

21. Kaouadji M.N., Jore D., Ferradini C. Radiolytic scanning of vitamin E — vitamin C oxidation-reduction mechanisms // Bioelectrochem. and Bioenerg. — 1987. — 18, № 1. — P. 59—70.
22. Kim R.S., LaBella F. Comparison of analytical methods for monitoring autooxidation profiles of authentic lipids // J. Lipid Res. — 1987. — 28, № 5. — P. 1110—1117.
23. Salmon J.A. Role of arachidonic acid metabolites in inflammatory and thrombotic responses // Biochem. Soc. Trans. — 1987. — 15, № 3. — P. 324—326.
24. Starnes J.W., Cantu G., Farrar R.P., Kehrer G.P. Skeletal muscle lipid peroxidation in exercised and food-restricted rats during aging // J. Appl. Physiol. — 1989. — 67, № 11. — P. 69—72.
25. Wendel A. Measurement of in vivo peroxidation and toxicological significance // Free Radical Biol. and Med. — 1987. — 3, № 1. — P. 355—358.

Харків. ун-т
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 03.04.93

УДК 615.411.36:612.438.4]:616-096

Б.В.Олійник, Л.В.Богданович, М.Г.Журавський

Роль небілкового чинника спленіну в регуляції антитілогенезу

Небелковый фактор спленина, обладающий Т-митогенной активностью, воспроизводит в эксперименте иммуномодулирующее действие нативного препарата в плане регуляции синтеза иммуноглобулинов. Премедикация мышей линии СВА фактором на 64 % усиливает первичный иммунный ответ на эритроциты барана. При развитии аллергической реакции немедленного типа у крыс линии Вистар и мышей линии BALB/c фактор угнетает продукцию IgE-антител посредством стимуляции Т-клеток-супрессоров.

Вступ

Виділений з спленіну небілковий чинник проявляє виражену тропність до Т-лімфоцитів, стимулюючи їх розмноження у лімфоїдних органах та в культурі клітин [10, 11]. Активація Т-лімфоцитів мітогенами викликає зміни їх кількісного і якісного складу, що призводить до певної специфічної спрямованості в регуляції антитілоутворення [13]. Вивчення ролі виділеного з спленіну мітогену в регуляції антитілогенезу сприятиме розкриттю механізму дії препарату, з'ясування сфери показань для його застосування та остаточного визначення природи його активного чинника.

Мета нашої роботи — дослідження впливу небілкового чинника спленіну на формування гуморальної імунної відповіді на прикладі синтезу імунoglobulinів класів G та E на тимусзалежні антигени.

Методика

IgG-антитілогенез досліджували на трьох групах мишей-самців лінії СВА 8—10-тижневого віку. Тваринам 1-ї групи протягом 3 діб внутрішньовенно вводили небілковий чинник спленіну (НЧС) по 10 мкг на тварину, розведеного 0,3 мл фізіологічного розчину. Контрольним — тваринам 2-ї й 3-ї груп вводили еквівалентний об'єм розчинника. Через 6 діб після останнього

введення препарату мишей 1-ї та 2-ї груп внутрішньовенно імунізували 20 %-вою суспензією еритроцитів барана (ЕБ) по 0,2 мл на тварину. На 5-у добу після імунізації тварин декапітували і визначали вміст антитілоутворюючих клітин в селезінці за їх здатністю викликати лізис ЕБ [18] і виражали в показниках оптичної густини при спектрометричному вимірюванні при 413 нм. У мишей 3-ї групи визначали спонтанний гемоліз еритроцитів.

Синтез IgE-антитіл досліджували на моделях алергії негайного типу на 3 групах 10—12-тижневих щурів-самців лінії Вістар та на 4 групах мишей лінії BALB/c такого ж віку і статі. У щурів 2-ї — 4-ї груп локальну продукцію IgE-антитіл в органах дихання індукували стандартним екстрактом пилку амброзії, який містив 10 000 PNU/см³, надісланим нам із Ставропольського НДІ вакцин і сироваток. Екстракт (0:05 мл/тварина) наносили на слизову оболонку носа тварин, яким двічі з інтервалом 40 хв зрошували носові ходи 0,05 мл 0,1 %-вого розчину ліофілізованого спленіну або ж його небілкового чинника. Тваринам 1-ї та 4-ї контрольних груп за аналогічною схемою вводили фізіологічний розчин. Вміст IgE-антитіл в гомогенатах органів дихання визначали через 48 год після сенсibiлізації в реакції дегрануляції базофілів перитоніального ексудату щурів [4]. Загальної алергізації мишей досягали дворазовим через 21 добу внутрішньочеревинним введенням 5 мкг очищеного аскаридного білка, або ж овальбуміну (фірма «Sigma», США) в комплексі з 5 мг свіжовиготовленого гідрооксиду алюмінію.

Вміст циркулюючих IgE-антитіл в сироватці крові мишей визначали у щурів в реакції пасивної анафілаксії шкіри через 24 год після внутрішньошкірного введення в ділянці спини по 0,05 мл досліджуваних розведених сироваток [19]. Вирішальну дозу алергену (2 мг/тварина) вводили внутрішньовенно в розчині з 0,5 %-вою синькою Еванса (фірма «Reanal», Угорщина). Позитивними вважали такі розведення сироватки, які в шкірі після введення вирішальної дози алергену давали пляму діаметром 5 мм і більше. Тимоцити від мишей лінії BALB/c для трансплантації сингенним тваринам одержували за асептичних умов диспергуванням тимуса у слабо притертому гомогенізаторі в середовищі 199, фільтрували через нейлонову сітку, двічі відмивали цим же розчином і готували суспензію, що містила 10⁶ клітин в 1 мм. Суспензію інкубували в НЧС із розрахунку 1 мкг на 10⁶ клітин. Потім клітини двічі відмивали середовищем 199, 2·10⁷ тимоцитів, інкубованих з чинником і без нього, розводили 0,2 мл середовища і вводили в хвостову вену сенсibiлізованим тваринам. Через 5 діб досліджували вміст IgE-антитіл у периферичній крові. Результати обробляли статистично з використанням критерію t Стюдента.

Результати та їх обговорення

Наведені в табл. 1 результати свідчать про те, що НЧС, який є Т-клітинним мітогеном [10, 11], призводить до суттєвого збільшення сумарного числа клітин у селезінці. За своєю дією це значно перевищує стимуляцію, індуковану самим антигеном, та забезпечує формування антитілоутворюючих клітин. Так, у дослідних тварин показник формування антитілоутворюючих клітин в селезінці зростає на 64 % і своєю спрямованістю відтворює дію нативного препарату [6, 14]. Ймовірно, що НЧС стимулює не тільки мітотичну активність Т-лімфоцитів, але й сприяє диференціюванню останніх [3] з подальшим набуттям ними хелперної активності і тим самим сприяє акти-

вації гуморальної відповіді на антиген [13]. Не виключена можливість прямого впливу чинника на В-лімфоцити.

Таблиця 1. Стимуляція мітотичної активності та IgG-продукуючої активності клітин селезінки мишей лінії СВА небілковим чинником спленіну (НЧС)

Показник	Імунізація						Введення фізіологічного розчину (контроль) — 3-я група тварин	
	та введення НЧС (30 мкг) — 1-а група тварин			та введення фізіологічного розчину — 2-а група тварин				
	n	M±m	P1-2	n	M±m	P2-3	n	M±m
Число клітин у селезінці, 1	17	10,11±0,25·10 ⁷	<0,001	17	7,88±0,16·10 ⁷	<0,001	16	6,57±0,11·10 ⁷
Оптична густина еритроцитів, ум. од.	17	0,249±0,016	<0,001	17	0,15±0,007	<0,001	16	0,007±0,0005

При розвитку алергічних реакцій негайного типу, обумовлених утворенням IgE-антитіл, також виявлено імунорегулюючий вплив НЧС. Так, у серії дослідів на моделі алергії з локальною продукцією IgE-антитіл в органах дихання щурів (табл. 2) порівняльне дослідження впливу спленіну і виділеного з нього небілкового чинника не дало однозначних результатів.

Таблиця 2. IgE-антитілоутворення в органах дихання сенсibilізованих щурів (за відносною деградуляцією базофілів в гомогенатах слизової оболонки, %) під впливом ліофілізованого спленіну та його небілкового чинника (НЧС)

Досліджувані органи	Введення НЧС (0,1 %-вий розчин) — 1-а група тварин			Введення ліофілізованого спленіну (1 %-вий розчин) — 2-а група тварин			Введення фізіологічного розчину (контроль) — 3-я група тварин	
	n	M±m	P1-2	n	M±m	P2-3	n	M±m
Ніс	23	3,3±0,34	<0,01	17	7,0±1,1	>0,5	21	7,2±1,24
Трахея	23	4,3±0,44	<0,0001	17	10,7±1,3	>0,5	21	11,3±1,58
Легені	23	3,0±0,34	<0,001	17	10,2±1,1	>0,5	21	10,0±1,22

Якщо премедикація розчином НЧС виразно пригнічувала розвиток алергічної реакції, то за аналогічних умов розчин ліофілізованого спленіну виявився не-ефективним, хоча відомо, що спленін відноситься до протиалергічних засобів [7]. Цей парадоксальний факт, мабуть, обумовлений низьким вмістом активної речовини в ліофілізованому препараті спленіну, або ж, що більш ймовірно, поганою резорбцією його слизовими оболонками органів дихання у зв'язку з високим вмістом ліпідів [9]. Адже відомо, що терапевтична ефективність спленіну при вазомоторних ринітах досягається ендоназальними ін'єкціями, або ж ультразвуковим фонофорезом препарату [7].

Протиалергічна дія НЧС виявлена і при загальній сенсibilізації тварин з індукцією високого рівня циркулюючих IgE-антитіл у крові. Як свідчать результати, наведені в табл. 3, пригнічуюча дія чинника на синтез IgE-антитіл залежить від термінів введення його дослідним тваринам. Найвищого ефекту було досягнуто у тварин першої групи, які протягом 3 діб перед введенням алергену одержували НЧС. Введення чинника мишам в день сенсibilізації та в наступні 2 доби пригнічує продукцію IgE-антитіл в 5,5 разів. А в групі тварин, що одержували чинник через 3 доби після сенсibilізації, рівень IgE в крові прирівнювався до такого контрольних тварин. Однак, зважаючи на рівень IgE-антитіл в крові на 14-у та 21-у доби

Таблиця 3. Зміна титру IgE-антитіл у крові сенсibilізованих мишей лінії BALB/c у залежності від терміну введення тваринам небілкових чинників, виділених з脾еніну та вілозену (НЧС та НЧВ відповідно)

Час дослідження алергічної реакції	Чинник вводили до сенсibilізації за 3 доби — 1-а група тварин			Чинник вводили одночасно із сенсibilізацією — 2-а група тварин			Чинник вводили після сенсibilізації через 3 доби — 3-я група тварин			Чинник не вводили (контроль) — 4-а група тварин	
	n	M±m	P1-4	n	M±m	P2-4	n	M±m	P3-4	n	M±m
НЧС											
14-а доба	12	76,0±44,0	<0,001	12	78,0±42,0	<0,001	12	38,0±48,1	>0,5	9	43,0±56,0
21-а доба	12	8,0±12,8	—	12	12,0±16,8	—	12	54,0±27,8	—	9	26,0±26,0
НЧВ											
14-а доба	9	64,4±11,4	<0,001	8	57,5±12,8	<0,001	8	387,5±19,9	>0,05	8	362±46,4
21-а доба	9	17,7±59	<0,05	8	22,5±22,9	>0,05	8	67,5±13,6	>0,25	8	45,0±13,4

після сенсibilізації, можна припустити, що розвиток алергічної реакції у цій групі тварин дещо запізнювався.

В аналогічному експерименті на мишах лінії DFLD/c подібні результати були одержані при введенні сенсibilізованим тваринам небілкового чинника вілогену (НЧВ, див. табл. 3). Останній за методом одержання, фізико-хімічними характеристиками та мітогенною активністю аналогічний НЧС [1].

Реалізація протиалергічної дії НЧС, як вважають, може проходити двома шляхами — безпосереднім впливом на продукуючі IgE-антитіла плазматичні клітини або ж через індукцію Т-клітин-супресорів, що пригнічують синтез імуноглобулінів цього класу. З метою перевірки першого припущення було досліджено вплив НЧС на IgE-антитілогенез на піку активності алергічної реакції негайного типу. Ми виходили з відомого факту, що період піврозпаду IgE-антитіл у сироватці крові складає 2—5 діб [2]. У такому разі за умов гальмівного впливу чинника на IgE-синтезуючі клітини рівень IgE в периферичній крові повинен суттєво знизитися. Однак, як виявилось, введення сенсibilізованим мишам на піку алергічної реакції НЧС не впливало на титр IgE-антитіл в периферичній крові. Так, якщо вихідний рівень IgE-антитіл у сенсibilізованих мишей складав 441,0±28,4 у дослідній групі та 454,5±24,8 — у контрольній, то на 7-у добу після триразового введення НЧС їх титр дорівнював 383,0±29,5 та 409,0±31,6 відповідно. Таким чином, є підстави стверджувати, що досліджуваний чинник не впливає на IgE-синтезуючі клітини в продуктивну фазу антитілоутворення.

Ймовірність утворення під впливом чинника Т-клітин-супресорів, що пригнічують синтез IgE-антитіл, була доведена в дослідях з перенесенням сенсibilізованим тваринам сингенних тимоцитів, активованих *in vitro* НЧС (табл. 4). Показано, що трансплантація сенсibilізованим аскаридним антигеном мишам активованих чинником тимоцитів ($2 \cdot 10^7$) у 8 разів знижує продукцію IgE-антитіл. Ефективність інтактних сингенних тимоцитів за аналогічних умов була втричі нижчою і, вірогідно, забезпечувалася тими 25 % сумарної популяції клітин тимуса, які складають неспецифічні Т-супресори [17]. Це дає підстави стверджувати, що НЧС впливає саме на Т-лімфоцити, індукуючи утворення Т-супресорів. Останні, очевидно, впливають на плазматичні клітини, які продукують IgE-антитіла. Утворення Т-супресорів при стимуляції НЧС, ймовірно, є наслідком його Т-мітогенної активності. Ця активність чинника до Т-лімфоцитів, згідно наших досліджень, проявляється в

Таблиця 4. Зміна титру IgE-антитіл у крові сенсibilізованих мишей лінії BALB/c під впливом трансплантації інтактних та активованих *in vitro* небілковим чинником спленіну (НЧС) сингенних тимоцитів

Час дослідження алергічної реакції	Сенсибілізація (контроль) — 1-а група тварин		Сенсибілізація та трансплантація					
			інтактних тимоцитів ($2 \cdot 10^7$) — 2-а група тварин			активованих тимоцитів ($2 \cdot 10^7$) — 3-я група тварин		
	n	M±m	n	M±m	P1-2	n	M±m	P1-3
До введення тимоцитів	10	420,0±71,7	12	400,0±52,3	—	12	416,0±61,0	—
Після введення тимоцитів (через 5 діб)	10	430,0±90,7	12	145,8±64,4	<0,002	12	51,7±50,1	<0,001

тимусі і селезінці [10, 11]. Взаємозв'язок проліферації Т-лімфоцитів і утворення супресорів переконливо доведений на прикладі стимуляції Т-клітин рослинними мітогенами [12, 15, 16], а також деякими синтетичними препаратами [4, 5]. Очищені пептидні препарати тимуса із слабкою Т-мітогенною активністю не чинять суттєвого впливу на синтез IgE-антитіл [8].

Переважа НЧС як протиалергічного засобу в порівнянні з поліпептидними чинниками тимуса полягає в тому, що він має вищу біологічну активність, а за хімічною природою не належить до потенціальних алергенів. Окремо слід зазначити, що чинник в дозах, які пригнічують IgE-антитілогенез, стимулює утворення IgE.

Таким чином, виділений з спленіну небілковий мітоген нуклеозидної природи здійснює властиву для офіціального препарату імуномодуляторну функцію, що виражається стимуляцією синтезу IgG та пригніченням IgE-антитілогенезу, і є перспективним для самостійного використання.

B.V.Olejnik, L.V.Bogdanovich, N.I.Zhuravsky

ROLE OF NON-PROTEIN FACTOR OF SPLENIN IN REGULATION OF ANTIBODY GENESIS

Non-protein factor of splenin that possesses T-mitogen activity under experimental conditions reproduces immunomodulatory action of the native drug in what concerns regulation of immunoglobulin synthesis. Premedication of CBA mice with the isolated factor increases primary immune response to ram erythrocytes by 64 %. When immediate allergic reaction develops in Wistar rats and BALB/c mice this factor suppresses IgE-antibody production via stimulation of suppressors T-cells.

Ukrainian Research Institute
of Endocrinology and Metabolism, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Безверщенко И.А. Выделение из тимуса и некоторые свойства неполипептидного фактора, увеличивающего количество тимоцитов *in vivo* // Докл. АН СССР. — 1978. — 238, № 3. — С. 752—754.
2. Бережная Н.М., Ялкуп С.И. Биологическая роль иммуноглобулина Е. — К.: Наук. думка, 1983. — 136 с.
3. Валуева Т.К., Лукашова Р.Г., Факторович Е.Я. Индукция Thy-1 антигена на претимических предшественниках Т-клеток под воздействием тимозина ЛСВ левамизола и спленина // Иммунология, аллергология. — 1983. — Вып. 17. — С. 17—18.
4. Гюллинг Э.В., Дюговская Л.А. Угнетение синтеза реактинов в органах дыхания при местном применении некоторых лимфоцитотропных веществ // Докл. АН УССР, Сер. Б. — 1980. — № 1. — С. 72—73.
5. Гюллинг Э.В., Толмачев А.И., Романов А.Н. и др. Разработка и изучение иммуномодуляторов типа фенилимидазотиазола // Механизмы иммуностимуляции. — К., 1985. — С. 62—63.

6. Дяченко С.С., Караванская Н.А. Экспериментальное исследование клеточных иммунных реакций при введении спленина // Иммунология. — 1974. — Вып. 7. — С. 26—29.
7. Захарова А.Ф., Митрохина Н.И., Плотникова Н.Е. и др. Лечение спленином вазомоторного и аллергического ринита у детей // Сов. медицина. — 1976. — № 7. — С. 108—111.
8. Лопухин Ю.М., Арион В.Я. Иммунокорректирующая терапия пептидами тимуса // Профилактика, диагностика и лечение аутоиммунных заболеваний и вторичных иммунодефицитов. — Новосибирск, 1985. — С. 120—121.
9. Нечаева Е.В. Изучение химического состава и биологической активности препарата <спленин>: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — К., 1989. — 40 с.
10. Олейник Б.В. Регуляция биологической функции Т-лимфоцитов небелковым фактором лимфоидной ткани: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — К., 1989. — 40 с.
11. Олейник Б.В., Комиссаренко В.П., Безверченко И.А. Небелковый фактор спленина // Докл. АН УССР, Сер. Б. — 1985. — № 6. — С. 70—72.
12. Петров Р.В., Ковальчук Л.В., Павлюк А.С. Лимфоциты-супрессоры периферической крови: Индукция митогенами // Кримоконсервирование иммунокомпетентной ткани. — К., 1979. — С. 47—49.
13. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М., Михайлова А.Л. Контроль и регуляция иммунного ответа. — Л.: Медицина, 1981. — 311 с.
14. Чеботарев В.Ф., Ермакова Н.И., Антоненко А.В., Валуева Т.К. К вопросу о механизме действия биологически активных препаратов тимуса и селезенки на первичный и вторичный гуморальный ответ // Физиол. журн. — 1982. — № 4. — С. 496—498.
15. Armistead J.G., Evan P.V. Concanavalin A-induced suppressor cells // J.Clin. and Lab. Immunol. — 1984. — 13. — P. 1—10.
16. Astorquiza M.I., Sayago S. Modulation of IgE-response by phytohemagglutinin // Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol. — 1984. — № 4. — P. 367—369.
17. Basten A., Miller T.F., Warner N.L. et al. A subpopulation of T-cells bearing Fc-receptor // J. Immunol. — 1975. — 115. — P. 1159—1165.
18. Simpson M.A., Gozzo S.S. Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cells hemolysis // J. Immunol. Methods. — 1978. — 21. — P. 159—165.
19. Watanabe N., Ovary Z. Antigen and antibody detection by in vivo methods: a reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reaction // Ibid. — 1977. — 14. — P. 381—390.

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

Матеріал надійшов
до редакції 26.07.93