

18. (Ilkov N.) Илков Н. Бели кръвни клетки. — София: Българ. АН, 1977, — 259 с.
19. West S. S., Golden I. F. Phosphorus particles as microscopic fluorescence standards. — J. Histochem. and Cytochem., 1976, 24, N 4, p. 609—610.

Кафедра анатомии
и физиологии
человека и животных
Ворошиловградского педагогического института

Поступила в редакцию
15.IV 1981 г.

УДК 612.438—018—001.8

Ю. А. Гриневич, И. С. Никольский, В. В. Овсиенко, О. Д. Черненко

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФРАКЦИЙ ЭКСТРАКТА ТИМУСА

Из экстракта тимуса выделено несколько веществ, проявляющих активность в отношении клеток лимфоидного ряда при самых разнообразных ситуациях *in vivo* и *in vitro* [1, 4]. Для получения этих факторов разработаны специальные способы фракционирования, в ходе которых зачастую происходит потеря веществ, биологическая активность которых не выявляется в используемом тесте. Между тем очень важно исследование различных гуморальных факторов, действие которых может быть направлено на отдельные субпопуляции лимфоцитов, ибо такой подход открывает перспективу регуляции иммунологической реактивности, расстроенной в результате дефекта или преобладания одной из линий клеток.

Методика исследований

Фракционировали экстракт тимуса теленка, полученный с некоторыми отклонениями [11] (фракция 1А). Количество белка определяли по методу Лоури [13]. Активность фракций тестировали по их влиянию на антителолиз [12], образование мастолимфоцитарных розеток (МЛР) [5], формирование розеток костномозговыми клетками морской свинки с эритроцитами кролика [2], чувствительность спонтанных селезеночных розеткообразующих клеток (РОК) тимэктомизированных мышей к антилимфоцитарной сыворотке (АЛС) [8], а также по восстановлению способности к спонтанному розеткообразованию прогретых при 45 °С тимоцитов морской свинки [6].

Результаты исследований

Фракцию 1А экстракта тимуса получали со следующими отклонениями от классической методики: гомогенат тимуса центрифугировали при 3000g, а не при 105 000g. Надосадочную жидкость обрабатывали не десятью, а пятью объемами ацетона. Дальнейшую очистку экстракта проводили по оригинальной методике. Ацетоновый порошок растворяли в физиологическом растворе. Не растворяющийся материал отделяли центрифугированием при 10 000 g. Надосадочную жидкость разделяли высаливанием твердым сульфатом аммония. Собирали фракции, высаливающиеся при 25, 50, 75 и 100 % насыщении сульфата аммония. После диализа против физиологического раствора получили четыре фракции, которые обозначили соответственно 0—25, 25—50, 50—75 и 75—100. 100 мкг одной из фракций вводили подкожно новорожденным нелинейным мышам, через 10 дней животным вводили внутривенно $2,5 \cdot 10^8$ эритроцитов барана и на четвертый день в селезенке определяли количество антителообразующих клеток (АОК).

У контрольных животных, получавших физиологический раствор, в селезенке образовывалось $2,3 \pm 0,4$ АОК на 10^6 ядросодержащих клеток. Введение фракций экстракта тимуса приводило к увеличению количества АОК: при инъекции фракции — 0—25 до $13,8 \pm 3,8$ ($p < 0,01$), фракции 25—50 до $9,0 \pm 3,4$ ($p < 0,05$) и фракции 50—75 до $6,8 \pm 2,0$ ($p < 0,05$). Введение фракции 75—100 существенно не сказывалось на выходе АОК — $2,8 \pm 1,3$ ($p > 0,5$).

В следующих опытах, проведенных *in vitro*, фракциями экстракта тимуса обрабатывали тимоциты новорожденных мышей, которые инкубировали при 37°C в течение 60 мин в среде 199, содержащей 1 мг/мл одной из фракций. В контрольные пробы добавляли соответствующий объем физиологического раствора.

Тимоциты, инкубированные с фракциями экстракта тимуса, лучше взаимодействовали с тучными клетками с образованием МЛР, наибольшее количество которых наблюдалось после воздействия фракций 25—50 ($5,4 \pm 0,9\%$); ($p < 0,001$) и наименьшее при обработке фракцией 75—100 ($2,0 \pm 0,6$; $p < 0,05$). Контрольные клетки формировали $0,4 \pm 0,1\%$ МЛР.

Таблица 1
Процент МЛР, образуемый тимоцитами новорожденных мышей, после инкубации с тимостимулином, взятым в различных концентрациях

Статистические показатели	Концентрация тимостимула на (мкг/мл)					
	Физиологический раствор	1000	500	250	125	60
<i>M</i>	0,7	4,2	5,1	6,9	3,1	2,6
$\pm m$	0,3	1,7	0,8	2,2	0,9	1,3
<i>n</i>	16	12	9	10	9	7
<i>p</i>	—	$< 0,05$	$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,02$	$> 0,5$

Проведенные исследования показали, что максимальная антителогенезстимулирующая активность находится во фракции, высаливающейся при 25% насыщении. По-видимому, эта фракция эквивалентна описанной нами ранее [3] фракции, стимулирующей синтез антител (ФСА). Отделение этой фракции, активное начало которой термолабильно, сульфатом аммония позволяет применить для дальнейшей очистки экстракта нагревание, которому мы подвергли фракцию 25—50, обнаруживающую максимальную активность в тесте образования МЛР.

Таблица 2
Количество розеток, образуемых клетками костного мозга морских свинок после инкубации с тимостимулином, взятым в различных концентрациях

Статистические показатели	Концентрация тимостимулина (мкг/мл)				Физиологический раствор
	500	250	125	60	
<i>M</i>	32,3	19,9	23,3	21,3	15,4
$\pm m$	3,3	2,9	4,1	2,5	2,3
<i>n</i>	9	7	8	8	9
<i>p</i>	$< 0,001$	$> 0,5$	$> 0,2$	$> 0,2$	—

Прогревание проводили на водяной бане при 80°C в течение 15 мин. При этом в осадок выпадало 9/10 материала; так что на этом этапе достигалась десятикратная очистка экстракта. Преципитат удаляли центрифугированием при 10 000 *g*, а надосадочную жидкость — фракцию, представляющую собой комплекс тимических полипептидов, которую мы условно обозначили как «тимостимулин», стерилизовали фильтрованием через асбестовые фильтры и сохраняли до употребления при —20°C.

Исследование тимостимулина методом дискэлектрофореза в 10% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия обнаружило в его составе 15 окрашивающихся кумасси полос.

Данные о влиянии тимостимулина на образование МЛР представлены в табл. 1, из которой видно, что кратковременная обработка этой фракцией экстракта тимоцитов новорожденных мышей приводит к значительному увеличению процента розеток. Концентрация препарата 125 мкг/мл является минимально активной.

В табл. 2 представлены результаты изучения влияния тимостимулина на спонтанное розеткообразование клетками костного мозга морских свинок. Полученные данные свидетельствуют о том, что в концентрации 500 мкг/мл тимостимулин в 2 раза увеличивает число РОК.

Далее мы изучали действие тимостимулина на способность к розеткообразованию прогретых при 45°C в течение 1 ч тимоцитов морской свинки. Лимфоциты морской свинки образуют спонтанные розетки с эритроцитами кролика подобно тому, как лимфоциты человека формируют Е-РОК с эритроцитами барана [16, 17]. Прогревание лимфоцитов при 45°C в течение 1 ч высвобождает их мембранные рецепторы в среду [14], что приводит к потере у этих клеток способности к розеткообразованию. Инкубация прогретых лимфоцитов с тимозином при 4°C [14] или при 37°C [6] способствует частичному восстановлению розеткообразующей активности.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, прогретые тимоциты формируют только около 5% розеток по сравнению с интактными клетками. Их инкубация с тимостимулином сопровождается значительным возрастанием числа РОК. Минимально активная концентрация тимостимулина 125 мкг/мл.

Таблица 3

Процент розеток от исходного числа РОК, образуемых прогретыми при 45°C тимоцитами морской свинки после инкубации с различным количеством тимостимулина

Статистические показатели	Концентрация тимостимулина (мкг/мл)				
	Контроль	1000	250	125	62,5
<i>M</i>	5,2	48,8	43,8	23,9	10,3
$\pm m$	1,0	5,3	4,7	4,8	2,3
<i>n</i>	7	6	6	7	4
<i>p</i>	—	<0,001	<0,001	<0,01	>0,05

В следующих опытах активность тимостимулина была исследована по отношению к спонтанным РОК селезенки тимэктомизированных мышей. Известно, что эти клетки, не чувствительные к АЛС, начинают реагировать на обработку сывороткой после воздействия на них *in vivo* или *in vitro* гормонов тимуса.

Таблица 4

Количество РОК не чувствительных к АЛС на 10^6 ядросодержащих клеток селезенки тимэктомизированных мышей после инкубации с различным количеством тимостимулина

Статистические показатели	Концентрация тимостимулина (мкг/мл)				
	Контроль	10	50	100	1000
<i>M</i>	600,0	462,5	287,5	200,0	162,5
$\pm m$	39,3	13,2	39,2	26,2	13,1
<i>n</i>	10	10	10	10	10
<i>p</i>	—	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001

Результаты, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что тимостимулин сообщает некоторую чувствительность к АЛС уже в концентрации 10 мкг/мл. Инкубация клеток при концентрации тимостимулина 100 мкг/мл приводит более чем к 50% редукции числа РОК в результате обработки лимфоцитов АЛС, т. е. практически все Т-РОК приобретают Θ -антиген в количестве, обеспечивающем их чувствительность к АЛС.

Таким образом, с помощью простых методов, обычно предшествующих хроматографической очистке веществ, мы разделили экстракт тимуса на фракцию, стимулирующую синтез антител, и на фракцию, проявляющую активность в четырех тестах розет-

кообразования. Безусловно, такая схема разделения не позволяет избежать потерь активного материала и достичь высокой степени его очистки. Однако описанная методика дает возможность получения из одного исходного экстракта двух фракций с различной биологической активностью: ФСА и тимостимулин. Можно полагать, что последний по биологическому действию и, по-видимому, по составу полипептидов близок к четвертой фракции тимозина [10].

Используемые для обнаружения активности тимостимулина тесты розеткообразования позволяют составить некоторые представления о механизме его действия. Прежде всего необходимо отметить, что все вызываемые препаратом эффекты связаны, в конечном счете с изменениями свойств плазматических мембран клеток-мишеней. Так, повышение чувствительности РОК тимэктомизированных мышей к АЛС обусловлено увеличением содержания на их мембране Θ -антигена. Возрастание количества РОК среди клеток костного мозга является свидетельством появления на их поверхности рецепторов к эритроцитам, так же как увеличение количества МЛР обязано, по всей вероятности, проявлению активности рецепторов к тучным клеткам. Аналогичные процессы, скорей всего, наблюдаются и при восстановлении розеткообразования прогретыми лимфоцитами. Здесь следует остановиться на том, что прогревание в указанном режиме, вероятно, не снимает все рецепторы. В противном случае трудно представить механизм взаимодействия с клеткой тимостимулина. Во-вторых, имеются данные сканирующей электронной микроскопии о сглаживании поверхности клетки при прогревании за счет превращения микроворсинок в пузырьки, что может привести не только к снятию, но и маскировке рецепторов. Небезынтересно и то, что восстановление количества розеток, формируемых прогретыми лимфоцитами, достигается при инкубации клеток с фактором переноса, надосадком прогретых лимфоцитов, сывороткой крови, а также диализированной сывороткой и ее диализатом [14]. Тимостимулин не диализуется и поэтому не может присутствовать в диализате. Можно допустить, что в диализате сыворотки содержится низкомолекулярный аналог тимостимулина, входящий в состав рецептора. Однако еще более трудно предположить, что эффект восстановления числа РОК связан с возвращением снятых рецепторов на свое место, в особенности, если эти структуры имеют гидрофобные внутримембранные участки наподобие молекулы Н-2. К этому необходимо добавить, что изменение числа РОК происходит под влиянием самых разнообразных веществ, в том числе синтетических, которые не могут представлять рецепторы или их части [9, 15].

Таким образом, тимостимулин действует на Т-клетки, находящиеся практически на всех основных уровнях дифференцировки этой популяции (костномозговые предшественники, тимоциты, периферические лимфоциты); его эффект может быть в некоторых случаях замещен другими веществами, имеющими свои специфические мембранные рецепторы.

Можно полагать в связи с этим, что изучаемое нами биологическое действие тимостимулина является не дифференцировочным, а активирующим, приводящим к изменению экспрессии мембранных рецепторов и антигенов. Эти изменения, по всей вероятности, являются необходимым атрибутом любой неспецифической активации лимфоцитов, предшествующей выполнению специфических функций.

Список литературы

1. Безвершенко И. А. Значение гормонов тимуса для генерации и созревания Т-лимфоцитов. — Молекуляр. биология, 1978, № 21, с. 55—66.
2. Гриневиц Ю. А. Характеристика отдельных популяций лимфоцитов в крови практически здоровых людей. — Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1978, № 9, с. 105—109.
3. Гюллинг Э. В., Кавсан В. М., Мельников О. Ф. и др. О возможности регуляции иммунологической активности лимфоидной системы факторами вилочковой железы. Сообщ. 1. Стимуляция антителогенеза фракцией, полученной из экстракта тимуса теленка с помощью сефадекса G-25. — Журн. ушных, носовых и горловых болезней, 1971, № 6, с. 25—27.
4. Гюллинг Э. В., Никольский И. С. Гормоны тимуса и иммунитет. — Успехи соврем. биологии, 1977, 83, № 1, с. 97—111.
5. Гюллинг Э. В., Никольский И. С., Дюговская Л. А. Мастолимфоцитарные розетки. — Докл. АН УССР. Сер. Б, 1978, № 9, с. 851—853.
6. Гюллинг Э. В., Самбур М. Б., Кравчук Г. П. Способ количественного определения активности тимозина. — Докл. АН УССР. Сер. Б, 1979, № 1, с. 51—53.

7. Ровенский Ю. А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. — М.: Медицина, 1979. — 152 с.
8. Bach J. F., Dardenne M., Goldstein A. L. et al. Appearance of T-cell marker, in bone marrow rosette forming cell after incubation with thymosin, a thymic hormone. — Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1971, N 68, p. 2734—2738.
9. De Cock W., De Cree J., Varhaegeni H. Restoration by levamisole of histamine-inhibited E-rosette formation of T-lymphocytes in patients with allergie. — Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol., 1977, 54, N 2, p. 176—182.
10. Goldstein A. L., Guha A., Zatz M. M. et al. Purification and biological activity of thymosin, a hormon of the thymus gland. — Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1972, 69, N 7, p. 1800—1803.
11. Goldstein A. L., Slater F. D., White A. Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopoetic factor (thymosin). — Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1966, 56, N 3, p. 1010—1017.
12. Jerne N., Nordin A. Plaque formation in Agar by single antibody — producing cells. — Science, 1963, 140, N 3565, p. 405.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Determination of cerebrospinal fluid protein with the Folin-phenol reagent. — Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—275.
14. Mendes N. F., Saraiva P. J., Santos O. B. Restorative effect of normal human serum, transfer factor and thymosin on the ability of heated lymphocytes to form rosettes with sheep erythrocytes. — Cell. Immunol., 1974, 17, N 2, p. 560—566.
15. Shore A., Dosen H. M., Gelfand E. Induction and separation of antigen — dependent T helper and T suppressor cells in man. — Nature, 1978, 274, N 5671, p. 586—587.
16. Staderker M. J., Bishop G., Wortis H. H. Rosette formation by guinea pig thymocytes and thymus derived lymphocytes with rabbit red blood cells. — J. Immunol., 1973, 111, N 6, p. 1834—1837.
17. Wilson A. B., Coombs K. K. Rosette-formation between guinea pig lymphoid cells and rabbit erythrocytes — a possible T-cell marker. — Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol., 1973, 44, N 4, p. 544—552.

Киевский рентгенорадиологический
и онкологический институт

Поступила в редакцию
1.XII 1980 г.

УДК 576.5:612.017.3:612.112.94.017

Л. А. Дюговская

ВЛИЯНИЕ ГИСТАМИНА НА ПРОДУКЦИЮ РЕАГИНОВ И ОБРАЗОВАНИЕ МАСТО-ЛИМФОЦИТАРНЫХ РОЗЕТОК

Предполагается, что гистамин не только индуцирует воспаление, но и является также одним из основных медиаторов, регулирующих функцию клеток, прямо или косвенно участвующих в его развитии.

Показано, что в дозах 10^{-5} — 10^{-7} моль экзогенный гистамин, действуя по типу обратной связи, тормозит индуцированное антигеном выделение эндогенного гистамина из тучных клеток, угнетает функцию клеток-супрессоров, стимулируя ответ ограничивающий поступление в организм чужеродных антигенов [6, 8].

Недавно показано, что одной из форм непосредственного взаимодействия тучных и лимфоидных клеток является образование масто-лимфоцитарных розеток (МЛР) [2].

Мы изучали влияние гистамина на контактное взаимодействие лимфоидных и тучных клеток и на продукцию реагинов, обуславливающих развитие аллергических реакций немедленного типа.

Методика исследований

Образование IgE антител в органах дыхания крыс индуцировали закапыванием 0,05 мл аллергена амброзии (10 000 PNU/мл) в оба носовых хода без (I группа) или с предварительным закапыванием 0,05 мл 0,1 % раствора гистамина (II группа). Продукцию реагинов в селезенке и брыжеечных лимфоузлах вызывали внутрибрюшинным введением 0,3 мл аллергена амброзии (III группа) или инъектированием его через 30—40 мин после внутрибрюшинного введения 0,3 мл 0,1 % раствора гистамина (IV группа). Содержание IgE антител на 2—3 сут после иммунизации определяли в экстрактах лимфоидных органов (0,2 мл 0,9 % раствора NaCl на 50 мг ткани) методом непрямой агглютинации тучных клеток [4].