

Ю. В. ЗЫКОВ, В. Т. ТИМОФЕЕВ, Ю. Т. АЛЕКСАНЫ

АНТИГЕНЫ А, В, О В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Ряд исследователей установили наличие изоантигенов А, В, О не только в эритроцитах, но и в нормальных и злокачественно перерожденных тканях человека [1, 3 и др.]. Однако вопрос о наличии этих антигенов внутри клетки до настоящего времени остается малоизученным [4, 9, 10].

Задачей настоящего исследования явилось изучение локализации антигенов системы АВО в цитоплазматических фракциях тканей человека.

Исходным материалом служили нормальные и опухолевые (аденокарцинома) ткани желудка человека, полученные во время операции. Свежий материал измельчали ножницами, отмывали от крови холодной водой и гомогенизировали в стеклянном размельчителе Поттера с тefлоновым пестиком. На одну весовую часть ткани брали 10 частей раствора, содержащего 0,25 М сахарозы, 0,025 М KCl, 0,005 М MgCl₂, 0,05 М трис- HCl буфера (рН 7,4). Полученные гомогенаты фильтровали через марлю и дважды центрифугировали при 1500g в течение 10 мин. для освобождения от тканевых обрывков, неразрушенных клеток и ядер. Методом дифференциального центрифугирования [12] из супернатанта выделяли фракции митохондрий (12000g—15 мин.), микросом и клеточного сока (105000g—60 мин.). После обработки микросомальной фракции раствором, имеющим 0,5%-ную конечную концентрацию дезоксихолата натрия, осаждали рибосомы (105000g—120 мин.). Все фракции цитоплазматических гранул подвергали двукратному отмыванию в той же среде и при указанных выше режимах, ресуспендировали, определяли содержание белка по методу Лоури [11] и разводили до концентрации 1 мг белка в 1 мл.

Иммунологический анализ изоантигенов гранулярных фракций проводили методом специфической абсорбции изоантител [3], а растворимых фракций (клеточный сок) методом дробного истощения стандартных сывороток [2], причем параллельно ставили ускоренный вариант этой реакции («экспресс-тест»), заключающийся в приготовлении последовательных разведений гемагглютининов на истощающей фракции без рекомендуемых 15-минутных интервалов. В обоих случаях получены идентичные результаты.

В качестве реагентов использовали стандартные изосыворотки О, А и В групп крови с титром 1 : 32, а также фитогемагглютинин анти-О (Н) с титром 1 : 24, полученный из семян рахитника сидячелистого [5].

При постановке реакции абсорбции изоантител к осадку, полученному после центрифугирования определенного объема суспензии фракции (как правило, 2 мл), добавляли 10 капель сыворотки α , β или фитогемагглютинина анти-О. Пробы тщательно перемешивали и оставляли на 18—20 ч. при +4°C. На следующий день их повторно центрифугировали; надосадочную жидкость отсасывали и разводили от 1 : 2 до 1 : 48. Титрование производили при наличии одной капли 2%-ной взвеси стандартных эритроцитов О, А или В групп крови.

Оценку результатов реакции производили после центрифугирования при 1500 об./мин. в течение 1 мин. Критерием обнаружения того или иного изоантигена во фракции считали падение титра соответствующего геагглютинина не менее, чем на 3 разведения по сравнению с контролем. Все опыты повторяли несколько раз и были хорошо воспроизводимы.

Были исследованы цитоплазматические фракции, выделенные из 28 нормальных и раковых тканей желудка человека, причем 8 из них относились к О, 10—к А, 6—к В, 4—к АВ группам. Поскольку во всех фракциях, выделенных как из нормальных, так и из опухолевых тканей, были получены одинаковые результаты, мы не будем разделять фракции по их происхождению. Суммарные результаты опытов специфической абсорбции и дробного истощения представлены в табл. 1.

Как видно из данных таблицы, митохондриальные, микросомальные и растворимые (клеточный сок) фракции специфически абсорбируют α - или β -геагглютинин, что мы трактуем как обнаружение соответственно А- или В-изоантигена. В то же время во фракции клеточного сока О (Н)-антиген в ряде случаев обнаруживался недостаточно четко ($\pm$), хотя его выявление во фракциях митохондрий и микросом никогда не вызывало сомнений. Следует подчеркнуть, что при исследовании фракций рибосом нами ни разу не отмечалось специфической абсорбции геагглютининов, что, вероятно, указывает на отсутствие групповых веществ системы АВО в рибосомальных фракциях.

В количественном отношении абсорбция микросомальными фракциями выражена сильнее, чем митохондриальными. С другой стороны, фракции тканей группы В наиболее полно абсорбируют β -агглютинины по сравнению с фракциями тканей А и О групп крови в отношении соответствующих агглютининов.

Интересно отметить, что при исследовании фракций, выделенных из тканей двух лиц с группой крови В, нами отмечена одновременная абсорбция всеми изучаемыми фракциями (крови рибосом) как β -, так и анти-О агглютинина; в то же время титр α -изоантител не снижался. Сходное наблюдение имелось в одном случае при исследовании фракций митохондрий и микросом из тканей больного группы А—одновременная абсорбция агглютининов α - и анти-О при неизменном титре β -аг-

Таблица 1

Изоантигены системы АВО во фракциях нормальных и опухолевых тканей человека

Исследуемый материал		Гемагглютинины			Количество исследованных фракций
Ткань	фракция	анти-О	α	β	
О	Мх	+	—	—	8
	Мс	+	—	—	8
	Рс	—	—	—	6
	КС	+	—	—	8
А	Мх	—	+	—	10
	Мс	—	+	—	10
	Рс	—	—	—	5
	КС	—	+	—	8
В	Мх	—	—	+	6
	Мс	—	—	+	6
	Рс	—	—	—	3
	КС	—	—	+	6
АВ	Мх	—	+	+	4
	Мс	—	+	+	4
	Рс	—	—	—	1
	КС	—	+	+	4

Обозначения: О, А, В, АВ—групповая принадлежность лиц, ткани которых подвергались фракционированию; Мх—митохондрии; Мс—микросомы; Рс—рибосомы; КС—клеточный сок; +специфическая абсорбция агглютина (наличие антигена);—отсутствие абсорбции агглютина.

глютенинов. Эти исключения, по нашему мнению, также заслуживают внимания с точки зрения установления генотипа АО и ВО у лиц с группой крови А и В.

При подборе оптимальных условий проведения абсорбции гемагглютининов нами были испытаны суспензии фракций с содержанием от 1 до 10 мг белка. Установлено, что специфическое связывание антител наблюдалось в дозе 1 мг, однако более четкие и стабильные результаты давали фракции в дозах 2—3 мг белка. Фракции с 5 мг и более белка часто вызвали неспецифическое падение титра антител. Однако, учитывая неодинаковое содержание изоантигенов в различных тканях [1, 8], рекомендуемое нами количество белка фракций (2—3 мг) следует рассматривать как ориентировочное при проведении таких опытов с другими тканями.

Следует отметить, что при постановке реакций абсорбции с длительно хранимыми фракциями (3—4 недели при +4°C) иногда наблюдалась неспецифическая абсорбция гемагглютининов, которую в значительной степени удавалось устранить предварительной обработкой таких фракций сывороткой крови человека группы АВ и прогреванием в течение 10 мин. при 100°C, предложенными Г. П. Трибулевым и П. Н. Косяковым [7]. Указанная обработка свежеполученных фракций не

влияла на результаты реакций, что лишний раз свидетельствует о термостабильности исследуемых антигенов.

Таким образом, исследование цитоплазматических фракций нормальных и опухолевых тканей желудка человека показало, что изоантигены системы АВО обнаруживаются не только на поверхности клеток, но и во фракциях митохондрий и микросом. Подобные результаты были получены и при исследовании других тканей [4, 9, 10]. Наряду с этим нами показано наличие группоспецифических веществ А, В, О в растворимых фракциях и отсутствие их в рибосомальных. Последнее мы связываем с тем, что фракция рибонуклеопротеидных гранул не содержит мембранных элементов. Поскольку известно, что изоантигены существуют в жир- и водорастворимых формах [8], мы полагаем, что изоантигены, находящиеся внутри клетки в жирорастворимой форме, прочно связываются с липопротеидными компонентами мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума. В то же время изоантигены, выявляемые во фракциях клеточного сока, находятся, по-видимому, в водорастворимой форме.

Институт экспериментальной биологии
АМН СССР

Поступило 27/VI 1969 г.

Յու. Վ. Զիկով, Վ. Տ. Տիմոֆեև, Յու. Տ. Ալեքսանյան

А, В, О ԱՆՏԻԳԵՆՆԵՐԸ ՄԱՐԴՈՒՆ ԵՆՈՐՄԱԼ ԵՎ ՈՒՌՈՒՅՔԱՅԻՆ
ՀՅՈՒՍՎԱԽՔԱՅԻՆ ԵՆԹԱԲԶՁԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրված է А, В, О համակարգի անտիգենների լուակիզացիան մարդու ստամոքսի նորմալ և ուռուցքային հյուսվածքների ցիտոպլազմատիկ ֆրակցիաներում:

Հատիկավորված ֆրակցիաների իզոանտիգենների իմունոլոգիական անալիզը կատարվել է իզոհակամարմինների սպեցիֆիկ արտոբեցիայի մեթոդով, իսկ լուծվող ֆրակցիայում (բջջահյուսվածք)՝ ստանդարտ շիճուկների կոտորակային հյուսվածությունից մեթոդով:

Ինչպես ցույց են տվել հետազոտման արդյունքները, А, В, О համակարգի անտիգենները հայտնաբերվել են լուծվող ֆրակցիայում ինչպես նորմալ, այնպես էլ ուռուցքային հյուսվածքների միտոքոնդրիաների և միկրոսոմների ֆրակցիաներում, բայց ի հայտ չեն եկել այդ հյուսվածքների ռիբոսոմների ֆրակցիայում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Косяков П. Н. Иммунология/изоантигенов и изоантител. М., 1965.
2. Косяков П. Н., Ровнова З. И. ЖМЭИ, 1952, II, стр. 11.
3. Кричевский И. Л., Шварцман Л. А. Труды Микробиологического института Наркомпроса, IV. М., 1928, стр. 215.

4. Кузнецова Н. И. Материалы симпозиума по биологическому исследованию шизофрении. М., 1967, стр. 81.
5. Поталов М. И. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1964, 8, стр. 108.
6. Тимофеев В. Т. Диссертация. М., 1967.
7. Трибулев Г. П., Косяков П. Н. ЖМЭИ, 1938, XXI, 6, 12, стр. 105.
8. Boyd W. In book: Methodology in Human Genetic. San Francisco, 1962, 335.
9. Fujii K. Bull. Tokyo Med. Dent. Uniceer., 1963, 10, 1, 27.
10. Kornfeld S., Konfrid R., Ginsburg V. Arch. Biochem. Biophys., 1965, 110, 1, 1.
11. Lowry O. et all. J. Biol. Chem., 1951, 193, 1, 265.
12. Schneider W. C., Högeboom G. H. Cancer Res., 1951, 11, 1.