних служила околоушная ткань больных с эутиреоидным узловым зобом (ЭУЗ). Все операции выполнены в хирургическом отделении ЭНЦ РАМН (канд. мед. наук Э. Н. Базарова).

Ткань измельчали ножницами, обрабатывали коллагеназой В («Boehringer», ФРГ) в концентрации 1 мг/мл в растворе Хенкса, не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} , в течение 2,5—3 ч при 37 °С на водяной бане со встряхиванием. Полученный материал дробили пипетированием, пропускали через капроновый фильтр, центрифугировали трижды в среде МЕМ на центрифуге ОПН-ЗУХЛ 4,2 по 30 с при 1500 об/с и помещали в ростовую среду (среда 199 с 5 % эмбриональной сыворотки теленка, 0,6 мг/мл глутамина, 2,4 мг/мл НЕПЕС, по 50 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина). Судя по окраске витальным красителем (трипановый синий), число живых клеток в суспензии составляло 95—100 %. Клеточная суспензия состояла из одиночных клеток и небольших кластеров, насчитывающих 5—20 клеток. Клетки рассаживали в 96-луночные планшеты с плоским дном (по 200 000 клеток в 1 лунку с 200 мкл ростовой среды). В тот же день к клеткам добавляли ^3H -тимидин (2 мКи/мл) и инкубировали 72 ч при 37 °С во влажном воздухе, насыщенном CO_2 . В дальнейшем мы отказались от культивирования клеток. В этом случае клетки (по 200 000 клеток в 30 мкл ростовой среды) рассаживали в лунки с покрытым агаром дном. Поскольку результаты исследования цитотоксичности испытываемых сывороток в обоих случаях были идентичными, данные объединили.

Определение цитотоксичности. В опытах с использованием ^3H -тимидина жидкость из лунок с прикрепившимися к дну клетками удаляли. Клетки трижды промывали средой 199 и затем добавляли к ним 30 мкл среды 199, 30 мкл испытываемой сыворотки (прогретой в течение 30 мин при 56 °С для инактивации собственного комплемента) и 30 мкл комплемента, источником которого служила высушенная кроличья сыворотка, разведенная по инструкции средой 199. Инку-