

Природа активного чинника спленіну та механізм його дії

На основі обнаруженого лимфоцитотропного свойства спленина проведен поиск биологически активных химических соединений препарата. Осаждением ионами ртути из спленина выделен небелковый фактор нуклеозидной природы с выраженным прямым митогенным действием на Т-лимфоциты селезенки и тимуса, который считается активным началом препарата. Фактор увеличивает массу лимфоидных органов, способствует восстановлению лимфоцитопозза при экспериментальных послерадиационной и стероидогенной лимфоцитопениях.

Вступ

Серед вітчизняних імуномодуляторів особливе місце посідає препарат спленін, одержаний із селезінки на основі екстракції дихлоретаном [9]. Багаторічні експериментальні дослідження і клінічні спостереження підтвердили широкий спектр біологічної і терапевтичної дії препарату [3]. Але фармакологічні та клінічні дослідження спленіну значно випередили вивчення його хімічної природи. Ідентифіковані дотепер із спленіну хімічні сполуки не відтворюють біологічної активності нативного препарату. Це свідчить про те, що природа активного початку спленіну залишається невідомою. Започатковані нами дослідження спрямовані на заповнення цієї прогалини у вивченні спленіну.

Методика

У дослідях використовували 8—10-тижневих щурів-самців лінії Вістар та такого ж віку мишей СВА і BALB/с. Питому масу лімфоїдних органів визначали гравіметрично і виражали в міліграмах органу на 10—100 грамів маси тіла тварин (мг/10-100 г). Клітини виділяли шляхом гомогенізації досліджуваних органів у середовищі 199. Еритроцити в осаді клітин руйнували в 0,17 М розчині хлористого амонію (0,17 моль/л), а лімфоїдні клітини двічі відмивали середовищем 199 і суспензували у вищезгаданому середовищі. Підрахунок клітин здійснювали в камері Горяєва. Мітотичну активність тимоцитів і спленоцитів під впливом чинника визначали за інтенсивністю синтезу ДНК, яку в свою чергу визначали за швидкістю включення в клітини ^3H -тимідину. Для цього в стерильні пластикові плати («Медполімер», С.-Петербург) вносили по $2 \cdot 10^6$ клітин в 0,2 мл середовища 199 і додавали 0,05 мл радіонукліду (активність 37 кБк). Проби інкубували при 37 °С протягом 4-х год. Вміст лунок переносили на просочені 5 %-вою трихлороцтовою кислотою (ТХО) міліпорові фільтри. Останні спочатку двічі промивали холодною ТХО, а потім етанолом. Висушені фільтри з біоматеріалом переносили у флакони із сцинтиляційною рідиною марки СР-8. На спектрометрі «Mark-III» (Голландія) підраховували радіоактивність 10^6 клітин, яку виражали в беккерель.

Культивування спленоцитів інтактних мишей СВА здійснювали в середовищі RPMI 1640, яке містило 5 % інактивованої сироватки ембріонів те-

лят, 20 ммоль І-глутаміну, $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л меркаптостанолу, 100 од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Суспензію клітин в об'ємі 0,2 мл вносили в лунки планшетів для імунологічних досліджень, додавали досліджуваній чинник в різних кількостях і культивували 72 год при 37 °С у зволоженої атмосфері, яка містила 10 % CO₂ і 90 % кімнатного повітря. За 4 год до закінчення інкубації в лунки з культурою додавали ³Н-тимідин (37 кБк). Суспензію клітин із лунок переносили на міліпорові фільтри і підраховували радіоактивність за допомогою лічильника, використовуючи стінтиляційну рідину.

Пригнічення функції лімфоїдної системи у мишей здійснювали триденним введенням гідрокортизону (фірма «Гедеон Ріхтер») із розрахунку 5 мг на тварину, а також шляхом опромінення. Загальне рентгенівське опромінення мишей BALB/с (поглинаюча доза випромінювання складала 4 Гр) провадили одноразово апаратом РУМ-11 при напрузі 250 В, силі струму 15 мА, фільтрах — 0,5 мм Cu і 1 мм Al, фокусній відстані до поверхні тіла 50 см, потужності поглинаючої дози випромінювання 0,01 Гр/с. Матеріал опрацьований статистично за критерієм t Стюдента.

Результати та їх обговорення

У своїх експериментах, на відміну від попередніх припущень [1,2,4,6,9], ми виходили з гіпотези, що дія спленіну опосередкована лімфоїдною системою. Послідовні спостереження впливу препарату на органи лімфоїдної системи показали його виражену тропність до тимуса і селезінки. Так, у щурів після 5-добового внутрішньом'язевого введення спленіну (0,25 мл/100 г) на 9-у добу досліду достовірно збільшувалася маса тимуса і селезінки, маса печінки за цих умов не змінювалася (табл. 1). Окрім цього відзначено, що з віком чутливість лімфоїдної системи щурів до тропної дії спленіну знижується.

Таблиця 1. Відносна маса органів лімфоїдної системи у щурів після 5-дільного внутрішньом'язевого введення спленіну та його розчинника

Група тварин	Селезінка		Тимус		Печінка	
	М ± m	P	М ± m	P	М ± m	P
Тварини (n=20), які отримували розчинник спленіну (контроль)	(331,0±11,6) × 10 ⁻⁵	—	(262,0±20,3) × 10 ⁻⁵	—	(3,48±0,12) × 10 ⁻⁵	—
Тварини (n=19), які отримували спленін (0,25 мл/100 г)	(477,0±14,4) × 10 ⁻⁵	<0,01	(378,0±24,6) × 10 ⁻⁵	<0,02	(3,61±0,13) × 10 ⁻⁵	>0,05

За характером виявлених змін логічно припустити, що вплив спленіну на масу лімфоїдних органів, подібно впливові неочищених чинників тимуса [14—16] або ж селезінки [10], пов'язаний зі стимуляцією розмноження лімфоцитів. Саме тому вивчення біологічної активності спленіну було розпочато з визначення мітогенної його активності. Однак, виходячи з виявленого первинного ефекту спленіну щодо його тропності до тимуса і селезінки, стала реальною можливість виділення з гетерогенного препарату біологічно активних речовин. У цьому плані, з нашої точки зору, найбільшої уваги заслуговують нуклеїнові кислоти і продукти їх обміну. Вміст останніх у спленіні пропорційний їх вмісту в селезінці, а також зумовлений аутолізом тканини органу під час виготовлення препарату. Останнім часом

одержано переконливі докази високої біологічної активності пуринових і піримідинових похідних як імуномодуляторів [7,8].

Виділення із спленіну сполук згаданого класу здійснювали шляхом осадження розчином напівводної азотнокислої ртуті [12]. Для цього дихлоретановий екстракт селезінки (напівпродукт спленіну), одержаний у фармоб'єднанні «Дарниця», висушували в ротаційному випарювачі. Ліпіди і органічні кислоти екстрагували і з сухого екстракту готували 5 %-вий водний розчин. Останній підкислювали за допомогою HCl до рН 4,0 і при постійному перемішуванні додавали 20 %-вий розчин азотнокислої ртуті. Одержаний осад, який складають нуклеотиди [13], відфільтровували, рН фільтрату доводили амоніаком до 6,0 і повторювали осадження тим же розчином ртуті. Осад ресуспендували в слаболужній воді і звільняли від іонів ртуті продуванням сірководню. Чорний осад HgS відкидали. Прозорий фільтрат підкислювали HCl до рН 2,0 і за допомогою газоподібного азоту з фільтрату витісняли сірководень, після чого ліофілізували. Одержаний небілковий чинник спленіну (НЧС) являє собою добре розчинний у воді білий аморфний порошок. Спектр поглинання нейтрального розчину чинника має максимум при 265 нм, що характерно для нуклеозидів.

Встановлено, що НЧС проявляє високу специфічну лімфоцитоз-стимулюючу активність. Так, на 12-у добу досліду триразове введення чинника мишам СВА (із розрахунку 10 мкг на тварину) призводить до значного збільшення маси тимуса і селезінки (табл. 2) та підвищення вмісту клітин у цих органах на 99,2 та 46 % відповідно. Однонаправленість змін в обох лімфоїдних органах після введення чинника свідчить про можливу стимуляцію лімфоцитопоезу.

Таблиця 2. Деякі показники, які свідчать про можливу стимуляцію лімфоцитопоезу в органах лімфоїдної системи у мишей лінії СВА, на 12 добу після триразового внутрішньом'язового введення небілкового чинника спленіну НЧС та фізіологічного розчину (ФР)

Група тварин	Показник							
	Відносна маса, мг/10 г				Число клітин, $1 \cdot 10^6$			
	тимуса		селезінки		в тимусі		в селезінці	
	M $\pm$ m	P	M $\pm$ m	P	M $\pm$ m	P	M $\pm$ m	P
Тварини (n=16), які отримували ФР (контроль)	(10,7 $\pm$ 0,57) $\times 10^{-4}$	—	(39,9 $\pm$ 1,92) $\times 10^{-4}$	—	27,6 $\pm$ $\pm$ 2,4	—	54,0 $\pm$ $\pm$ 5,4	—
Тварини (n=14), які отримували НЧС (10 мкг)	(18,3 $\pm$ 1,2) $\times 10^{-4}$	<0,001	(45,1 $\pm$ 1,2) $\times 10^{-4}$	<0,05	55,0 $\pm$ $\pm$ 2,8	<0,001	78,9 $\pm$ $\pm$ 6,1	<0,01

Це припущення підтвердилося при дослідженні впливу НЧС на синтез ДНК у спленоцитах. Як видно з табл. 3, вже через 24 год після введення щурам чинника значно підвищується *in vitro* включення попередника ДНК ^3H -тимідину в клітини селезінки. При введенні 250 мкг/100 г значення цього показника на 97 % вищі за такі у контролі і зростали більш ніж у 2 рази при двократному збільшенні дози.

Таким чином, одержані результати переконливо демонструють стимулюючу дію НЧС на синтез ДНК в спленоцитах. Активація проліферативних процесів у тимусі, правдоподібно, настає пізніше, оскільки збільшення органа і вміст клітин у ньому чітко виражені на 9-у добу після введення

Таблиця 3. Синтез ДНК в клітинах органів лімфоїдної системи щурів через 24 год після введення їм небілкового чинника спленіну (НЧС) та фізіологічного розчину (ФР)

Група тварин	Швидкість включення ^3H -тимідину у ДНК ($M \pm m$) (із розрахунку на 10^6 клітин), імп/хв	
	в спленоцитах	в тимоцитах
Тварин (n=10), яким вводили ФР (контроль)	6854 $\pm$ 27,3	19811 $\pm$ 725
Тварини (n=15), яким вводили НЧС:		
250 мкг/100 г	13528 $\pm$ 3863*	16454 $\pm$ 371*
500 мкг/100 г	16275 $\pm$ 42,0*	16023 $\pm$ 336*

*P < 0,001 по відношенню до контролю.

чинника. Окрім того, проліферуючі в тимусі клітини можуть мігрувати в периферичні лімфоїдні органи, і в першу чергу, в селезінку.

З метою перевірки припущення про можливість збільшення числа спленоцитів за рахунок проліферуючих клітин-іммігрантів з тимуса проведено дослідження впливу небілкового чинника на проліферативну активність

Таблиця 4. Синтез ДНК в клітинах 72-годинної культури спленоцитів за умов різного вмісту в суспензії клітин небілкового чинника спленіну (НЧС)

Вміст НЧС в суспензії з $5 \cdot 10^6$ клітин	Швидкість включення ^3H -тимідину у ДНК (із розрахунку на 10^6 клітин)			
	абсолютна, імп/хв			відносна, % конт- рольної швидкості
	n	M $\pm$ m	P	
0,0 нг	18	1449 $\pm$ 36	—	—
62,5 нг	23	2183 $\pm$ 61	<0,001	50
125,0 нг	23	2436 $\pm$ 172	<0,001	68
250,0 нг	23	2543 $\pm$ 153	<0,001	75
500,0 нг	18	1807 $\pm$ 55	<0,01	24

клітин селезінки в 72-годинній культурі. Достовірне підвищення швидкості включення ^3H -тимідину в ДНК клітин селезінки (табл. 4) спостерігається при внесенні в культуру 62,5 нг чинника, максимальне значення цього показника — при чотириразовому збільшенні маси чинника. Подальше збільшення маси чинника в суспензії спленоцитів призводить до пригнічення їх проліферативної активності. Подібні результати щодо стимуляції мітогенної активності були одержані при внесенні НЧС в короткотривалу 3-годинну культуру тимоцитів. Залежність швидкості включення ^3H -тимідину в ДНК тимоцитів від вмісту НЧС в 1 мл суспензії клітин, які культивуються, має такий вигляд:

0,00 нг НЧС (контроль)	— 8093 $\pm$ 645
31,25 нг НЧС	— 11819 $\pm$ 645 *
62,50 нг НЧС	— 9728 $\pm$ 484 **
125,00 нг НЧС	— 9929 $\pm$ 236 **
250,00 нг НЧС	— 9999 $\pm$ 507 **
500,00 нг НЧС	— 9059 $\pm$ 268 ***

при коефіцієнті достовірності різниці між значеннями показника у досліді по відношенню до контролю *P<0,001, **P<0,05, ***P<0,005.

Так, через 3 год інкубації тимоцитів максимальний стимулюючий ефект синтезу ДНК досягається при введенні 31,25 нг НЧС і залишається таким при збільшенні маси НЧС у 8 разів, після чого спостерігається інгібуючий

Таблиця 5. Відновлення лейкоцитів і гемоглобіну в периферичній крові опромінених мишей лінії BALB/c (n=10) після введення їм небілкового чинника спленіну (НЧС) та фізіологічного розчину (ФР)

Група тварин	Показник відновлення крові			
	Число лейкоцитів у 1 л крові, $1 \cdot 10^9$		Концентрація гемоглобіну, г/л	
	M $\pm$ m	P	M $\pm$ m	P
Тварини, яким вводили ФР (контроль):				
до опромінення	4,6 $\pm$ 0,1		206,0 $\pm$ 1,5	
після опромінення				
на 2-у добу	2,3 $\pm$ 0,06	<0,01	177,5 $\pm$ 1,5	<0,01
на 7-у добу	1,2 $\pm$ 0,03	<0,001	164,6 $\pm$ 1,4	<0,001
на 14-у добу	1,5 $\pm$ 0,09	<0,001	163,0 $\pm$ 2,3	<0,001
на 21-у добу	2,7 $\pm$ 0,1	<0,001	167,0 $\pm$ 2,4	<0,001
Тварини, яким вводили НЧС (по 5 мкг на добу протягом 3 діб):				
після опромінення				
на 2-у добу	2,8 $\pm$ 0,1	<0,01	188,7 $\pm$ 2,8	<0,01
на 7-у добу	2,4 $\pm$ 0,06	<0,001	184,4 $\pm$ 1,3	<0,001
на 14-у добу	1,9 $\pm$ 0,09	<0,001	182,8 $\pm$ 1,6	<0,001
на 21-у добу	4,2 $\pm$ 0,09	<0,001	187,7 $\pm$ 2,5	<0,001

вплив чинника на синтез ДНК. Таким чином, НЧС стимулює проліферацію клітин у тимусі і селезінці. Це дає підстави стверджувати, що виділений із спленіну чинник, як і сам препарат [5], проявляє тропність до Т-лімфоцитів. Механізм активації чинником Т-клітинної проліферації залишається невідомим. Належність чинника до низькомолекулярних природних сполук пуринового обміну обумовлює швидкий метаболізм в організмі, а тому обмежену тривалість його дії. Насправді ж, як свідчать наші спостереження, проліферативні процеси в досліджуваних лімфоїдних органах тривають 10 і більше діб після введення чинника. Тому можна припустити, що мітотична дія НЧС, подібно впливу лектинів, опосередкована і через інтерлейкін 2 (ІЛ—2). Однак в культурі клітин активація спленоцитів і тимоцитів після внесення чинника відбувається швидше, ніж при дії лектинів, які індукують утворення ІЛ-2.

Підсумовуючи сказане, допускається імовірність прямої мітогенної дії НЧС в перші години його контакту з Т-клітинами тимуса і селезінки, однак подальша активація Т-лімфоцитів, вірогідно, опосередкована дією ІЛ-2. Лімфотропна дія НЧС була підтверджена в дослідах на тваринах із модельованою післярадіаційною та стероїдогенною лімфоцитопеніями. У сублетально опромінених мишей СВА вже з перших діб після радіаційного впливу розвивається лейкопенія та знижується вміст гемоглобіну в крові. Триразове введення після опромінення НЧС прискорює відновлення вмісту лейкоцитів у крові (табл. 5). Паралельно відновлюється під впливом чинника і концентрація гемоглобіну у крові, яка на 21-у добу у дослідних тварин прирівнювалася до показників інтактних тварин. Цей новий факт дає підстави стверджувати, що НЧС стимулює і червоний ріст крові, чим заслуговує на окреме ретельне дослідження. У мишей лінії BALB/c з індукованою гідрокортизоном лімфоцитопенією на 11-у добу сліду маси тимуса і селезінки становили 38,7 та 64 % відповідно від маси органів інтактних тварин. На цей час у дослідних тварин (табл. 6), які одержували протягом трьох діб після введення гідрокортизону НЧС, маса об-

Таблиця 6. Деякі показники, які свідчать про пригнічення функції лімфоїдної системи при введенні гідрокортизону мишам лінії BALB/c ($M \pm m$)

Група тварин	Показник		
	Відносна маса, мг/10 г		Число клітин у тимусі, $1 \cdot 10^6$
	тимуса	селезінки	
Тварини ($n=12$), яким вводили фізіологічний розчин (контроль)	$(12,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(37,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	$36,9 \pm 1,4$
Тварини, яким вводили гідрокортизон на фізрозчині (по 1,2 мг на добу, протягом 1 доби)	$(4,76 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(25,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$18,2 \pm 1,2$
	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
Тварини, яким вводили гідрокортизон і небілковий чинник спленіну (по 5 мкг на добу протягом 3 діб)	$(8,0 \pm 0,35) \cdot 10^{-4}$	$(27,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$34,0 \pm 0,7$
	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,001$

стежуваних лімфоїдних органів відновлювалась, а вміст клітин у тимусі порівнювався до показників здорових тварин.

Таким чином, виявлений у спленіні біологічно активний чинник із вираженою прямою мітозстимулюючою дією, ймовірно, являє собою активний початок препарату. Вивчення хімічної структури чинника і його імунно-біологічних властивостей складають перспективу подальших досліджень.

B.V.Oleinik, O.V.Sidorenko, L.V.Bogdanovich

NATURE OF THE ACTIVE FACTOR OF SPLENIN AND MECHANISM OF ITS ACTION

The search of biologically active chemical compounds of the drug was carried out basing on the revealed lymphocytotropic property of splenin. A non-protein factor of the nucleoside origin was isolated from splenin by precipitation with mercury. It had a pronounced direct mitogenic effect on splein and thymic T-lymphocytes, being an active component of the drug. This factor increases the mass of lymphoid organs, promotes restoration of postradiation and steroidogenic lymphocytopenias.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аллетова Н.Н. Применение спленина для лечения больных хроническими гепатитами и циррозами печени // Врачеб. дело. — 1963. — № 9. — С.26—30.
2. Африканов Н.Н. Влияние спленина на белковосинтетическую функцию печени при лечении экспериментального туберкулеза большими дозами изониазида // Пробл. туберкулеза. — 1975. — № 7. — С. 74—78.
3. Ганджа Н.М., Лысенко Т.Н., Кишко А.С. Применение спленина в клинической практике // Врачеб. дело. — 1983. — № 6. — С. 9—15.
4. Головцев Ю.Н. Влияние спленина на некоторые показатели обмена веществ у больных атеросклерозом // Терапевт. архив. — 1969. — № 9. — С. 66—70.
5. Евтушенко С.К., Ефименко В.Н., Шовтута В.И. Сравнение иммуномодулирующего действия левамизола, галаскорбина и спленина на Т-лимфоциты крови // Иммунология, аллергология. — 1983. — Вып. 17. — С. 91—92.
6. Згржебловська В.М., Бладзевич А.А. Зміна деяких показників білкової функції печінки під впливом спленіну // Фізіол. журн. — 1964. — № 1. — С. 121—122.
7. Земсков В.М., Микстайс У.Я., Лидак М.Ю., Земсков А.М. Нуклеозиды и нуклеотиды: получение и применение в биологии и медицине // Усп. совр. биологии. — 1989. — 2, № 5. — С. 190—204.
8. Кашкин А.П., Рацино Е.В., Богданова Т.Я. и др. Иммуномодуляторы нуклеозидной природы // Компоненты нуклеиновых кислот. Тез. докл. VIII Всесоюз. симпози. по целенаправленному изысканию лекарственных веществ. (Рига, 24—26 янв. 1989). — 1988. — С. 62—63.