

[І. А. Безвершенко], Л. І. Онищенко, Л. М. Бикова,
М. Г. Бойко, А. Л. Синельникова

Участь тимоцитів у взаєминах між тимусом і гіпофізом

Изучено влияние тимуса на содержание гормона роста в гипофизе мышей. Обнаружено, что сингенный перенос тимоцитов молодых мышей тимектомизированным мышам ведет к увеличению содержания гормона роста в гипофизе. Одновременно с переносом тимоцитов введение гидрокортизона ускоряет увеличение, а введение только гидрокортизона тимектомизированным мышам не ведет к изменению содержания гормона роста в гипофизе. Повышенное содержание гормона роста в гипофизе мышей обнаруживалось, если сингенные тимоциты заменяли структурами, сливающимися с поверхности тимоцитов после их стимуляции олигопептидным гормоном тимуса, который способствует отделению некоторых рецепторов. Предполагается, что тимоциты могут стимулировать аккумуляцию гормона роста в гипофизе.

Вступ

Між тимусом і гіпофізом існують складні взаємини [3, 4, 8—10, 13]. З одного боку, гіпофізектомія зумовлює атрофію тимуса і помітне порушення імунореактивності, яке можна усунути введенням соматотропіну або екстрактів гіпофіза [3, 4, 8—10, 13, 14]. З іншого боку, тимектомія впливає на гіпофіз. Дані, принаймні ті, що торкаються впливу тимектомії на функцію гіпофіза, суперечливі. Згідно з Mogel і співавт. [9], неонатальна тимектомія, незважаючи на викликані нею морфологічні зміни у гіпофізі, не спричиняє зменшення концентрації соматотропіну у периферійній крові, але, згідно з Michael і співавт. [8], тимектомія, проведена у мишей-самців через 3 доб після народження, веде до зменшення вмісту гормону росту у крові уже дорослих тварин.

Між тим відомо, що припинення росту пов'язане з неонатальною тимектомією, усувається імплантацією сингенного тимуса, або сингенним переносом зрілих Т-лімфоцитів селезінки та лімфатичних вузлів. Таким чином, нема чіткого уявлення щодо причини усунення уповільнення росту після імплантації сингенного тимуса або після сингенного переносу лімфоцитів селезінки і лімфатичних вузлів неонатально тимектомованим мишам.

Оскільки сингенне перенесення зрілих Т-лімфоцитів є ефективним, можна припустити, що відновлення швидкості росту безпосередньо не потребує гормонів тимуса, але водночас відомо, що гормони тимуса (тимозин, фракція 5) можуть стимулювати секрецію соматотропіну *in vitro*, а стромальні елементи тимуса продукують чинники, які стимулюють функції аденогіпофіза, в тому числі соматотропіну [11, 12]. Не виключено також, що уповільнення росту, зумовлене тимектомією, залежить не від браку соматотропіну, а має іншу причину, але якщо введення лімфоцитів тимектомованим тваринам стимулює у них продукцію соматотропіну, можна вважати, що однією з причин відновлення росту є збільшення продукції соматотропіну. В цій роботі було досліджено вплив сингенного переносу інтактних тимоцитів і чинників, які відокремлюються від них під впливом гормону тимуса, на вміст соматотропіну у гіпофізі дорослих тимектомованих тварин.

Методика

Досліди виконані на дорослих молодих мишах лінії СВА масою 18—20 г, яких було тимектомовано загальноновживанням методом [5]. Після тимектомії мишей (самців) витримували 7—8 міс і використовували у

дослідах. Тимектомованим мишам після зазначеного терміну внутрішньовенно вводили 10^8 сингенних тимоцитів, одержаних від молодих мишей масою 16—18 г. Частину з цих тварин декапітували на першу, а частину — на третю доби після введення клітин. Частині тварин у день введення клітин ін'єктували внутрішньоочеревинно гідрокортизон (1 мг на мишу) з метою руйнування введених тимоцитів *in vivo* і дослідження впливу цього процесу на вміст соматотропіну у гіпофізі. За контроль правили тимектомовані миші, яким не вводили клітини; частині контрольних тварин ін'єктували гідрокортизон (1 мг на мишу), щоб дослідити, чи є опосередкований тимоцитами вплив гідрокортизону на вміст соматотропіну у гіпофізі. Вміст соматотропіну у відокремленому після декапітації тварин гіпофізі визначали за Lewis та співавт. [6]. Для дослідження об'єднували гіпофізи трьох мишей. Кількісну оцінку вмісту соматотропіну (частку соматотропіну серед інших білків гіпофізу, виражену у відсотках) здійснювали за допомогою денситометрії, використовуючи денситометричну приставку до спектрофотометра М-40 фірми «Carl Zeiss jena».

Поруч з цим було вивчено вплив відокремлюваних від тимоцитів структур, які злушуються з поверхні тимоцитів під впливом олігопептидного чинника тимуса [1]. Тимектомованим тваринам вводили структури, відокремлені від 10^8 тимоцитів. Інкубація тимоцитів за наявності чинника тривала 2 год, концентрація чинника в середовищі Хенкса складала 1 мкг/мг із розрахунку на 10^8 клітин. По закінченню інкубації надосадову рідину інкубували з імобілізованими IgG у нейтральному середовищі і елюювали розчином соляної кислоти (рН 2). Елюований матеріал ліофілізували, розчиняли в 0,2 мл дистильованої води, вводили мишам. Контрольним тваринам вводили структури, відокремлені від такої ж кількості тимоцитів, інкубованих без чинника. Спосіб одержання структур детально описано раніше [2]. Звільнення структур від олігопептидного чинника здійснювали за методом афінної хроматографії на імобілізованих IgG кроля, як описано раніше [2]. Групам тимектомованих тварин вводили препарати структур і досліджували вміст соматотропіну в гіпофізі через 10 хв, 1; 1,5; 3; 5 год, 1 і 2 доб після введення. Найбільше зростання вмісту соматотропіну в гіпофізі тимектомованих мишей спостерігалось наступної доби після введення структур. Тому переважну більшість досліджень виконано через 1 доб після введення структур.

Результати та їх обговорення

У табл. 1 наведено вміст соматотропіну в гіпофізі тимектомованих мишей після введення їм 10^8 тимоцитів; такої ж кількості тимоцитів з подальшим внутрішньоочеревинним ін'єктуванням гідрокортизону (1 мг/миша). На 1-у добу після введення 10^8 тимоцитів молодих мишей статистично істотної зміни вмісту соматотропіну в гіпофізі тимектомованих мишей не спостерігається, але на 3-ю добу після сингенного переносу спостерігається статистично істотне збільшення вмісту соматотропіну в гіпофізі. Якщо у тварин сингенне перенесення тимоцитів супроводжувалося ін'єктуванням гідрокортизону, статистично істотне збільшення вмісту досліджуваного гормону в гіпофізі (у порівнянні з таким у контрольних тварин) спостерігалось уже на 1-у добу після введення тимоцитів. Статистично істотно збільшена частка соматотропіну в гіпофізі на 1-у добу після введення цього гормону спостерігалась також і на 3-ю добу після сингенного перенесення тимоцитів. Введення такої ж дози гідрокортизону тимектомованим мишам без сингенного перенесення тимоцитів не викликало збільшення вмісту соматотропіну в гіпофізі, принаймні на 1-у добу після введення гідрокортизону.

Таким чином, сингенне перенесення тимоцитів тимектомованим мишам впливає на вміст соматотропіну в гіпофізі. Ін'єктування гідрокортизону прискорює набуття гіпофізом дещо підвищеного вмісту соматотропіну. Оскільки гідрокортизон у тимектомованих мишей не збільшує

вміст соматотропіну в гіпофізі на 1-у добу після його ін'єкції (якщо водночас не вводили тимоцити молодих мишей), є підстави вважати, що вплив гідрокортизону, який спостерігався у випадку введення тимоцитів, опосередкований саме тимоцитами.

Під впливом гідрокортизону частина тимоцитів руйнується, тому цілком ймовірно, що підвищення вмісту соматотропіну вже на 1-у добу після введення тимоцитів зумовлене відокремлюванням від тимоцитів певних структур. Ми дослідили це питання за допомогою олігопептидного чинника, під впливом якого незрілі тимоцити втрачають рецептори для аутологічних еритроцитів. Показано, що втрата рецепторів для аутологічних еритроцитів під впливом олігопептидного чинника відбувається шляхом їх злуцування [2]. Введення відокремлених від 10^8 тимоцитів під впливом олігопептидного чинника структур веде до збільшення вмісту соматотропіну у гіпофізі. З 10^8 тимоцитів, інкубованих без олігопептидного чинника, очевидно, злуцуються дещо інші структури, оскільки введення еквівалентних і за кількістю структур (тобто одержаних з 10^8 тимоцитів) не викликає збільшення вмісту соматотропіну в гіпофізі (табл. 2). Можливо, що різниця між дією адсорбованих

Таблиця 1. Відносний вміст соматотропіну в гіпофізі тимектомованих мишей під впливом сингенного переносу до них тимоцитів, % від кількості усіх білків

Умови експерименту	Порядковий номер досліджу							
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й
Тимектомія (контроль I)	23,7	35,2	35,4	15,2	27,6	23,3	21,7	28,0
Тимектомія та введення гідрокортизону (контроль II)	20,9	31,5	26,5	14,2	26,6	24,2	22,3	20,4
Тимектомія та введення сингенних тимоцитів через 1 доб після введення	20,6	20,9	31,3	26,2	33,1	35,2	39,9	26,3
через 3 доб після введення	29,1	43,2	37,8	32,7	35,8	33,4	36,2	27,2
Тимектомія, введення сингенних тимоцитів і гідрокортизону через 1 доб після введення	39,0	30,0	34,7	37,6	44,5	41,7	54,9	25,5
через 3 доб після введення	22,9	39,9	38,0	28,0	51,5	32,6	50,7	23,3

Примітка. Різниця між результатами обох контролей і вмістом соматотропіну на 3-ю добу після переносу і між результатами обох контролей і вмістом соматотропіну на 1-у та 3-ю добу статистично вірогідна ($P < 0,05$; метод непрямих різниць).

Таблиця 2. Відносний вміст соматотропіну в гіпофізі тимектомованих мишей під впливом внутрішньовенного введення рецепторних структур, відокремлених тимоцитами, % від кількості усіх білків

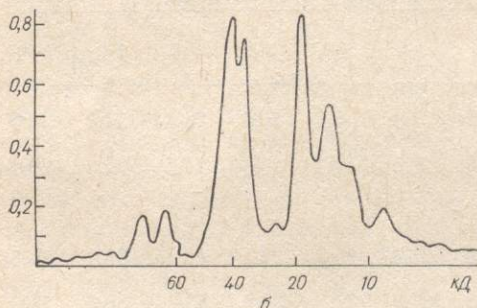
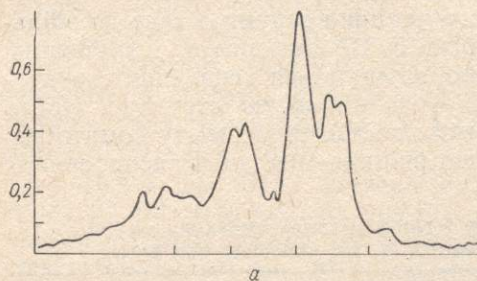
Умови експерименту	Порядковий номер досліджу					
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й
Тимектомія (контроль I)	27,8	24,4	25,2	29,7	23,1	23,1
Тимектомія та введення рецепторних структур, відокремлених без впливу чинника (контроль II)	21,8	30,2	25,9	29,2	22,4	22,4
Тимектомія та введення рецепторних структур, відокремлених під впливом олігопептидного чинника	46,0	35,5	29,1	39,4	27,4	28,7

Примітка. Різниця між результатами досліджу і обома контролями статистично вірогідна ($P < 0,02$; метод непрямих різниць).

на IgG структур, одержаних під впливом олігопептидного чинника і одержаних без чинника, лише кількісна. З іншого боку, структури, які відокремлюються від активованих чинником тимоцитів і не адсорбуються на IgG, не впливають на вміст соматотропіну у гіпофізі.

Електрофоретичні дослідження відокремлюваної від тимоцитів структури показують гетерогенність елюйованого з імобілізованого IgG матеріалу. Електрофорез в 10 %-вому поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію дозволяє визначити 6 компонентів з молекулярною масою 78, 67—71, 58—60, 48—54, 38—44, 36—41 кД. Відновлення матеріалу β -меркаптоетанолом веде до кількісного збільшення

од. екст.



компонентів з меншою молекулярною масою. Якщо використовується 10 %-вий гель, в присутності β -меркаптоетанолу кількість фракцій з молекулярною масою менше за 40 кД у структур, одержаних від контрольних клітин, збільшується з 41 % до 61 %, а у структур, одержаних від дослідних (стимульованих), — з 48 % до 53 %. Це свідчить про те, що у складі цих структур містяться білки, які складаються принаймні з двох поліпептидних ланцюгів, сполучених дисульфід-

Денситограма електрофорезу в 20 %-вому поліакриламідному гелі за наявності β -меркаптоетанолу структур, відокремлюваних від тимоцитів миші під впливом олігопептидного чинника тимусу (а) і без нього (б). За віссю абсцис — молекулярна маса, кД; за віссю ординат — екстинкція при 606 нм.

ними зв'язками. Це є характерним для маркерних білків і рецепторів Т-лімфоцитів. Порівняння денситограми структур, одержаних від контрольних клітин, з денситограмою структур, одержаних від стимульованих клітин, показує, що структури якісно не відрізняються принаймні за молекулярною масою компонентів, які складають їх. Можливо, що йдеться лише про кількісні відмінності (малюнок), але не виключена наявність якісних відмінностей між білками контролю і досліді, які мають однакову молекулярну масу. Дослідження у 20 %-вому поліакриламідному гелі дозволяють виявити додаткові смуги з молекулярною масою 17—22 кД. За молекулярною масою вони відповідають антигену Thy-1 , і α - β -ТСР (антигенний рецептор Т-клітин).

Збільшення вмісту соматотропіну у гіпофізі тимектомованих мишей після введення сингенних тимоцитів свідчить про те, що вплив тимусу на соматотропну функцію гіпофізу може бути опосередкований саме клітинами. Можна припустити, що вплив тимоцитів на гіпофіз зумовлений структурами, які відокремлюються від тимоцитів. Про це свідчить прискорення дії тимоцитів під впливом гідрокортизону, який їх руйнує, і підтверджується аналогічною дією структур, відокремлюваних від тимоцитів під впливом олігопептидного чинника. Збільшення продукції соматотропіну в гіпофізі спостерігається після введення кахектину та інтерлейкіну I, які продукуються макрофагами [7]. На тій моделі, яку використано у цій роботі, вплив макрофагів і продукуваних ними чинників не мав істотного значення в зв'язку з тим, що тимектомія не усуває популяції макрофагів, які існують поза тимусом, і введення гідрокортизону тимектомованим мишам не впливає на вміст соматотропіну у гіпофізі.

PARTICIPATION OF THYMOCYTES IN THE THYMUS AND HYPOPHYSIS INTERRELATIONSHIP

The influence of the thymus on the growth hormone (GH) level in the mouse hypophysis has been studied. It has been found, that syngeneic transfer of thymocytes of young mice into thymectomized mice causes on increase of the growth hormone level in the hypophysis. Administration of hydrocortisone simultaneously with transfer of thymocytes accelerated the GH level increase. The administration of only hydrocortisone into thymectomized mice does not lead to changes in the GH level. The increased GH level was observed when thymocytes were replaced by some structures shedding from thymocytes after their stimulation with short peptide thymic hormone. It is supposed that thymocytes can stimulate GH accumulation in the hypophysis.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Безвершенко І. А., Кравчук Г. П. Використання імібілізованих еуглобулінів для одержання низькомолекулярного чинника тимуса, прискорюючого диференціювання Т-лімфоцитів // Докл. АН УРСР.— Сер. Б.— 1979.— № 5.— С. 369—372.
2. Безвершенко І. А., Синельникова А. Л., Быкова Л. М., Бойко М. Г. Отделение рецепторов тимодитов мыши к аутологичным эритроцитам под влиянием олигопептидного фактора тимуса // Иммунология.— 1988.— № 6.— С. 26—28.
3. Миллер Д., Дукор П. Биология тимуса.— М.: Мир, 1967.— 112 с.
4. Труфакин В. А. Иммуноморфологические аспекты аутоиммунных процессов.— Новосибирск, 1983.— 177 с.
5. Haimovitch M., Wang D., Burrow S. L., Klark H. E. Thymectomy in the adult mouse // Transplantation.— 1971.— 11.— P. 100—102.
6. Lewis U. S., Liharia M., Cheerer E. V. Growth hormone and prolactin components of disc-electrophoretic patterns: quantitative determination of the amount of protein in a stained band // Endocrinology.— 1969.— 85, N 4.— P. 690—697.
7. McCann S. M., Rettori V., Milonkovic L. P. et al. Role of monokines in control of anterior pituitary hormone release // Adv. Exp. and Med. Biol.— 1990.— 274, N 20.— P. 315—320.
8. Michael S. D., Taguchi O., Nishizuka V. Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in mice // Biol. Reprod.— 1980.— 22.— P. 343—350.
9. Morel G., Deschaux P., Claustat B., Fontanges R. Etude des modifications quantitatives des cellules somatotropes hypophysaires de rat apres thymectomie. Action apotherapique de substitution a l'aide d'un extrait thymique // Experientia.— 1978.— 34, N 11.— P. 1525—1527.
10. Nagy E., Berczi I., Friesen H. G. Regulation of immunity in rats lactogenic and growth hormones // Acta Endocrinol.— 1983.— 102, N 3.— P. 351—357.
11. Spangelo B. L., Judd A. M., Ross P. C. et al. Thymosin fraction 5 stimulates prolactin and growth hormone release from anterior pituitary cells in vitro // Endocrinology.— 1987.— 121, N 6.— P. 2035—2043.
12. Spangelo B. L., Ross P. C., Judd A. M., MacLeod R. M. Thymus stromal elements contain an anterior pituitary hormone-stimulating activity. // J. Neuroimmun.— 1989.— 25.— P. 37—46.
13. Talwar G. P., Hanjan S. N. S., Kidway Z. et al. Growth hormone action on thymus and lymphoid cells. Growth hormone and related peptides // Excerpta Medica.— 1976.— P. 104—105.
14. Talwar G. P. Growth hormone and immune response // Proc. Indian. Nat. Sci. Acad.— 1979.— 45, B, N 2.— P. 97—114.

Київ. наук.-дослід. ін-т
ендокринології та обміну речовин
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 25.06.92