

вующие о снижении фагоцитарной активности в сравнении с молодыми и старыми животными. [17] выявили СМФ с возрастом у людей по сравнению с молодыми и старыми животными. [8] у мышей и крыс — кисти эндотоза коллоидного типа в культуре показано про- у 30- и 36-месячных крыс корость эндотоза 12-месяч- у молодыми и старыми, не т старых. Лизосомальная ак- могла не изменяться, умень- [10]. Существует и противоре-] при оценке поглотительной иков по отношению к гомо- об увеличении фагоцитарной нию Brouwer и Knook [10], крови — медленный процесс, эритроцитарных мембран. является фактором, лимити- агаем, что возрастные изме- ут быть связаны с уменьше- х клеток печени, играющих зма от чужеродных агентов. чении макрофагов печени у- ные разбухшие ретикулоэн- более выраженной ацидо- е введения туши в печени- щие большие агрегаты ту- у молодых животных такие- части дольки.

рых кроликов снижена по- ительная способность СМФ- ожение и не отличается до- тных.

6 mg/kg) has been used to study- clear phagocytes. Graphical repre- versus time is a bioexponential de- characterized by the two-chamber- ameters has revealed a decrease- earance half time and area under- ars) as against the young animals- ove indices of phagocytic activity- old animals.

как предпосылка для развития- № 3.— С. 41—45.

3. Соловьев В. Н., Фирсов А. А., Филатов В. А. Фармакокинетика.— М.: Медицина, 1980.— 423 с.
4. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете.— М.: Медицина, 1978.— 199 с.
5. Фрейдлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов.— М.: Медицина, 1984.— 271 с.
6. Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция.— М.: Медицина, 1975.— 456 с.
7. Aho K. Autoantibodies and the risk of death // Med. Biol.— 1980.— 58, N 1.— P. 8—13.
8. Aoki T., Feller M. N., Robitaille M. L. Aging and cancerogenesis. II. Effect of age on phagocytic activity of the reticuloendothelial system and tumor growth // J. Natl. Cancer Inst.— 1965.— 34.— P. 255—263.
9. Boizzi G., Stiffel C. The physiopathology of the reticuloendothelial cells of the liver and spleen // Progress in Liver Diseases.— New York: Grune and Stratton, 1965.— 166 p.
10. Brouwer A., Knook D. L. The reticuloendothelial system and aging: a review // Mech. Ageing and Develop.— 1983.— 21, N 3/4.— P. 205—228.
11. Cantrell W., Elko E. E. Effect of age on phagocytosis of carbon in the rat // Exp. Parasitol.— 1973.— 34, N 3.— P. 337—343.
12. Garvey J. S., Caperna Th. Y. The role of endothelial cells and Kupffer cells in antigen processing by Fisher-344 rats // Sinusoidal Liver Cells. Proc. 2nd Int. Kupffer Cell Symp. Nordwijkerhout 29 Aug. 2 Sept. 1982.— Amsterdam etc., 1982.— P. 421—428.
13. Tracey D. E. Macrophage-mediated injury // Reticuloendothel. System. Immunopathol.— New York; London, 1983.— Vol. 4.— P. 77—101.
14. Souich P. du, Bernier J., Gote M. G. Dose-dependent storage capacity of colloidal carbon as a cause of reticuloendothelial blockade // J. Reticuloendothel. Soc.— 1981.— N 2.— P. 91—104.
15. Palek P. R., Mignard V. A., Bernick S. Age changes in structure and responses of reticuloendothelial cells of the rat liver // Там же.— 1967.— N 4.— P. 211—218.
16. Vomel Th., Platt D. Lifespan of rabbit erythrocytes and activity of the reticuloendothelial system // Mech. Ageing and Develop.— 1981.— 17, N 3.— P. 261—266.
17. Wagner H. N., Migita T., Solomon N. Effect of age on reticuloendothelial function in man // J. Gerontol.— 1966.— 21, N 1.— P. 57—62.

Ин-т геронтологии АМН СССР, Киев

Поступила 03.03.87

УДК 616.438—089.87:612.017.1—092.9

Влияние тимостимулина на тимусную сывороточную активность и экспрессию Е-рецептора лимфоцитами морских свинок в условиях поздней тимэктомии

Ю. А. Григевич, Ф. В. Фильчаков, Е. Г. Гомберг

Одним из наиболее физиологически адекватных средств коррекции нарушений в иммунной системе являются биологически активные факторы тимуса [5]. Тем не менее показания к проведению иммунотерапии препаратами тимуса, а также методы оценки ее эффективности определены не достаточно полно ввиду все еще малой изученности механизмов их действия. Однако уже известно, что при оценке состояния иммунной системы и разработке методов иммунотерапии необходимо учитывать состояние эндокринной функции тимуса [1]. Исследование содержания одного из его гормонов — тимусного сывороточного фактора (ТСФ) — объективно характеризует эндокринную функцию тимуса. Расстройства эндокринной функции вилочковой железы влекут за собой развитие нарушений в созревании и дифференцировке Т-клеток, что в конечном итоге отражается и на их способности к Е-розеткообразованию [1, 2, 11].

Вышеизложенное послужило предпосылкой для изучения активности, свойственной гормонам тимуса в кровяном русле во взаимосвязи с экспрессией Е-рецептора на лимфоцитах морских свинок в условиях поздней тимэктомии, и влияния на эти показатели биологически активных факторов тимуса.

Исследования проведены на 55 половозрелых морских свинках обоего пола массой 150—200 г. Тимэктомия производилась в период, когда масса тела животных достигала не менее 100 г. Все животные были разделены на четыре группы. Нетимэктомизированным морским свинкам вводили изотонический раствор NaCl (1-я группа) или тимостимулин (2-я группа). Тимэктомизированным морским свинкам вводили по аналогии: изотонический раствор NaCl (3-я группа) или тимостимулин (4-я группа).

Тимостимулин — комплекс термостабильных недиализабельных тимусных полипептидов [5] — вводили трехкратно в течение недели по 10 ед. активности (2 мг) на животное, внутримышечно. За единицу активности принимали концентрацию тимостимулина в 1 мл, активную *in vitro* в тесте восстановления чувствительности розеткообразующих клеток (РОК) селезенки тимэктомизированных мышей к анти timoцитарной сыворотке. Введение тимостимулина тимэктомизированным животным начинали спустя 3 нед после операции. Контрольные животные получали эквивалентное по объему количество изотонического раствора NaCl по той же схеме. Животных забивали через сутки после последней инъекции препарата.

Лимфоциты периферической крови (ЛПК) выделяли в градиенте плотности фикола — верографин ($d=1,077 \text{ г/см}^3$) с последующим двукратным отмыванием охлажденным до 4°C раствором Хенкса. Клетки мезентериальных лимфатических узлов и селезенки получали общепринятым способом разволокнения ткани препаративными иглами. Эритроциты лизировали в 0,184 моль/л растворе NH_4Cl . Для определения числа Т-лимфоцитов в крови, селезенке и лимфатических узлах ставили реакцию спонтанного розеткообразования с эритроцитами (Е-РОК) кролика [12]. Перед постановкой реакции, для определения чувствительности Е-РОК к тимостимулину и теofilлину, лимфоциты инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C с разведенными средой 199 препаратами в следующих конечных концентрациях: тимостимулин 0,5 мг/мл, теofilлин 3 ммоль/мл. Контролем служили лимфоциты, инкубированные в течение 60 мин при температуре 37°C в среде 199. Тимусную сывороточную активность (ТСА) определяли по восстановлению чувствительности спонтанных РОК селезенки тимэктомизированных мышей к анти timoцитарной сыворотке [7], т. е. она эквивалентна активности ТСФ.

Статистическую обработку результатов проводили, используя критерий Стьюдента. Оценка коэффициента корреляции и регрессионный анализ выполнены на ЭВМ ЕС 1045 с использованием программного обеспечения из пакета научных программ на Фортране JBM, System / 360. Достоверность коэффициента корреляции определяли по критерию Фишера, коэффициентов регрессии — по критерию Стьюдента. Для графического построения зависимости изучаемых показателей было разработано программное обеспечение, реализующее метод наименьших квадратов.

Результаты и их обсуждение

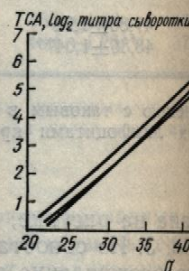
В табл. 1 представлены результаты исследования активности, свойственной гормонам тимуса в кровеносном русле тимэктомизированных морских свинок, спустя 24 ч после введения тимостимулина. Как видно, тимэктомия приводит к практически полному исчезновению ТСФ, а введение

Таблица 1. Тимусная сывороточная активность у тимэктомизированных морских свинок после введения тимостимулина, $\log_2$ титра сыворотки

Статистический показатель	Нетимэктомизированные животные		Тимэктомизированные животные	
	Введение изотонического раствора NaCl	Введение тимостимулина	Введение изотонического раствора NaCl	Введение тимостимулина
M	6,46	6,92	0,571	5,66
$\pm m$	0,166	0,166	0,156	0,148
n	13	13	14	15
P_1	—	$>0,05$	$<0,001$	$<0,002$
P_2	—	—	$<0,001$	$<0,001$
P_3	—	—	—	$<0,001$

тимостимулина тимэктомизированным животным секретировать гормоны веществ с активностью, подтверждающей ранее полученные данные у тимэктомизированных животных и некоторыми сыворотками с ТСА у этих животных, связанной с тимостимулином [6].

Известно, что одним из признаков тимэктомии является их способность



Зависимость числа Е-РОК и лимфатических узлов (З) от тимостимулина *in vivo* и с помощью регрессионной линии *in vitro*; пунктирная — *in vitro*

лимфоидных клеток, что свидетельствует о нарушении функции тимуса [1, 2]. Остается открытым вопрос, почему после индукции ТСА тимэктомизированных морских свинок тимусных лимфатических узлах снижено количество лимфоцитов, наблюдаемое у нетимэктомизированных животных. После введения тимостимулина в кровь тимэктомизированных морских свинок наблюдалось увеличение числа ЛПК. Это свидетельствует о биологической активности

Параллельно была проведена тимэктомия у морских свинок к тимостимулину *in vitro* (см. табл. 2). Инкубация лимфоцитов тимэктомизированных морских свинок с тимостимулином, полученным из тимуса тимэктомизированных морских свинок, приводит к изменению тимусной сывороточной активности (ТСА) в крови, селезенке и лимфатических узлах тимэктомизированных морских свинок, что свидетельствует о том, что тимостимулин, полученный из тимуса тимэктомизированных морских свинок, обладает тимусной активностью. На рисунке, а, представлены результаты инкубации с тимостимулином, полученным из тимуса тимэктомизированных морских свинок, с тимостимулином, полученным из тимуса нетимэктомизированных морских свинок.

На рисунке, а, представлены результаты инкубации с тимостимулином, полученным из тимуса тимэктомизированных морских свинок, с тимостимулином, полученным из тимуса нетимэктомизированных морских свинок.

х свинках обоего пола массой масса тела животных достигала ыре группы. Нетимэктомирован- NaCl (1-я группа) или тимости- кам вводили по аналогии: изо- (4-я группа).

ализабельных тимусных поли- по 10 ед. активности (2 мг) на имали концентрацию тимостиму- и чувствительности розеткообра- мышей к антитимоцитарной сы- животным начинали спустя и эквивалентное по объему ко- ме. Животных забивали через

яли в градиенте плотности фи- вухкратным отмыванием охлаж- бных лимфатических узлов и се- знения ткани препаративными ре NH_4Cl . Для определения чис- узлов ставили реакцию спонтан- олика [12]. Перед постановкой тимостимулину и теofilлину, пературе 37°C с разведенными концентрация: тимостимулин ли лимфоциты, инкубированные Тимусную сывороточную актив- ьности спонтанных РОК селе- сыворотке [7], т. е. она эквива-

и, используя критерий Стьюдент- анализ выполнены на ЭВМ ЕС кета научных программ на Фор- корреляции определяли по кри- ю Стьюдента. Для графического азработано программное обеспе-

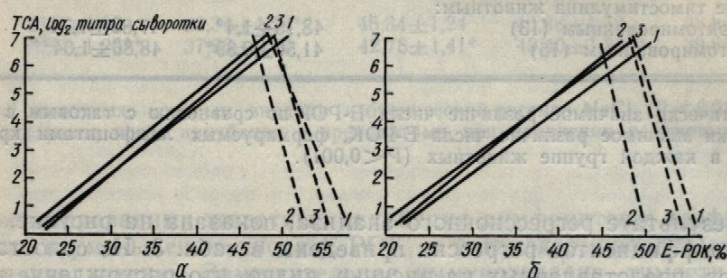
ния активности, свойствен- мэктомированных морских улипа. Как видно, тимэк- зновению ТСФ, а введение

мэктомированных гра сыворотки

Тимэктомированные животные	
Введение изотонического раствора NaCl	Введение тимостимулина
0,571	5,66
0,156	0,148
14	15
<0,001	<0,002
<0,001	<0,001
—	<0,001

тимостимулина тимэктомированным животным, лишенным возможности секретировать гормоны тимуса, индуцирует появление в кровяном русле веществ с активностью, свойственной последним. Эти результаты подтверждают ранее полученные в нашей лаборатории данные об индукции ТСА у тимэктомированных мышей биологически активными факторами тимуса и некоторыми иммуномодуляторами [6]. Более низкий титр сыворотки с ТСА у этих животных, чем титр ТСФ у нетимэктомированных животных, связан с особенностями динамики ТСА после введения тимостимулина [6].

Известно, что одним из наиболее важных свойств гормонов тимуса является их способность к реорганизации плазматической мембраны



Зависимость числа Е-РОК (%), формируемых лимфоцитами крови (1), селезенки (2) и лимфатических узлов (3), от уровня ТСА ($\log_2$ титра сыворотки) после обработки тимостимулином *in vivo* и *in vitro*, полученная методом наименьших квадратов (а) и с помощью регрессионного анализа (б). Сплошная линия — влияние тимостимулина *in vivo*; пунктирная — *in vitro*.

лимфоидных клеток, что непременно отражается и на Е-розеткообразовании [1, 2]. Остается неизученным влияние ТСА на эти процессы. Поэтому было исследовано число Е-РОК в различных лимфоидных органах после индукции ТСА тимостимулином *in vivo* у нетимэктомированных и тимэктомированных морских свинок (табл. 2). Показано, что у тимэктомированных животных число Е-РОК в крови, селезенке и лимфатических узлах снижено в два и более раз по сравнению с уровнем, наблюдаемым у нетимэктомированных морских свинок ($P < 0,001$). Введение тимостимулина приводит к почти полному восстановлению числа Е-РОК во всех исследованных лимфоидных органах тимэктомированных животных. После введения тимостимулина нетимэктомированным морским свинкам наблюдается снижение числа Е-РОК, формируемых ЛПК. Это свидетельствует о наличии иммуномодулирующих свойств биологически активных факторов тимуса [1].

Параллельно была изучена чувствительность лимфоцитов морских свинок к тимостимулину и теofilлину в тесте Е-розеткообразования *in vitro* (см. табл. 2). Инкубация ЛПК *in vitro* с тимостимулином, так же как и лимфоцитов лимфатических узлов и селезенки нетимэктомированных животных, получавших тимостимулин *in vivo*, не приводит к существенному изменению числа Е-РОК. В противоположность этому, у тимэктомированных животных наблюдается увеличение числа Е-РОК в крови, селезенке и лимфатических узлах после инкубации клеток с тимостимулином, что справедливо и для тимэктомированных морских свинок, которым вводили тимостимулин *in vivo*. По-видимому, индуцированная тимостимулином сывороточная активность вызывает экспрессию Е-рецепторов только на части Т-лимфоцитов, поскольку после инкубации с тимостимулином клеток, полученных из органов этих животных, число Е-РОК статистически значимо возрастает ($P < 0,001$).

На рисунке, а, представлена зависимость числа Е-РОК, формируемых лимфоцитами крови, селезенки и лимфатических узлов, от уровня ТСА в крови, после обработки их тимостимулином *in vivo* и *in vitro*, полученная методом наименьших квадратов. Эта же зависимость, получен-

Таблица 2. Относительное число Е-РОК ($M \pm m$), формируемых лимфоцитами морских свинок после инкубации с препаратами,

Условие эксперимента (число животных)	крови			цпты		
	после инкубации			селезенки		
	до инкубации	с тимостимулином	с теофиллином	до инкубации	после инкубации	с теофи.
Введение изотонического раствора NaCl животным:						
нетимэктомизированным (13)	52,07±0,91	51,23±0,74	39,53±1,57*	48,96±1,57	49,19±1,57	38,61±1,57
тимэктомизированным (14)	22,03±1,01*	57,71±1,95**	36,92±1,56*	20,32±1,64*	53,21±1,25**	29,85±1,25**
Введение тимостимулина животным:						
нетимэктомизированным (13)	48,15±1,4*	47,80±1,74	38,11±1,41*	45,92±0,99	46,8±1,99	38,34±1,99
тимэктомизированным (15)	41,50±0,89*	48,86±1,04**	39,43±0,59	40,36±1,04*	48,6±1,26**	37,93±1,26**

* Статистически значимое различие числа Е-РОК по сравнению с таковым в группе нетипично инкубированных животных, которым статистически значимое различие числа Е-РОК, формируемых лимфоцитами крови, селезенки и лимфатических узлов после инкубации в каждой группе животных ($P < 0,001$).

ная в результате регрессионного анализа, показана на рисунке, б. Значения коэффициентов регрессии приведены в табл. 3. Из сопоставления графиков, представленных на рисунке, видно, что расхождение вариантов зависимости, полученных разными методами, незначительны и объясняются дискретностью распечатки результатов, выданных ЭВМ. Оба варианта графиков показывают прямую линейную зависимость числа Е-РОК от содержания тимусных факторов (этими факторами могут быть как истинные гормоны тимуса — ТСФ, так и индуцируемая введением тимостимулина ТСА) и обратную линейную зависимость чувствительности Е-РОК к тимостимулину *in vitro*. Вычисленные коэффициенты корреляции также подтверждают эти зависимости (см. табл. 3).

При инкубации лимфоцитов крови, селезенки и лимфатических узлов с теofilлином *in vitro* выявляется следующая закономерность: у

Таблица 3. Коэффициенты линейной регрессии и корреляции, описывающие зависимость числа Е-РОК от ТСА после обработки лимфоцитов препаратами

Условия обработки лимфоцитов	Коэффициенты линейной регрессии		Достоверность по критерию Стьюдента P_1	Коэффициент корреляции r	Достовер- ность по критерию Фишера P_2
	K	b			
Кровь					
Тимостимулин:					
in vivo	4,279	20,350	$<0,001$	0,913	$<0,001$
in vitro	—1,342	57,813	$<0,001$	—0,597	$<0,001$
Теофиллин:					
in vitro	0,399	36,617	$<0,05$	0,234	$<0,05$
Селезенка					
Тимостимулин:					
in vivo	4,215	18,605	$<0,001$	0,908	$<0,001$
in vitro	—0,745	50,035	$<0,01$	—0,363	$<0,01$
Теофиллин:					
in vitro	1,446	29,274	$<0,001$	0,587	$<0,001$
Лимфатические узлы					
Тимостимулин:					
in vivo	3,927	20,310	$<0,001$	0,897	$<0,001$
in vitro	—1,093	55,686	$<0,001$	—0,532	$<0,001$
Теофиллин:					
in vitro	1,272	31,375	$<0,001$	0,529	$<0,001$

ктомированных животных, которым
и лимфатических узлов после инкуба

нетимэктомированных же приводит к уменьшению чтив,— к увеличению. Зам после тимэктомии приводит к теофиллину не

Статистическая обработка чувствительности Е (см. табл. 3). При оптимально наблюдается снижение численности при отсутствии факторов при исследованных лимфоидных

Аналогичная закономерность, больших некоторыми, у которых после инк-лось увеличение числа Е-Р

Известно, что факторы способствуют появлению в крови маркеров, свойственных для теофиллинов, гормонов в крови при Т-лимфоцитозе, которые обладают способностью к Е-роузеткообразованию, и для индуцируемой в крови, селезенке и лимфатических узлах при оптимальном содержании о наличии клеток с с тем обстоятельством, что свойства клеток с хелперной мере контролируются. Следовательно, реакция Е-РОК, отражает сдвиги в эндокринной функции тимуса.

Выводы

1. У морских свинок после кровяного русла происходит и лимфатических узлах.
2. Введение биологическим животным приводит становлением способности

формируемых лимфоцитами морских свинок после инкубации с препаратами, %

инкубации	крови		селезенки		лимфатических узлов	
	после инкубации		после инкубации		после инкубации	
	с тимостимулином	с теофиллином	до инкубации	с тимостимулином	с теофиллином	до инкубации
0,91	51,23±0,74	39,53±1,57**	48,96±1,57	49,19±1,57	38,61±1,24**	49,57±1,66
1,01*	57,71±1,95**	36,92±1,56**	20,32±1,64*	53,21±1,25**	29,85±2,35**	22,07±1,01*
1,4*	47,80±1,74	38,11±1,41**	45,92±0,99	46,8±1,99	38,34±1,24**	45,34±1,24
0,89*	48,86±1,04**	39,43±0,59	40,36±1,04*	48,6±1,26**	37,93±0,96	42,78±1,41*
						50,00±1,41
						55,50±2,03**
						39,46±1,90**
						31,85±2,03**
						46,88±1,32
						49,40±1,33**
						38,80±1,24**
						39,60±1,41

сравнению с таковым в группе нетимэктомированных животных, которым вводили изотонический раствор NaCl ($P < 0,01$). ** Статистически значимые различия между группами после инкубации с препаратами при сравнении с таковыми до инкубации.

казана на рисунке, б. Значения, приведенные в табл. 3. Из сопоставления результатов, что расхождение вариантами, незначительны и результаты, выданные ЭВМ. Установлена линейная зависимость между количеством тимусных факторов (этими факторами ТСФ, так и индуцируемая *in vitro*. Вычисленные коэффициенты корреляции, описывающие эти зависимости (см.

селезенки и лимфатических узлов, что указывает на закономерность: у

корреляции, описывающие лимфоцитов препаратами

Значимость различия P_1	Коэффициент корреляции r	Достоверность по критерию Фишера P_2
0,001	0,913	<0,001
0,001	-0,597	<0,001
0,05	0,234	<0,05
0,001	0,908	<0,001
0,01	-0,363	<0,01
0,001	0,587	<0,001
0,001	0,897	<0,001
0,001	-0,532	<0,001
0,001	0,529	<0,001

нетимэктомированных животных инкубация лимфоцитов с теофиллином приводит к уменьшению числа Е-РОК, а у тимэктомированных, напротив, — к увеличению. Заместительная иммунотерапия тимостимулином после тимэктомии приводит к увеличению числа Е-РОК, а их чувствительность к теофиллину нивелируется.

Статистическая обработка позволила выявить линейную зависимость чувствительности Е-РОК к теофиллину от уровня ТСА в крови (см. табл. 3). При оптимальном содержании тимусных факторов наблюдается снижение числа Е-РОК после инкубации с теофиллином, а отсутствие факторов приводит к увеличению числа Е-РОК во всех исследованных лимфоидных органах после инкубации с теофиллином.

Аналогичная закономерность отмечена нами при обследовании детей, больных некоторыми формами лимфопролиферативных заболеваний, у которых после инкубации лимфоцитов с теофиллином наблюдалось увеличение числа Е-РОК [4].

Известно, что факторы, повышающие уровень цАМФ в клетках, способствуют появлению на поверхности предшественников Т-лимфоцитов маркеров, свойственных зрелым Т-клеткам [10]. Подобный эффект описан и для теофиллина [9]. По-видимому, отсутствие тимусных гормонов в крови приводит к появлению незрелых популяций Т-лимфоцитов, которые после инкубации с теофиллином приобретают способность к Е-розеткообразованию, что справедливо и для тимостимулина, и для индуцируемой им ТСА. Однако уменьшение числа Е-РОК в крови, селезенке и лимфатических узлах под влиянием теофиллина, при оптимальном содержании гормонов тимуса, может свидетельствовать о наличии клеток с супрессорными функциями [8]. Это согласуется с тем обстоятельством, что количественный состав и функциональные свойства клеток с желперными и супрессорными функциями в значительной мере контролируются гормонами вилочковой железы [13]. Следовательно, реакция лимфоцитов на теофиллин, при оценке числа Е-РОК, отражает сдвиги в субпопуляциях лимфоцитов при нарушении эндокринной функции тимуса.

Выводы

1. У морских свинок после тимэктомии наряду с исчезновением ТСФ из кровяного русла происходит снижение числа Е-РОК в крови, селезенке и лимфатических узлах.

2. Введение биологически активных факторов тимуса тимэктомированным животным приводит к появлению ТСА, что сопровождается восстановлением способности лимфоцитов к образованию Е-РОК.