

10. Pierpaoli N., Sorkin E. Relationship between thymus and hypophysis // *Nature*, London.— 1972.—215.— P. 834—836.
11. Renoux G., Biziere K., Bardos P. et al. NK activity in mice is controlled by the brain neocortex // NK cells and other natural effector cells.— New York: Acad. press.— 1982.— P. 639—643.
12. Renoux G., Biziere K., Renoux M. et al. The production of T-cell-inducing factors in mice is controlled by the brain neocortex // *Scand. J. Immunol.*— 1983.—17.— P. 45—50.
13. Stein M., Schiavi R. C., Camerino M. Influence of brain and behavior on the immune system // *Science*.— 1976.—191.— P. 435—440.

Киев ин-т нейрохирургии
М-ва здравоохранения УССР

Поступила 05.04.86

УДК 612.438:611—018.53

Индукция тимостимулином синтеза фактора, усиливающего бактерицидную активность макрофагов

И. С. Никольский, И. В. Фильчаков, Ф. В. Фильчаков, Ю. А. Гриневич,
А. М. Зарицкий, Н. Я. Спивак, Л. А. Ганова, Г. А. Замотаева

Механизм противoinфекционного действия биологически активных факторов тимуса не ясен. Ранее нами получены данные о том, что действие тимостимулина может реализовываться посредством индукции биологически активными факторами тимуса эндогенных иммуномодуляторов [4]. Среди них могут быть и факторы, стимулирующие бактерицидную активность макрофагов (МФ). Проверка этого предположения — цель настоящей работы.

Методика

В опытах на мышах линии СВА массой 16—18 г использовали препарат биологически активных факторов тимуса — тимостимулин [3], активность которого определяли по методике, описанной в работе Vach и соавт. [9]. По этой же методике определяли активность веществ с тимозиноподобной активностью (ВТПА). Препарат (900 мкг) вводили животным подкожно. Макрофаги перитонеального экссудата мышей (МФПЭ) получали согласно методике, описанной в работе Фрейдлин [8]. Спленоциты мышей (от 5—6 животных) получали разволокнением ткани селезенки через 1, 3, 4, 5, 7 и 10 сут после введения тимостимулина общепринятым способом. Клетки культивировали при температуре 37 °С в течение 24 ч в среде 199 и 10 %-ной эмбриональной телячьей сыворотке. Разделение клеток на прилипающую и неприлипающую фракции производили на колонке с нейлоновой ватой по методу Russo [11]. Полученные супернатанты культур лимфоцитов проверяли на наличие активирующего макрофаги фактора в двух тестах. Антимикробную активность МФПЭ мышей против *S. typhimurium* определяли в 96-луночных микроплатах с плоским дном («Linbro») по методике Гордиенко [1]. Для этого сингенные МФПЭ ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) вносили в лунки в объеме 50 мкл. Платы выдерживали в течение 2 ч при температуре 37 °С для прилипания клеток. Затем вносили исследуемые супернатанты в объеме 50 мкл, совместное инкубирование продолжали при температуре 37 °С в течение 24 ч. По истечении этого срока монослой клеток отмывали и добавляли свежую среду культивирования. В каждую лунку вносили неопсонизированные бактерии *S. typhimurium* в объеме 50 мкл (соотношение МФ и бактерий 1:1). При этом все опытные и контрольные определения проводили в трех повторностях. МФ и бактерии совместно культивировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Число жизнеспособных сальмонелл в пробах определяли после лизиса МФ 0,25 %-ным раствором додецилсульфата натрия. Активирующую субстанцию определяли в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [2]. Каждую пробу дублировали 4—5 флаконами. Предварительную обработку МФПЭ супернатантами культур спленоцитов проводили так же, как и в первом случае, в течение 24 ч при температуре 37 °С. Супернатанты обрабатывали трипсином при температуре 30 °С в

Таблица 1. Влияние супернатантов культур спленоцитов мышей на бактерицидную активность макрофагов перитонеального эк

Показатель	Обработка проб			культур спленоцитов мышей, получавших	
	средой культивирования (контроль)	супернатантом культур спленоцитов мышей, не получавших тимостимулин	супернатантами	через 3 суток	через 4 суток
			через 1 сутки		
НСТ-тест					
Количество восстановленного формазана, ЕД/·10 ⁶ клеток:					
1-я повторность опыта	10,8±0,36	12,5±0,54	16,6±0,36*	41,8±0,72*	36,3±0,54*
2-я повторность опыта	25,5±0,36	29,5±0,36	41,8±0,87*	62,3±0,18*	49,0±0,9*
3-я повторность опыта	7,0±0,75	7,5±0,75	14,0±2,3*	37,1±0,36*	
			Антимикробный тест	против S. typhimurium	
Антимикробный индекс	25,0±19,6	40±14	41,0±18,6	72,5±11,2*	—

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой обозначена статистически достоверная разница по сравнению с контролем ($P < 0,001$).

течение 1 ч. Для этого кристаллический трипсин растворяли в 0,0025 н растворе HCl, соотношение фермента и субстрата было 1:10. После этого в контроль и пробу вносили соевый ингибитор трипсина из расчета пять частей ингибитора на одну часть трипсина. В контрольную группу перед добавлением ингибитора вносили трипсин. Антимикробную активность МФ вычисляли по формуле, приведенной в работе Гордиенко [1], и выражали антимикробным индексом (АМИ). Результаты определения активирующей субстанции выражали в единицах оптической плотности (ЕД) на $1 \cdot 10^6$ клеток.

Статистическую обработку материалов проводили по методике Стрелкова [7].

Результаты и их обсуждение

Как видно из результатов, представленных в табл. 1, МФПЭ мышей, предобработанные супернатантами культур спленоцитов мышей, получавших тимостимулин за 1—4 сут, обладают повышенной способностью восстанавливать формазан по сравнению с контрольными пробами, где МФПЭ обрабатывали супернатантами культур спленоцитов мышей, не получавших препарат, или средой культивирования. При этом наибольшей активирующей способностью обладали супернатанты культур спленоцитов мышей после введения тимостимулина за 3 сут до получения спленоцитов. Аналогичные результаты получены в антимикробном тесте против *S. typhimurium* (см. табл. 1), где наибольшую активирующую способность проявляли также супернатанты спленоцитов мышей через 3 сут после инъекции тимостимулина, что превышает значения показателей контрольных проб в 3 раза ($P < 0,001$).

Таким образом, спленоциты мышей после введения тимостимулина приобретают повышенную способность продуцировать фактор, усиливающий бактерицидную активность макрофагов. Существует пороговая доза вводимого тимостимулина. Так, по показателям НСТ-теста, инъекция 9 мкг препарата не приводит к индукции фактора ($8,5 \pm 0,54$), тогда как 90 и 900 мкг ($18,0 \pm 1,4$ и $26,0 \pm 1,4$ соответственно) повышают бактерицидную активность макрофагов ($P < 0,001$). При использовании в качестве источников этой активности спленоцитов, фракционированных на колонке с нейлоновой ватой, оказалось, что фракция неприлипающих клеток обладает большей способностью индуцировать фактор ($80,0 \pm 0,36$), по показателям НСТ-теста, чем нефракционированные лимфоциты ($66,0 \pm 0,54$) или прилипающая фракция клеток ($59,0 \pm 0,18$; $P < 0,001$).

Приведенные результаты показывают, что фактор вырабатывают не прилипающие к нейлоновой вате клетки, каковыми в основном являются Т-лимфоциты [11].

Фактор выдерживает прогревание при температуре 56 °С в течение 30 мин, стабилен при pH 2, однако полностью инактивируется прогре-

ванием при температуре фактор, усиливающий синтез пептид. Это не интерферон [5, 10], да и в макрофагах (3-е сутки) не стимулирует синтез интерферона фактор [4], синтез после индукции, вызывая селезеночных розеткообразующий фактор, усиливающий бактерицидную активность не обладает

Таким образом, индукция тимостимулина приводит к синтезу двух факторов, причем синтез одного из них предшествует синтезу другого и не исключает, что первый индуцирует синтез второго, т. е., возможен каскадный синтез активных факторов различными свойствами. Подтверждением этому служат следующие результаты. Тимэктомизированным мышам вводили тимостимулин (100 мкг), через час после введения еще 3 ч. Такие мыши держали в ВТРА ($\log_2$ титр) клеток селезенки в эритроцитной суспензии приводило к значительной активации макрофагов селезенки мышей, либо фактор не может индуцировать синтез клетками селезенки фактора, усиливающего бактерицидную активность макрофагов, через несколько суток в течение длительного времени. Тимостимулин непосредственно не стимулирует синтез факторов; к тому же при инкубации супернатанта с макрофагами действия на макрофаги.

бактерицидную активность макрофагов перитонеального экссудата, определяемую разными тестами ($M \pm m$)

Обработка	проб				
	культур спленоцитов мышей, получавших тимостимулин				
в 1 сутки	через 3 суток	через 4 суток	через 5 суток	через 7 суток	через 10 суток
НСТ-тест					
$6 \pm 0,36^*$	$41,8 \pm 0,72^*$	$36,3 \pm 0,54^*$	$20,5 \pm 0,54^*$	$15,3 \pm 0,18^*$	$12,6 \pm 0,4$
$8 \pm 0,87^*$	$62,3 \pm 0,18^*$	$49,0 \pm 0,9^*$			
$0 \pm 2,3^*$	$37,1 \pm 0,36^*$				
робный тест	против <i>S. typhimurium</i>				
$0 \pm 18,6$	$72,5 \pm 11,2^*$	—	$22,5 \pm 16,8$	$12,0 \pm 5,5$	$20 \pm 11,2$

поверная проба по сравнению с контролем ($P < 0,001$)

е НСІ,
у вно-
часть
и. Ан-
риден-
активи-
слеток.
[7].

ышей,
полу-
остью
и, где
ей, не
боль-
спле-
чения
тесте
ощую
через
каза-

улина
лива-
говая
инъек-
тогда
шают
вании
анных
ющих
 $80,0 \pm$
имфо-
 $\pm 0,18$;

ывают
явля-

ечение
прогре-

34, № 4

ванием при температуре 80 °С и обработке трипсином. По-видимому, фактор, усиливающий бактерицидную активность макрофагов, — полипептид. Это не интерферон, так как тимостимулин не является его индуктором [5, 10], да и время максимальной активной продукции фактора спленоцитами (3-е сутки) далеко не совпадает с хорошо известной динамикой синтеза интерферона [6]. Это и не первоначально выявленный нами фактор [4], синтезируемый в течение нескольких первых часов после индукции, вызывающий экспрессию Thy-1-антигена на спонтанных селезеночных розеткообразующих клетках тимэктомированных мышей; фактор, усиливающий бактерицидную активность макрофагов, такой активностью не обладает.

Таким образом, инъекция тимостимулина приводит к синтезу двух факторов, причем синтез одного из них предшествует синтезу другого и не исключено, что первый индуцирует синтез второго, т. е., возможно, происходит каскадный синтез активных факторов с различными свойствами. Подтверждением этому служат следующие результаты. Тимэктомированным мышам вводили тимостимулин

(100 мкг), через час после инъекции получали клетки селезенки и культивировали еще 3 ч. Таким образом получали культуральную среду, содержащую ВТПА ($\log_2$ титра составляет 5,33; табл. 2). Культивирование клеток селезенки в этой среде ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) в течение 30 мин приводило к значительному повышению активности. Спленоциты тимэктомированных мышей сами по себе ВТПА не продуцируют. Какой-либо фактор не может индуцировать собственный синтез и поэтому нет сомнений в том, что 4-часовые ВТПА с определенными свойствами индуцируют синтез клетками селезенки ВТПА второго порядка и, судя по наличию фактора, усиливающего бактерицидную активность макрофагов, через несколько суток такая каскадная реакция продолжается довольно длительное время. Это тем более вероятно, поскольку тимостимулин непосредственно не повышает бактерицидную активность макрофагов; к тому же при совместном культивировании спленоцитов с тимостимулином супернатанты также не проявляли активирующего действия на макрофаги.

Таблица 2. Активность среды с ВТПА под влиянием культивирования в ней эритроцитов или клеток селезенки тимэктомированных мышей ($M \pm m$)

Исследуемая проба	Число животных	Активность ВТПА ($\log_2$ титра)
Среда с ВТПА	12	$5,33 \pm 0,18$
Среда с ВТПА и эритроцитами	10	$5,00 \pm 0,21$
Среда с ВТПА и клетками селезенки	12	$7,25 \pm 0,27^*$

1. Введение тимостимулина мышам приводит к продукции спленоцитами фактора, усиливающего бактерицидную активность макрофагов.

2. Механизм усиления антиинфекционного иммунитета биологически активными факторами тимуса включает развитие индукторного, каскадного синтеза лимфокинов — веществ с тимозиноподобной активностью первого и второго порядков, а также фактора, усиливающего бактерицидную активность макрофагов.

THYMOSTIMULIN INDUCTION OF SYNTHESIS OF THE BACTERICIDAL MACROPHAGE ACTIVITY-INTENSIFYING FACTOR

I. S. Nikolsky, I. V. Filchakov, F. V. Filchakov, Yu. A. Grinevich,
A. M. Zaritsky, N. Ya. Spivak, L. A. Ganova, G. A. Zamotava

It is stated that splenocytes of thymostimulin-administered mice acquire ability to produce the bactericidal macrophage activity-intensifying factor. The factor induction is of a dose-dependent character. The factor produces T-lymphocytes. Induction of the bactericidal-active factors by biologically active thymic factors is evidently of a cascade character.

Institute of Roentgenology, Radiology and Oncology,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Гордиенко С. М. Роль мононуклеарных и полиморфноядерных фагоцитов, естественных и антителозависимых киллеров в неспецифическом антиинфекционном иммунитете. Предварительная характеристика естественных и антителозависимых киллеров, обладающих антимикробной активностью, не связанной с фагоцитозом // Иммунология. — 1984. — № 5. — С. 31—34.
2. Грачева М. П. Определение бактерицидной силы альвеолярных макрофагов с помощью НСТ-теста // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1984. — № 2. — С. 87—88.
3. Гриневич Ю. А. Регуляторное действие тимостимулина на лимфоциты периферической крови больных раком молочной железы // Эксперим. онкология. — 1981. — 3, № 4. — С. 44—47.
4. Никольский И. С., Гриневич Ю. А., Селезнева Т. Н. и др. Индукторная активность гуморальных факторов тимуса, спленина и левамизола // Иммунология. — 1985. — № 4. — С. 44—48.
5. Никольский И. С., Поволоцкий Я. Л., Кривохатская Л. Д., Черненко О. Д. Влияние экстракта тимуса и поздней тимэктомии на интерфероногенез // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1977. — 89, № 10. — С. 439—440.
6. Соловьев В. Д., Бектемиров Т. А. Интерфероны в теории и практике медицины. — М.: Медицина, 1981. — 400 с.
7. Стрелков Р. Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала: метод. рекомендации. — Обнинск: Б. и., 1980. — 20 с.
8. Фрейдлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов. — М.: Медицина, 1984. — 272 с.
9. Bach J. F., Dardenne M., Bach M. A. Detection of a circulating thymic hormones using T-rosette forming cells // Proc. Ann. Leucocyte Culture Conference. New York, 1973. — P. 271—283.
10. Huang K. V., Kind P. D., Iogoda E. M., Goldstein A. L. Thymosin treatment modulates production of interferon. // J. Interferon Res. — 1981. — 1, N 3. — P. 411—420.
11. Russo A. I., Howell I. H., Han T., Blalmeaur P. Isolating of T-cells, B-cells, macrophages by a two stage, adherence procedure // J. Clin. Immunol. — 1979. — 2, N 1. — P. 67—72.

Киев. науч.-исслед. рентгено-радиол. и онкол. ин-т
М-ва здравоохранения УССР

Поступила 10.05.87

Исследование влияния на функциональную а

С. В. Тимченко, О. Ф. Мельник

Ранее нами было показано, что лимидазотиазола, синтезируемый в СССР [10], in vitro эффективен против базофилов крыс, обусловленного [8]. В то же время в ряде экспериментальных исследований содержание в тканевых базофилах (цАМФ) [5, 11, 12, 13] тонич изменяет внутриклеточные концентрации цАМФ.

Целью нашей работы было исследование влияния на функциональную активность в них цАМФ.

Методика

Опыты проведены in vitro на тканях массой 240—300 г, которые получены от животных с последующим извлечением. Принципы построения опытов описаны в [3, 5]. Содержание тканевых базофилов (цАМФ) в течение 30 мин при температуре 37°C с добавлением человеческого сывороточного альбумина (Венгрия), хлористого кальция (100 мкг/мл) на их функциональную активность от препарата. При изучении действия вносили 10 ммоль/л глюкозы. Вещество 48/80 фирмы «Sigma» вносили на лед. Затем их центрифугировали 10 мин, надосадочную жидкость вливали в ванную воды и встряхиванием в ванночке клеточных лизатов использовали на спектрофлуориметре Hitachi. Процент его общего содержания составлял 0—34,59%. Экспериментальные концентрации не влияют на реакцию.

В отдельной серии экспериментов содержание в тканевых базофилах цАМФ в 1, 5, 15 и 30 мин при тех же условиях инкубации пробы помещали в 400 г в течение 15 мин. Супернатанты, содержащего 50 ммоль/л натрия при температуре 100°C, центрифугировали и замораживали. Методике и на реактивах фирмы «Sigma» батывали статистически с использованием теста t [1, 2].