

9. Lajarge C. S., Mousset S., Frayssinet C. Immunosuppressive properties of a factor isolated from adult rat liver // *Biomedicine*. — 1981. — 34, N 2. — P. 99—102.
10. Nardiello S., Russo M., Pizzella T. et al. Different levels of lymphocyte adenosine deaminase in active forms of chronic liver disease // *J. Clin. and Lab. Immunol.* — 1983. — 11, N 4. — P. 177—180.
11. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // *Rad. Res.* — 1961. — 14. — P. 213—222.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила 14.10.85

УДК 612.112.94.017.1+612.438.014.2:612.112.94

М. Г. Бойко, И. А. Безвершенко, А. Л. Синельникова

ОТДЕЛЕНИЕ СПЛЕНОЦИТАМИ И ТИМОЦИТАМИ МЫШЕЙ ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ АНТИТЕЛОГЕНЕЗ

Под влиянием антигенов или поликлональных стимуляторов определенные субпопуляции Т-лимфоцитов могут продуцировать антиген-специфические [4, 9, 10] или неспецифические [3, 7] факторы (регулирующие антигензависимую дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки, синтезирующие антитела [3, 4, 7, 9, 10]. Один из таких факторов IBF (Immunoglobulin binding factor) обладает свойством связывать IgG и подавлять формирование антителопродукторов из В-лимфоцитов *in vitro*. Этот фактор продуцирует активированные лектином или аллогенной стимуляцией Т-лимфоциты [3]. Предполагается, что IBF представляет собой растворимый рецептор для Fc фрагмента IgG [4, 7, 9]. Возможно, что такие рецепторы функционально гетерогенны, так как они обнаружены на поверхности клеток различного типа [5]. Часть отделяемых рецепторов для IgG обладает также свойствами рецепторов к аутологичным эритроцитам [2].

Цель работы заключается в изучении регуляторных по отношению к антителопродукторам свойств отделяемых тимоцитами и спленоцитами мышей факторов, обладающих родством к IgG, а также возможной функциональной их гетерогенности. Факторы выделяли в различные сроки после иммунизации мышей эритроцитами барана и их регуляторные свойства по отношению к В-лимфоцитам изучали *in vivo* на мышах, иммунизированных тем же антигеном.

Методика

Мышей линии СВА (масса — 20 г) внутрибрюшинно иммунизировали 0,2 мл 15 %-ной взвеси эритроцитов барана (ЭБ). На 13-е сутки после иммунизации животных забивали и выделяли спленоциты и тимоциты, которые ($5 \cdot 10^7$ клеток) вводили внутривенно сингенным мышам одновременно с 0,2 мл 5 %-ной взвеси ЭБ. На 5-е сутки после введения исследовали продукцию IgG и IgM антител спленоцитами мышей-реципиентов методом Simpson [8].

Сплелоциты и тимоциты мышей СВА, выделенные на 13-е сутки после иммунизации 0,2 мл 15 %-ной взвеси ЭБ, инкубировали в среде Хенкса при 37 °C в течение 2 ч. Клетки отделяли центрифугированием при 200 g, надосадочную жидкость лиофилизировали и количество сухого остатка, соответствующее 10^8 клеток, вводили сингенным мышам внутривенно в 0,2 мл водного раствора. Одновременно мышей иммунизировали внутрибрюшинно 0,2 мл 5 %-ной взвеси ЭБ в физиологическом растворе. На 5-е сутки изучали антителопродукцию мышей-реципиентов так же, как указано выше.

Часть надосадочной жидкости, полученной при нагревании спленоцитов и тимоцитов мышей, примированных 0,2 мл 15 %-ной взвеси ЭБ, инкубировали с избытком IgG кролика, ковалентно присоединенного к активированной BrCN целлюлозе [6] в течение 2 ч при 37 °C с последующим ее отмыванием NaCl (0,14 моль/л) и элюцией HCl (0,01 моль/л) присоединившегося к сорбенту материала. Для исследования ре-

гуляторных свойств адсорбированного на IgG-целлюлозе материала его количество, соответствующее 10^8 лимфоцитов, вводили внутривенно сингенным мышам одновременно с 0,2 мл 5 %-ной взвеси ЭБ и исследовали антителообразование, как указывалось выше. Присутствие в составе адсорбированного на IgG-целлюлозе материала рецепторов для аутологичных эритроцитов определяли по его способности восстанавливать формирование аутологичных розеток у прогретых при 45°C в изотонической среде и отмытых тимоцитов, как описано ранее [2].

Результаты и их обсуждение

Перенос спленоцитов мышей СВА, выделенных на 13-е сутки после иммунизации их 15 %-ной взвесью ЭБ, сингенным мышам подавляет образование антителопродуцентов в селезенке. Тимоциты тех же доноров практически не подавляют ответ на ЭБ при аналогичных условиях переноса, иммунизации реципиентов и в те же сроки исследования после переноса (подавление ответа на 8 % не было статистически существенным). Таким образом, на 13-е сутки после иммунизации мышей клетки-супрессоры обнаруживаются в селезенке, а не в тимусе (табл. 1).

Надосадочная жидкость, полученная после инкубации спленоцитов, подавляет иммунный ответ с той же эффективностью, что и сингенный перенос спленоцитов иммунизированных мышей. Введение надосадочной жидкости, полученной от тимоцитов тех же доноров не подавляет иммунный ответ на ЭБ. Наблюдалась некоторая стимуляция ответа, не существенная статистически.

Фактор, который тормозит продукцию антител, адсорбируется на иммобилизованном IgG кролика из супернатанта спленоцитов иммунизированных мышей. Внутривенное введение этого фактора снижает антителообразование на 31 %. Элюированный с иммобилизованного IgG материал обладает также свойствами рецептора для аутологичных эритроцитов. Как было показано ранее [1, 2], прогревание тимоцитов в изотонической среде при 45°C приводит к отделению и переходу в среду рецепторов для аутологичных эритроцитов. Отмытые после прогревания тимоциты теряют способность формировать розетки с аутологичными эритроцитами. Эта способность восстанавливается после инкубации тимоцитов с надосадочной жидкостью, полученной после прогревания тех же клеток. Адсорбируемый на IgG-целлюлозе из надосадочной жидкости, полученной на 13-е сутки после иммунизации, материал из спленоцитов, содержащий супрессорный фактор, также восстанавливает способность формировать розетки с

Таблица 1. Продукция антител мышами-реципиентами (оцениваемая по гемолизу эритро иммунизированных мышей, супернатантов этих клеток, а также факторов, отделяемых ими

Показатель	Спленоциты		Тимоциты	
	интактные	на 13-е сутки после иммунизации	интактные	на 13-сутки после иммунизации
Гемолиз ЭБ спленocyтaми мышей ($M \pm m$), ед. экстинкции при λ 413 нм:				
контрольных	$0,160 \pm 0,022$ $P < 0,05$	$0,179 \pm 0,029$ $P < 0,001$	$0,160 \pm 0,022$ $P < 0,05$	$0,179 \pm 0,029$ $P \geq 0,05$
опытных	$0,142 \pm 0,017$	$0,102 \pm 0,024$	$0,147 \pm 0,025$	$0,165 \pm 0,029$
Изменение гемолиза, % контроля:				
торможение	11	43	8	8
усиление	—	—	—	—

¹ Представлены факторы, сорбированные на IgG-целлюлозе из супернатантов спленоцитов

аутологичными эритроцитами у прогретых и отмытых тимоцитов (табл. 2).

Фактор тимоцитов и спленоцитов, сорбируемый на иммобилизованном IgG, выделенный на 4-е сутки после иммунизации мышей ЭБ, не обладает супрессорными свойствами. При введении его мышам-реципиентам наблюдается усиление ответа на ЭБ *in vivo*. Статистически существенно усиливающим действием обладает лишь фактор, полученный от тимоцитов.

Т а б л и ц а 2. Восстановление аутологичного розеткообразования у прогретых тимоцитов после инкубации с материалом, сорбированным на IgG-целлюлозе из супернатанта спленоцитов мышей, иммунизированных 15 %-ной взвесью эритроцитов барана

Показатель	Номер опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Розеткообразование тимоцитов (% розеткообразующих клеток):							
интактных	23	34,1	19,7	22,4	18,0	—	—
прогретых при 45 °С в течение 1 ч	9,5	24,4	4,4	14,7	12,3	35,1	14,2
прогретых после инкубации с сорбированным материалом	16,9	32,1	13,0	14,8	28,5	52,4	24,2

Описано несколько факторов, выделенных из лимфоцитов и обладающих регуляторными свойствами по отношению к антителопродукентам [3, 4, 7, 9, 10]. Tekemori Tada [9, 10] получили супрессорный фактор из разрушенных тимоцитов и спленоцитов. Этот антигенспецифический фактор не выделяется неповрежденными клетками и не адсорбируется иммобилизованным IgG. Регуляторные антигенспецифические факторы (Т-клеточный кооперативный и супрессорный факторы) [11, 12, 14] активны при испытании *in vivo*, однако не известно, обладают ли эти факторы способностью связывать IgG. К числу регуляторных факторов относится IBF [3, 7], продуцируемый активированными Т-лимфоцитами. Этот фактор связывается IgG, обладает антигеннеспецифическими супрессорными свойствами, слушивается с клеток, активированных аллогенной стимуляцией *in vivo* и митогеном (кон А) *in vitro*. Вероятно, IBF — не единственный регуляторный фак-

цитов барана) под влиянием внутривенного переноса спленоцитов и тимоцитов при нагревании

Супернатанты		Факторы ^а		
спленоцитов на 13-е сутки после иммунизации	timoцитов на 13-е сутки после иммунизации	спленоцитов на 4-е сутки после иммунизации	спленоцитов на 13-е сутки после иммунизации	timoцитов на 4-е сутки после иммунизации
0,356±0,034 $P < 0,001$	0,281±0,035 $P \geq 0,05$	0,266±0,035 $P > 0,05$	0,211±0,032 $P < 0,01$	0,101±0,09 $P < 0,01$
0,248±0,035	0,353±0,047	0,354±0,04	0,145±0,021	0,292±0,066
30	25	33	31	189

и тимоцитов.

тор, связывающийся с IgG. Такие факторы способны выделять не только Т-лимфоциты. Это предположение подтверждается Le Thi Bich-Thуу, Rabourdin-Combe [5], которые показали, что супрессорная активность растворимых рецепторов для IgG не связана с их Т-клеточным происхождением, так как растворимые рецепторы для IgG способны отделять клетки различных типов (лимфоциты периферической крови человека, нейтрофилы, гибридомные Т-лимфоциты) и одинаково снижать число секретирующих IgG клеток *in vitro*.

В наших опытах иммунизация мышей СВА 15%-ной взвесью эритроцитов барана вызвала активацию определенных субпопуляций как тимоцитов, так и спленоцитов, поскольку и те и другие отделяли связывающий IgG фактор, который оказывает влияние *in vivo* на число (или активность) клеток селезенки, секретирующих IgG и IgM. На 4-е сутки после иммунизации тимоциты и спленоциты отделяют связывающий IgG фактор, который вызывает стимуляцию ответа антителопродукторов селезенки на ЭБ *in vivo*. Однако статистически значимой стимуляция была лишь в том случае, когда фактор был отделен от тимоцитов. Этот результат не тривиален, так как растворимые рецепторы для IgG интактных или стимулированных *in vitro* поликлональными стимуляторами клеток обладали супрессорными свойствами [3, 5, 13]. Супрессорный фактор отделяется спленоцитами (но не тимоцитами) лишь на 13-е сутки после иммунизации, когда в селезенке наблюдается увеличение числа (или активности) клеток-супрессоров.

Таким образом, в зависимости от времени, прошедшего после иммунизации мышей эритроцитами барана, спленоциты и тимоциты могут отделять, соответственно, супрессорный и хелперный факторы, связывающие IgG. Общее свойство супрессорного фактора, отделяемого спленоцитами, и хелперного, отделяемого тимоцитами — способность адсорбироваться иммобилизованным IgG. Таким свойством обладают растворимые рецепторы для аутологичных эритроцитов [2], однако их отношение к регуляторным факторам остается неясным. Тем не менее, эти данные свидетельствуют о гетерогенности факторов, связывающих IgG.

M. G. Boiko, I. A. Bezvershenko, A. L. Sinelnikova

SEPARATION OF THE ANTIBODY-PRODUCTION-REGULATING FACTORS BY MOUSE THYMOCYTES AND SPLENOCYTES

The separation and immunoregulatory properties of immunoglobulin-binding factor (IBF) from thymocytes and splenocytes were studied on the 4th and 13th days after immunization of animals with a tolerogenic dose of sheep red blood cells. On the 4th day after immunization thymocytes of immunized mice separate IBF which potentiated the immune response of antibody-producing cells. IBF separated from the splenocytes of the same mice was less effective. The factor obtained from splenocytes by the same method on the 13th day was found to be suppressive. Potentiating or suppressive properties of the IBF separated by the splenocytes or thymocytes depend on the period of time after immunization.

Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev

1. Безвершенко И. А., Синельникова А. Л., Бойко М. Г. Взаимоотношения между рецепторами тимоцитов мыши к IgG, сингенным и аллогенным эритроцитам // Иммунология. — 1985. № 3. — С. 19—22.
2. Bezvershenko I. A., Sinelnikova A. L., Boyko M. G. The relationship between mouse thymocyte receptors for syngeneic and allogeneic erythrocytes and receptors for IgG // Immunol. Lett. — 1984. — 7, N 3. — P. 239—242.
3. Gisler R. H., Fridman W. H. Suppression of *in vitro* antibody synthesis by immunoglobulin-binding factor // J. Exp. Med. — 1975. — 142, N 3. — P. 507—511.
4. Kontiainen D., Feldman M. Suppressor-cell induction *in vitro*. III. Antigen-specific suppression by supernatant of suppressor cells // Eur. J. Immunol. — 1977. — 7, N 3. — P. 310—314.

5. *Le thi Bich-Thuy., Samarut S., Rabourdin-Combe C., Revillard J. P.* The suppressive activity of Fc receptor is not related to their T-cell origin // *Cell. Immunol.*—1982.—68, N 2.—P. 252—260.
6. *March S. S., Parikh I., Cautrecasas P.* A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography // *Annal. Biochem.*—1974.—60, N 1.—P. 149—152.
7. *Neauport-Sautes C., Rabourdin-Combe C., Fridman W. H.* T-cell hydrids bear Fc receptors and secrete suppressor immunoglobulin-binding factor // *Nature.*—1979.—227, N 5698.—P. 656—659.
8. *Simpson M. A., Gozzo J. J.* Spectrofotometric determinations of lymphocyte mediated sheep red blood cells hemolysis in vitro // *J. Immunol. Methods.*—1978.—21, N 1.—P. 159—161.
9. *Takemori T., Tada T.* Properties of antigen-specific T-cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. I. In vivo activity and immunochemical characterization // *J. Exp. Med.*—1975.—142, N 6.—P. 1241—1253.
10. *Taniguchi M., Hayakawa K., Tada T.* Properties of antigen-specific suppressive T-cell in the regulation of antibody response of the mouse. II. In vivo activity and evidence for the I region gene product // *J. Immunol.*—1976.—116, N 2.—P. 542—548.
11. *Taussig M. J., Munro A. J.* Antigen-specific T-cell factor in cell cooperation and genetic control of the immune response // *Fed. Proc.*—1976.—35, N 9.—P. 2061—2066.
12. *Taussig M. S., Coralan R. F., Holliliman A.* Characterization of an antigen-specific factor from a hybrid T-cell line // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1979.—332.—P. 316—335.
13. *Waksman B. H., Tada T.* Specific and nonspecific suppressor T-cell factors derived from thymic lymphocytes // *Cell. Immunol.*—1977.—30, N 1.—P. 189—191.
14. *Yagello M., Rabourdin-Combe C., Gigbr R., Fridman W. H.* Regulation of antibody synthesis to sheep red cells in cultures of nu/nu spleen cells by T-cell replacity factor (TRF) and immunoglobulinbinding factor (IBF) // *Ann. immunol. (Inst. Pasteur).*—1979.—N 130.—P. 711—720.

Киев, ин-т эндокринологии
и обмена веществ МЗ УССР

Поступила 24.12.85

УДК 615.252.453:612.015.11:612.45—612.35—612.46

С. В. Кандул, М. И. Яцык, В. Я. Кононенко

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХЛОДИТАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМА P-450 И АДРЕНОДОКСИНА В НЕКОТОРЫХ ОРГАНАХ СОБАК И КРЫС

Один из эффективных фармакологических препаратов, блокирующий функцию коры надпочечников — хлодитан (*o, n'*-дихлордифенил-дихлорэтан; *o, n'*-ДДД). Препарат оказывает выраженное тормозящее действие на стероидогенез в надпочечниках человека и собаки, но не тормозит его в надпочечниках кролика, морской свинки, крысы и мыши [6]. Тем не менее, в опытах *in vitro* установлено, что он способен ингибировать образование кортикостероидов в ткани надпочечников многих видов животных [10]. Помимо этого известно, что хлодитан ускоряет трансформацию экзогенного гидрокортизона в полярные метаболиты в ткани печени и почек крысы, но не влияет на его обмен в печени собаки [7].

Окислительный метаболизм холестерина, стероидных гормонов, а также многих фармакологических препаратов осуществляется в печени при участии различных изоформ цитохрома P-450 [14, 15]. Гидроксилирующая система коры надпочечников также содержит цитохром P-450 и сопряженный с ним негемовый железосерусодержащий белок — аденодоксин, участвующие в биосинтезе кортикостероидов [1, 17].

Можно предположить, что неоднотипность действия хлодитана на синтез и катаболизм кортикостероидов у животных связана с видовыми органами особенностями функционирования гидроксилирующих систем коры надпочечников, печени, почек у собаки и крысы.

В связи с этим цель настоящего исследования — сравнительное изучение влияния хлодитана на содержание низкоспиновой окислен-