

УДК 612.017.1:612.438.4

В. О. Малижев

СТИМУЛЮЮЧА ДІЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ФАКТОРА ТИМУСА НА АКТИВНІСТЬ ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИН В РЕАКЦІЇ ЗМІШАНИХ ЛІМФОЦИТІВ

У раніше проведеному дослідженні [4] було показано, що низькомолекулярна лімфоцитозстимулююча речовина тимуса (ЛСР) має здатність стимулювати активність лімфоцитів у реакції «трансплантат проти хазяїна». Таке підсилення імунної реактивності клітин обумовлене тим, що під впливом ЛСР розмножуються зрілі кортизонрезистентні Т₂-лімфоцити [4]. Згадана популяція тимусзалежних лімфоїдних клітин відповідає не тільки за розвиток реакції «трансплантат проти хазяїна». Вона бере безпосередню участь у формуванні й інших феноменів клітинного імунітету. Зокрема, при культивуванні Т-лімфоцитів спільно з генетично чужорідними клітинами лімфоїдних органів спостерігається трансформація Т₂-клітин у бласти — великі базofilні лімфоцити, здатні до поділу. Ця проліферативна відповідь у змішаній культурі лімфоцитів відображає початкову стадію клітинного імунітету, етап специфічного розпізнавання алоантигенів в умовах *in vitro* [8]. При цьому бласттрансформації зазнають лише ті лімфоцити, імунокомпетентність яких безперечна [5].

Результати деяких досліджень свідчать про те, що набуття імунологічної реактивності Т-лімфоцитами залежить від гормонів тимуса [9, 11, 12]. Наші дані вказують на те, що немаловажну роль у цьому процесі може відігравати низькомолекулярний фактор тимуса — ЛСР.

Методика досліджень

В досліджах використовували мишей ліній AKR, CBA, C57BL/6 та їх гібридів першого покоління (C57BL×AKR)F₁ і (CBA×C57BL)F₁. ЛСР виділяли з тимуса телят за методом, описаним раніше [1]. Кількість препарату визначали в умовних міліграмах бичачого альбуміну за Лоурі.

Ефект ЛСР на активність лімфоцитів селезінки вивчали в одно- та двонаправленій мікст-культурі. Тест-клітинами служили спленоцити новонароджених чи статевозрілих мишей. Селезінку виділяли в асептичних умовах, подрібнювали і фільтрували через нейлонову сітку. Фільтрат центрифугували на протязі 7 хв при 500 г. Еритроцити знищували гіпотонічним шоком. Остаточний осад клітин суспендували в невеликому об'ємі повного середовища, яке складалося із середовища 199, інактивованої сироватки ембріонів корови (10%) та антибіотиків (50 мкг/мл стрептоміцину і 50 ЕД/мл пеніциліну). Життєздатність клітин визначали з допомогою трипанового синього. Перед культивуванням клітини інкубували з ЛСР протягом 1,5 год при 37° (100×10⁶ клітин в 1 мл середовища та 40 мкг препарату/мл). Після інкубації лімфоцити двічі промивали свіжим середовищем 199 і суспендували в повному середовищі зазначеного складу.

Для проведення дослідів з односторонньою реакцією змішували лімфоцити батьківської та гібридної ліній мишей. В цій системі клітини гібридів генетично не здатні реагувати на лімфоцити батьківського генотипу, в силу чого є можливість враховувати реакцію лише спленоцитів останнього [6]. Двонаправлену реакцію вивчали в суміші клітин селезінки мишей двох генетично різних ліній — CBA(H—2^b) та C57BL/6(H—2^b).

Суміш клітин культивували у щільно закритих пробірках розміром 16×70 мм. Кожна проба вміщувала 2 мл середовища та відповідну кількість лімфоцитів, зазначену

в таблицях. Культури інкубували на протязі 120—140 год у вологій атмосфері, збагаченій CO_2 , при температурі 37°.

Облік реакції змішаних лімфоцитів провадили за процентом лімфобластів, або за інтенсивністю синтезу ДНК. Число бластних клітин підраховували в мазках, забарвлених азур-еозином. Синтез ДНК вивчали радіометричним методом. У проби за 4 год до кінця культивування вводили 0,5 мккюри/мл H^3 -тимідину. Культури охолоджували й клітини осаджували 5% розчином ТХУ. Радіоактивність осаду, перенесеного на міліпорові фільтри, підраховували на сцинтиляційному лічильнику *Isocap-300*.

Результати досліджень та їх обговорення

В табл. 1 наведені результати вивчення дії ЛСР на утворення лімфобластів в однонаправленій змішаній культурі через 140 год інкубації. Спленоцити новонароджених мишей АКР не стимулюються алогенними клітинами в мікст-культурі. Це пояснюється тим, що спленоцити новонароджених мишей імунологічно інертні. Здатність розпізнавати чужорідні антигени розвивається у них лише через 3—6 днів після народження [7, 10]. Проліферативна відповідь клітин селезінки статевозрілих мишей АКР в наших дослідах повністю узгоджується з цим фактом.

Таблиця 1
Вплив ЛСР на активність спленоцитів мишей АКР в мікст-культурі

Взаємодіючі клітини		Кількість проб	Процент лімфобластів
спленоцити мишей АКР	спленоцити мишей (C57BL×AKR) _{F₁}		
2×10 ⁶ клітин новонароджених мишей, преінкубованих з ЛСР	—	8	0
2×10 ⁶ клітин новонароджених мишей, преінкубованих з ЛСР	2×10 ⁶	9	19,0
2×10 ⁶ клітин новонароджених мишей, без обробки ЛСР	2×10 ⁶	10	0
4×10 ⁶ клітин статевозрілих мишей	—	7	0
4×10 ⁶ клітин статевозрілих мишей, преінкубованих з ЛСР	—	7	0
2×10 ⁶ клітин статевозрілих мишей, преінкубованих з ЛСР	2×10 ⁶	10	20,0
2×10 ⁶ клітин статевозрілих мишей, без обробки ЛСР	2×10 ⁶	10	8,5

При випробуванні неонатальних клітин, преінкубованих з ЛСР, в змішаній культурі виявлено в середньому 19% лімфобластів. Утворення бластних форм, очевидно, має імунологічну природу, оскільки лімфоцити, оброблені препаратом самі по собі, не трансформуються в ці строки у бласти. Можливо, що під впливом ЛСР спленоцити набувають імунокомпетентності, причому для прискорення дозрівання клітин досить лише 1,5 год контакту лімфоцитів з препаратом. Подібні результати були одержані іншими дослідниками при вивченні поліпептидного фактора тимуса — тимозину [10]. Проте, оскільки в цих дослідах використовували ІІІ фракцію тимозину, можна думати, що цей ефект був зумовлений домішками ЛСР.

Активність лімфоцитів у мікст-культурі посилювалась і в тому випадку, коли лімоцитозстимулюючою речовиною обробляли клітини статевозрілих мишей АКР. Селезінка дорослих тварин містить як мінімум

дві субпопуляції тимусзалежних лімфоцитів. T_1 -клітини являють собою імунологічно некомпетентну частину, тоді як T_2 -лімфоцити — це кортизонрезистентні зрілі в імунологічному відношенні клітини. Завдяки останнім і відбувається реакція змішаних лімфоцитів. Отже, стимулююча дія ЛСР на мікст-культуру статевозрілих лімфоцитів може бути пов'язана з посиленням активності комітованих клітин, або з диференціацією незрілої субпопуляції спленоцитів. Реальність другої можливості підтверджується тим, що ЛСР, як було встановлено раніше, індукує утворення кортизонрезистентних лімфоцитів [4] з антигенною характеристикою зрілих T_2 -клітин [2]. Цей висновок опосередковано підтверджується дослідями із застосуванням трансплантації тимуса в міліпорових камерах, де було встановлено, що під впливом гормону тимуса відбувається перетворення T_1 на T_2 лімфоцити [13].

Стимулюючий ефект ЛСР на реакцію змішаних лімфоцитів одержано в разі застосування спленоцитів новонароджених мишей СВА. Облік реакції в дослідях провадили вимірюванням проліферативної активності лімфоцитів з допомогою H^3 -тимідину. Як видно з табл. 2 клітини селезінки новонароджених мишей СВА, так само як і AKR, імунологічно інертні. Вони набувають здатності реагувати на чужорідні антигени після короткочасного контакту з ЛСР. Причому така дія препарату специфічна, оскільки екстракт селезінки, виготовлений за методикою одержання ЛСР, в цих дослідях виявився неактивним.

Таблиця 2

Стимуляція активності спленоцитів новонароджених мишей СВА
в однонаправленій мікст-культурі

Взаємодіючі клітини		Кількість проб	Включення H^3 -тимідину, (імп/хв) на пробу
спленоцити новонароджених мишей СВА	спленоцити статевозрілих мишей (CBA $\times$ C57BL)F ₂		
$0,9 \times 10^6$	—	6	597 ± 34
$0,9 \times 10^6$, преінкубовані з ЛСР	—	6	648 ± 61
—	$2,4 \times 10^6$	5	1255 ± 321
$0,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	7	1401 ± 286
$0,9 \times 10^6$, преінкубовані з екстрактом селезінки	$2,4 \times 10^6$	9	1121 ± 208
$0,9 \times 10^6$, преінкубовані з ЛСР	$2,4 \times 10^6$	8	7474 ± 381

Результати вивчення ефекту ЛСР в системі двонаправленої реакції змішаних лімфоцитів представлені в табл. 3, з якої видно, що культивування клітин кожної лінії окремо не супроводжується утворення бластних форм в 140 год культурі. При цьому в пробах визначається лише незначна кількість живих лімфоцитів. Після преінкубації клітин з ЛСР життєздатність спленоцитів різко посилюється, проте бластних клітин у ці строки дуже мало. Спільне культивування спленоцитів двох ліній мишей супроводжується розвитком реакції бласттрансформації, яка помітно посилюється в разі преінкубації лімфоцитів однієї з ліній з ЛСР. Максимальна відповідь відбувається тоді, коли препаратом оброблялись клітини обох генотипів.

Краще виживання лімфоцитів, преінкубованих з ЛСР, пояснюється тим, що лімфоцитозстимулюючій речовині властиве стимулювання проліферації Т-лімфоцитів у культурі [3]. Проте в зазначені строки така

Таблиця 3
Вплив ЛСР на взаємну стимуляцію спленоцитів статевозрілих мишей в мікст-культурі

Взаємодіючі клітини		Кількість проб	Процент лімфобластів	Процент живих лімфоцитів
спленоцити мишей СВА	спленоцити мишей С57BL/6			
6×10^6	—	9	0	0,2
—	6×10^6	9	0	0,1
6×10^6 , преінкубовані з ЛСР	—	8	$0,8 \pm 0,1$	$22,0 \pm 4,2$
—	6×10^6 , преінкубовані з ЛСР	8	$1,1 \pm 0,09$	$33,0 \pm 6,0$
3×10^6	3×10^6	10	$20,0 \pm 5,0$	$16,0 \pm 5,4$
3×10^6	3×10^6 , преінкубовані з ЛСР	10	$60,0 \pm 17,1$ <0,05	$41,0 \pm 9,1$ <0,05
3×10^6 , преінкубовані з ЛСР	3×10^6	10	$35,0 \pm 8,2$ >0,05	$32,0 \pm 7,2$ >0,05
3×10^6 , преінкубовані з ЛСР	3×10^6 , преінкубовані з ЛСР	10	$73,0 \pm 12,3$ <0,001	$37,0 \pm 7,8$ <0,05

Примітка. Вірогідність різниці (p) розрахована по відношенню до контрольної мікст-культури.

дія препарату вже не проявляється, і тому утворення бластів у змішаній культурі слід оцінювати як результат імунологічної реакції. З цього випливає, що в процесі генерації клітин вони трансформуються в імунологічно зрілі лімфоцити. Така дія ЛСР відрізняється від ефекту високоочищених фракцій тимозину, вільних від ЛСР, які неспроможні активувати реакцію клітин селезінки в змішаній культурі [9]. Проте тимозин підсилює реактивність тимоцитів в однонаправленій мікст-культурі. На нашу думку, ці дані не можуть свідчити про те, що під впливом тимозину відбувається перетворення T_1 на T_2 -клітини. В іншому разі слід чекати прояву активності тимозину і по відношенню до спленоцитів. Проте, яке б не було остаточне рішення, стає все більш очевидним, що тимус продукує не менше двох гуморальних факторів, що відрізняються різним механізмом дії.

Висновки

1. Преінкубація спленоцитів новонароджених мишей з ЛСР *in vitro* призводить до швидкого набуття лімфоцитами імунологічної реактивності, що виявляється реакцією змішаних лімфоцитів.
2. ЛСР посилює активність спленоцитів статевозрілих мишей в од- та двонаправленій змішаній культурі лімфоцитів.

Література

1. Безвершенко І. А., Бойко М. Г., Лукашова Р. Г., Малижєв В. О. Фізико-хімічні властивості лімфотропного чинника тимуса.— Укр. біохім. журн., 1974, 46, № 3, с. 358—363.
2. Валуєва Т. К., Малижєв В. А. Роль гуморальних факторів тимуса в імунологічному созревании тимусзависимой популяції лимфоцитів.— В кн.: Механизм действия гормонов. 1975, с. 24.
3. Малижєв В. А., Глотова Т. В. Бласттрансформация лимфоцитов селезенки мышей под влиянием низкомолекулярного гуморального фактора тимуса *in vitro*.— Цитология, 1975, 17, № 9, с. 1062—1066.

4. Малижнев В. О., Валуева Т. К., Давидова Т. І. Вплив лімфодитозстимулюючої речовини тимуса на активність лімфоїдних клітин в реакції «трансплантат проти хазяїна». — Фізіол. журн. АН УРСР, 1977, 23, № 3, с. 374—379.
5. Манько В. М., Михайлова А. А., Сеславина Л. С. Эффекты и механизмы взаимодействия аллогенных клеток. — Итоги науки и техники. Сер. «Общие вопросы патологии». Т. 3, М., 1972, с. 154.
6. Al-arini M. O., Osoba D. A quantitative assay for the mixed leucocytes reaction by mouse spleen cells. — J. Immunol., 110, p. 926—931.
7. Bortin M. M., Rimm A. A., Saltzstein E. C. Ontogenesis of immune capability of murine bone marrow cells and spleen cells against transplantation antigens. — J. Immunol., 1969, 103, p. 683—686.
8. Cantor H., Mosier D. E. Maturation of reactivity to histocompatibility antigens. — Transplant. Proc., 1972, 2, p. 159—171.
9. Cohen G. H., Hooper J. A., Goldstein A. L. Thymosin-induced differentiation of murine thymocytes in allogeneic mixed lymphocyte cultures. — Ann. N. Y. Acad. sci., 1975, 249, p. 145—153.
10. Goldstein A. L., Guha A., Howe M. L., White A. Ontogenesis of cell-mediated immunity in murine thymocytes and spleen cells and its acceleration by thymosin, a thymic hormone. — J. Immunol., 1971, 106, p. 773—780.
11. Kook A., Trainin N. The control exerted by thymus hormone (THF) on cellular cAMP levels and immune reactivity of spleen cells in the MLC assay. — J. Immunol., 1975, 115, p. 8—14.
12. Mosier D. E., Pierce C. W. Functional maturation of thymic lymphocyte population in vitro. — J. Exp. Med., 1972, 136, p. 1484—1500.
13. Stutman O. Humoral thymic factors influencing postthymic cells. — Ann. N. Y. Acad. sci., 1975, 249, p. 89—105.

Лабораторія імунохімії гормонів
Київського інституту ендокринології
та обміну речовин

Надійшла до редакції
10.V 1976 р.

V. A. Malyzhev

STIMULATING ACTION OF A LOW-MOLECULAR HUMORAL FACTOR OF THE THYMUS ON ACTIVITY OF LYMPHOID CELLS IN MIXED LYMPHOCYTE REACTION

Summary

By using one-way or two-way mixed lymphocyte reaction assay it is shown that the preincubation of the spleen cells from neonatal or puberal mice with a low molecular lymphocytosis stimulating substance (LSS) isolated from the thymus is accompanied by an increase in the proliferative response of the responding cells. It is suggested that LSS would convert the T_1 spleen cells into the functionally immunocompetent T_2 cells capable of responding to antigenic stimulation in the mixed lymphocyte reaction assay.

Laboratory of Hormone Immunochemistry,
Institute of Endocrinology and
Metabolism, Kiev