

Исследование влияния иммуномодулятора мейтония на функциональную активность тканевых базофилов крыс

С. В. Тимченко, О. Ф. Мельников, С. В. Покровская, А. П. Костромин, М. И. Боровок

Ранее нами было показано, что мейтоний, иммуномодулятор типа фенилмидазотиазола, синтезированный в Институте органической химии АН СССР [10], *in vitro* эффективно подавляет дегрануляцию тканевых базофилов крыс, обусловленную комплексом IgE — антитело — аллерген [8]. В то же время в ряде работ отмечается взаимосвязь антианафилактического действия веществ и их способности повышать внутриклеточное содержание в тканевых базофилах циклического 3', 5'-аденозинмонофосфата (цАМФ) [5, 11, 12, 13]. Экспериментально установлено, что мейтоний изменяет внутриклеточное содержание этого нуклеотида в лимфоидных клетках [6].

Целью нашей работы явилось изучение влияния мейтония на функциональную активность тканевых базофилов крыс и содержание в них цАМФ.

Методика

Опыты проведены *in vitro* на тканевых базофилах 39 крыс линии Вистар, обоего пола, массой 240—300 г, которые получали промыванием перитонеальной и плевральной полостей животных с последующим выделением на ступенчатом градиенте плотности фикола. Принципы построения опытов и состав рабочих растворов описаны в работах Гущина [3, 5]. Содержание тканевых базофилов в используемых взвешках составляло 79—90 %. Тканевые базофилы, по $11,6\text{--}25 \times 10^3$ клеток в пробе, инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °C в 200 мкл Sørensen-фосфатного буфера (pH 7,4) с добавлением человеческого сывороточного альбумина (1 мг/мл) фирмы «Reanal» (Венгрия), хлористого кальция (1 ммоль/л) и мейтония (10—5 000 мкг/мл). Исследовано также влияние времени инкубации (1—30 мин) тканевых базофилов с мейтонием (100 мкг/мл) на их функциональную активность. В экспериментах пользовались методом отмывки клеток от препарата, заключавшимся в 200-кратном разведении исследуемой пробы. При изучении действия мейтония на энергетику клеточной реакции в среду вносили 10 ммоль/л глюкозы. В качестве либератора гистамина в опытах использовали вещество 48/80 фирмы «Sigma» (США). После окончания инкубации пробы помещали на лед. Затем их центрифугировали при 400 g и температуре 4 °C в течение 10 мин, надосадочную жидкость отделяли, клетки разрушали добавлением дистиллированной воды и встряхиванием в миксере ВП. По 200 мкл надосадочной жидкости и клеточных лизатов использовали для спектрофлуориметрического определения гистамина на спектрофлуориметре Hitachi MPF-2A. Высвобождение гистамина выражали в процентах его общего содержания в порции клеток. Спонтанный выход медиатора составлял 0—34,59 %. Экспериментально установлено, что мейтоний в использованных концентрациях не влияет на реакцию определения гистамина.

В отдельной серии экспериментов исследовали влияние мейтония (100 мкг/мл) на содержание в тканевых базофилах цАМФ. Клетки инкубировали с препаратом в течение 1, 5, 15 и 30 мин при тех же условиях, что и в предыдущей серии опытов. По окончании инкубации пробы помещали на лед, а затем центрифугировали на холоду при 400 g в течение 15 мин. Супернатанты сливали, добавляли по 180 мкл буферного раствора, содержащего 50 ммоль/л трис-HCl и 4 ммоль/л ЭДТА (pH 7,5), 3 мин кипятили при температуре 100 °C, центрифугировали при 400 g в течение 20 мин, после чего собирали супернатанты и замораживали при —30 °C. Определение цАМФ проводили по методике и на реактивах фирмы «Amersham» (Англия). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия U Вилкоксона — Манна — Уитни и теста t [1, 2].

Результаты

Мейтоний в концентрациях до 500 мкг/мл не обладает гистаминвысвобождающими свойствами. Однако в дозе 5 000 мкг/мл проявляется его цитотоксическое действие, выражающееся практически полным (94,64 %) высвобождением медиатора из клеток. При этом внесение в инкубационную среду вещества 48/80 — либератора гистамина, не изменяет этот результат (рис. 1, а). Как видно из рисунка, мейтоний в концентрациях

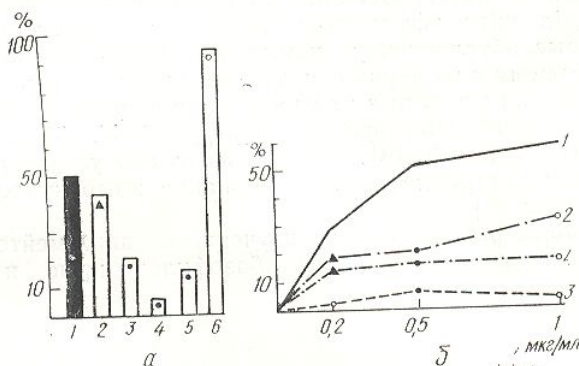


Рис. 1. Влияние мейтония на высвобождение гистамина, вызванное действием вещества 48/80:

а — определение эффективных доз концентраций препарата (1 — контроль — высвобождение гистамина из клеток, инкубированных с веществом 48/80 концентрацией 0,5 мкг/мл, 2 — то же после 30-минутной обработки мейтонием концентрацией 10 мкг/мл, 3 — 50 мкг/мл, 4 — 100 мкг/мл, 5 — 500 мкг/мл, 6 — 5000 мкг/мл; по вертикали — высвобождение гистамина); б — влияние эффективных концентраций препарата на высвобождение гистамина под действием различных концентраций вещества 48/80 (1 — контроль без мейтония, 2 — с мейтонием концентрацией 50 мкг/мл, 3 — вещество 48/80; по оси абсцисс — концентрация вещества 48/80, по оси ординат — высвобождение гистамина). Здесь и на рис. 2 и 3 достоверность различий опыта и контроля по критерию U Вилкоксона—Манна—Уитни; ▲ — $P > 0,05$; ○ — $P \leq 0,05$; ● — $P \leq 0,01$.

от 50 до 500 мкг/мл достоверно тормозит высвобождение гистамина, вызванное добавлением вещества 48/80. Это действие препарата наиболее выражено при концентрации 100 мкг/мл (рис. 1, б) и развивается постепенно, достигая максимальных значений к 15-й минуте и сохраняется в дальнейшем (рис. 2). Отмывка клеток от мейтония частично снимает его угнетающее влияние на функциональную активность тканевых базофилов, однако полного восстановления способности клеток высвобождать гистамин в ответ на действие вещества 48/80 не отмечается (см. рис. 2).

Наличие в инкубационной среде глюкозы (10 ммоль/л) снимает угнетающее влияние препарата на высвобождение гистамина, обусловленное действием вещества 48/80 в концентрации 0,2 и 0,5 мкг/мл (рис. 3). Вместе с тем при концентрации этого вещества 1 мкг/мл глюкоза достоверно ($P < 0,05$) повышает секрецию медиатора клетками, обработанными мейтонием (100 мкг/мл), однако она существенно отличается от контроля.

Влияние мейтония на содержание цАМФ (пмоль/ 10^5 клеток) в тканевых базофилах крыс ($M \pm m$)

Номер серии опытов	Время инкубации клеток с препаратом, мин	Инкубация клеток	
		без мейтония (контроль)	с мейтонием (опыт)
1	0	$7,39 \pm 0,83$ (n=5)	$7,92 \pm 2,04$ (n=4)
2	1	$10,17 \pm 2,1$ (n=6)	$7,3 \pm 0,57$ (n=5)
3	5	$8,36 \pm 0,99$ (n=5)	$6,89 \pm 0,4$ (n=5)
4	15	$7,75 \pm 0,77$ (n=5)	$8,45 \pm 1,04$ (n=5)
5	30	$7,57 \pm 0,73$ (n=6)	

Примечание. n — число проб; $P > 0,05$.

Приведенные в таблице тканевых базофилов с мейтоний ванных временных интервалов, держаия внутриклеточного

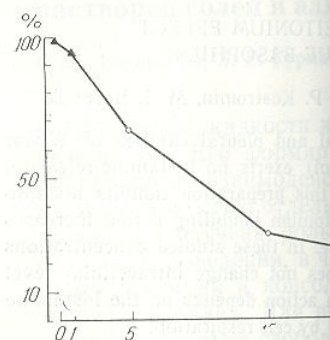


Рис. 2. Зависимость тормозящего действия мейтония от времени инкубации (то же, что и на рис. 1, б). Стрелка — введение в инкубационную среду вещества 48/80.

Рис. 3. Влияние глюкозы на тормозящее действие вещества 48/80:

1 — контроль (без мейтония и глюкозы), 2 — мейтоний (100 мкг/мл) и глюкозой (10 ммоль/л) инкубированы без исследуемого вещества 48/80. По оси абсцисс — концентрация гистамина.

концентрация цАМФ в клетках тканевых базофилов, что находит отражение в литературе [3, 5].

Обсуждение результатов

Полученные в работе результаты инкубационную среду в 30 мкг/мл гистамина из тканевых базофилов в 48/80. Постепенное нарастание его высвобождения в течение 15 минут, а также снятие его угнетающего действия на высвобождение гистамина, косвенным подтверждением является влияние на исходно высвобождающийся гистамин в последние минуты инкубации. Влияние гистамина на высвобождение гистамина из тканевых базофилов в них цАМФ в механизме секреции медиатора 48/80 имеется общий эндотелиальный комплекс IgE—антител

Выводы

1. Мейтоний в концентрациях до 500 мкг/мл не обладает гистаминвысвобождающими свойствами.

2. Ингибирующее действие мейтония на высвобождение гистамина зависит от наличия в среде

Приведенные в таблице результаты показывают, что инкубация тканевых базофилов с мейтонием (100 мкг/мл) в течение всех исследованных временных интервалов не вызывает достоверного изменения содержания внутриклеточного цАМФ по сравнению с контролем. Исходная

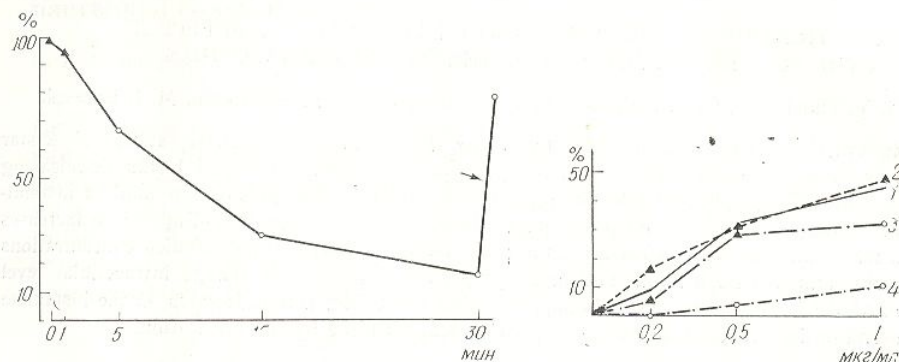


Рис. 2. Зависимость тормозящего действия мейтония от времени инкубации. По оси абсцисс — время инкубации (точка, соответствующая нулевой оси времени, представляет результаты, полученные после добавления к клеткам 5 мкл предварительно смешанного раствора мейтония и вещества 48/80), по оси ординат — высвобождение гистамина. Стрелка — введение в среду вещества 48/80 после отмывки клеток от мейтония.

Рис. 3. Влияние глюкозы на торможение мейтонием высвобождения гистамина, вызванного действием вещества 48/80:

1 — контроль (без мейтония и глюкозы), 2 — без мейтония с глюкозой (10 ммоль/л), 3 — с мейтонием (100 мкг/мл) и глюкозой (10 ммоль/л), 4 — с мейтонием (100 мкг/мл) без глюкозы. Клетки преинкубированы без исследуемых веществ или с ними в течение 30 мин, затем к ним добавляли вещество 48/80. По оси абсцисс — концентрация вещества 48/80, по оси ординат — высвобождение гистамина.

концентрация цАМФ в клетках составляет $(7,39 \pm 0,83)$ пмоль/ 10^5 тканевых базофилов, что находится в пределах значений, приводимых в литературе [3, 5].

Обсуждение результатов

Полученные в работе результаты показывают, что внесение мейтония в инкубационную среду в зависимости от дозы угнетает высвобождение гистамина из тканевых базофилов крыс, вызываемое действием вещества 48/80. Постепенное нарастание тормозящего влияния мейтония к 15-й минуте, а также снятие его глюкозой свидетельствуют о том, что оно зависит от вмешательства изучаемого препарата в энергозависимые этапы секреции гистамина, обеспечиваемые клеточным дыханием [3, 5]. Косвенным подтверждением этого служит неспособность препарата оказывать влияние на исходное содержание в клетках цАМФ. Как известно, последний вовлекается в анафилактическое высвобождение медиаторов на стадии клеточной активации [4, 7]. Взаимосвязь высвобождения гистамина из тканевых базофилов под влиянием вещества 48/80 и содержания в них цАМФ не обнаруживается [3, 4]. Вместе с тем, в механизме секреции медиатора клетками в ответ на антиген или вещество 48/80 имеется общий энергозависимый этап [4, 9], а мейтоний тормозит высвобождение гистамина, обусловленное действием вещества 48/80 и комплекса IgE—антитело—аллерген [8].

Выводы

1. Мейтоний в концентрациях 50—500 мкг/мл тормозит высвобождение гистамина, вызванное действием вещества 48/80, из тканевых базофилов крыс.
2. Ингибирующее действие мейтония развивается к 15-й минуте и зависит от наличия в среде глюкозы.

3. Мейтоний не изменяет внутриклеточное содержание цАМФ в тканевых базофилах крыс, а также не обладает гистаминвысвобождающими свойствами.

INVESTIGATION OF THE IMMUNOMODULATOR MEITONIUM EFFECT ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE RAT TISSUE BASOPHILS

S. V. Timchenko, O. F. Melnikov, S. V. Pokrovskaya, A. P. Kostromin, M. I. Borovok

In vitro experiments with tissue basophils of peritoneal and pleural cavities of Wistar rats have confirmed that meitonium (phenylimidazotiazol) exerts no histamine-releasing actions. Being applied in 50-500 µg/ml concentrations this preparation inhibits histamine release caused by 48/80 substance of these cells. Meitonium inhibiting action increases after 15 minutes and decreases in the presence of glucose. In these studied concentrations meitonium has no histamine-releasing properties and does not change intracellular level of cAMP in cell basophils. It is supposed that meitonium action depends on the histamine secretion influence on the energy-dependent stage, caused by cell respiration.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev
A. I. Kolomiichenko Institute of Otolaryngology,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev
T. G. Shevchenko University, Ministry of Higher
and Special Secondary Education of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Бирюкова Р. Н. Статистика в клинических исследованиях.— М.: Минздрав СССР, ЦОЛИУВ, 1964.—129 с.
2. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов.— Л.: Медицина, 1978.—294 с.
3. Гуцин И. С., Фредхольм Б., Увнас Б. Действие папаверина и простагландина Е₁ на вызванное веществом 48/80 высвобождение гистамина из тучных клеток крыс // Патол. физиология и эксперим. терапия.— 1975.— № 6.— С. 3—12.
4. Гуцин И. С. Немедленная аллергия клетки.— М.: Медицина, 1976.—176 с.
5. Гуцин И. С. Действие простагландина Е₁ и папаверина на анафилактическое высвобождение гистамина из тучных клеток // Патол. физиология и эксперим. терапия.— 1977.— № 1.— С. 32—35.
6. Гюллинг Э. В., Толмачев А. И., Романов Н. Н. и др. Разработка и изучение иммуномодуляторов типа фенилмидазотиазола // Тез. сообщ. Респ. конф. «Механизмы иммуностимуляции» (Киев, окт. 1985 г.).— Киев, 1985.— С. 62—63.
7. Лихтенштейн Л. М. Анафилактические реакции // Механизмы иммунопатологии.— М.: Медицина, 1983.— С. 23—29.
8. Тимченко С. В. Влияние иммуномодулятора мейтония на процесс дегрануляции тканевых базофилов крыс // Фармакология и токсикология.— 1986.— Вып. 21.— С. 79—81.
9. Увнас Б. Биохимический и фармакологический контроль аллергического высвобождения гистамина // Патол. физиология и эксперим. терапия.— 1976.— № 6.— С. 5—11.
10. А. с. 910636 СССР, МКИ³ С 07 Д 513/04, А 61 К 31/415, А 61 К 31/435. Бромид 2,3,5,6-тетрагидро-6-фенил-7-фенацелимидазо[2,1-в]тиазолия, проявляющий иммунорегулирующую активность / Э. В. Гюллинг, Л. А. Дюговская, А. В. Кирсанов и др.— Оpubл. 07.03.82, Бюл. № 9.
11. Holgate S. T., Benyon R. C., Howarth P. H. et al. Relationship between mediator release from human lung mast cells in vitro and in vivo // Int. Arch. Allerg. and Appl. Immunol.— 1985.—77.— P. 47—56.
12. Mirecka J., Czarnecki R., Cichocki T., Sabik J. Effect of the new theophylline derivatives on degranulation of mast cells and phosphodiesterase activity in smooth muscles // Arch. immunol. et ther. exp.— 1980.—28, N 3.— P. 515—523.
13. Vervloet D., Charpin J. Basophiles et mastocytes. Analogies et différences // Rev. franc. allergol. et immunol. clin.— 1980.—20, N 2.— P. 61—68.

Киев, ин-т эндокринологии и обмена веществ
М-ва здравоохранения УССР;
Киев, ин-т отоларингологии им. А. И. Колосовича
М-ва здравоохранения УССР;
Киев, ун-т им. Т. Г. Шевченко
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Поступила 30.06.87

УДК 591.131.1:133.14/15

Питьевое поведение в условиях свободнорастворов солей и ал

Н. Я. Головенко, Э. Г. Гурм

Потребление жидкостим актом. Его форми растворов во взаимодей ма и активностью отдел тально не изучена рол питьевого поведения, в ных популяций и консоческих условиях. Для лияции в условиях свобо раствора этанола [1, 6, ным собственным дейст

Целью настоящей ческих условий в проя левой приманки.

Методика

Опыты выполнены на крысах в силу отсутствия у них рвсовых качеств потребляемог группами в металлических к рационе со свободным досту ных лишали воды за 24 ч. 20×20×17 см с сетчатым м сов укрепляли в один ряд с разными растворами рассудобством подхода к поилке жидкости из каждой поилки между 11—15 ч.

В качестве жидкости д створы: NaCl, LiCl, HCl, KCl, Na₂SO₃, Na₂SO₄, NaH₂PO₄, 10 %-ный раствор этанола, п

Полученные результаты студента и Фишера

Результаты

Исследовали объем по концентрации. В отсут дистиллированной воды При предоставлении в водная вода (рН 8) суко возрастал — до (8,8 лось на водопрводную

В следующей серии группы животных: 1-я шиеся на гиперсолевом зерна. Крысам предост ных (10 ммоль/л) рас одновалентных катионс почитаем Na⁺. Так, соот 1-й группы, составляе