

**О. Г. Голева, І. П. Пастер, Т. А. Любченко, Є. У. Пастер,
Л. С. Холодна, Г. А. Замотаєва, Д. М. Гродзінський**

Фактор переносу імунної реактивності як модулятор функціональної активності лімфоцитів щурів

Трансплантация тиреоидной ткани является одним из перспективных методов восстановления функциональной недостаточности щитовидной железы при действии на организм неблагоприятных факторов окружающей среды. В работе микрометодом реакции бласттрансформации лимфоцитов по включению [³H]-тимидина изучена функциональная активность спленоцитов крыс линии Вистар с радиационноиндуцированным гипотиреозом до и после ксенотрансплантации органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят. Установлено снижение содержания тироксина и трийодтиронина в сыворотке крови, а также угнетение пролиферации спленоцитов крыс с радиационноиндуцированным (введением йода-131 в дозе 8,325 МБк/моль) гипотиреозом. Применение метода ксенотрансплантации органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят привело к возрастанию содержания тиреоидных гормонов в сыворотке крови и частичному восстановлению функциональной реактивности лимфоцитов. Установлены возможности коррекции иммунологических изменений препаратами иммуностимулятора природного происхождения - фактора переноса иммунной реактивности, который представляет собой очищенный низкомолекулярный (до 10 кДа) экстракт лейкоцитов. Исследуемые препараты активировали пролиферацию спленоцитов у животных с радиационноиндуцированным гипотиреозом и у животных с гипотиреозом, которым была проведена ксенотрансплантация тиреоидной ткани.

Вступ

При інкорпорації радіоактивного йоду основним критичним органом є щитовидна залоза, а одним з можливих наслідків її радіаційного ураження — розвиток стійкого гіпотиреозу [17]. Радіоактивні ізотопи йоду та тривалентне зниження вмісту тиреоїдних гормонів у крові призводять до патологічних порушень в імунній системі, зокрема пригнічують її Т-клітинну ланку [4]. Відновлення гормонального статусу організму та використання імуномодуляторів можуть бути важливими факторами реабілітації імунної системи [4]. Перспективний метод терапії стійкого гіпотиреозу — ксенотрансплантація органної культури щитовидної залози новонароджених поросят [9]. Раніше нами було показано, що за умов *in vitro* ця культура зберігає свої основні морфофункціональні властивості протягом тривалого часу і може бути застосована в клінічній та експериментальній трансплантології [10, 20]. Також ведеться активний пошук речовин, здатних коригувати функціональні зміни в імунній системі, в тому числі вторинні імунодефіцити [4].

© О. Г. Голева, І. П. Пастер, Т. А. Любченко, Є. У. Пастер, Л. С. Холодна,
Г. А. Замотаєва, Д. М. Гродзінський

Метою нашого дослідження було вивчення функціональної активності спленоцитів щурів лінії Вістар з радіаційноіндукованим гіпотиреозом до і після ксенотрансплантації органної культури щитовидної залози новонароджених поросят. Як імуностимулятор використовували препарат природного походження — фактор переносу (ФП) імунної реактивності, який являє собою низькомолекулярний (до 10 кДа) екстракт лейкоцитів, що здатен антигенспецифічно переносити імунні реакції (зокрема, стан гіперчутливості сповільненого типу) від імунізованого організму донора до інтактного реципієнта [2].

Методика

Експеримент був проведений на 50 щурах-самцях лінії Вістар масою 100 — 150 г, яких утримували на стандартному кормовому раціоні за звичайних умов віварію. Всі тварини були розподілені на три основні групи: I — контрольні щури, II — щури з радіаційноіндукованим гіпотиреозом і III — щури з радіаційноіндукованим гіпотиреозом після ксенотрансплантації органної культури щитовидної залози новонароджених поросят.

Стан стійкого гіпотиреозу викликали внутрішньочеревним введенням тваринам радіоактивного йоду (^{131}I) по 8,325 МБк/ммоль (Дослідне підприємство «Радіопрепарат» Інституту ядерної фізики АН Узбекистану) у вигляді NaI, розведеного в 0,3 мл 0,9 %-го розчину NaCl. Контрольним щурам вводили по 0,3 мл 0,9 %-го розчину NaCl. Контрольних і дослідних тварин утримували окремо, що виключило можливість опромінення щурів контрольної групи. Через 28 діб поглинута доза, яку отримали дослідні тварини II і III груп внаслідок β -випромінювання радіоактивного йоду, становила 3,7 Гр для тіла та 81,0 Гр для щитовидної залози [3, 5]. У цей період щурам під ефірним наркозом в підшкірну жирову клітковину передньої черевної стінки трансплантували 4-добову органну культуру щитовидної залози новонароджених поросят, яку готували розробленим в Інституті ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України методом [10].

Через 7, 14, 21, 28, 35 і 42 доби після введення ^{131}I та через 14 діб після проведення ксенотрансплантації отримували сироватку крові для кількісного визначення в ній загального тироксину (ЗТ_4) та загального трийодтироніну (ЗТ_3) радіоімунологічним методом з використанням наборів реактивів «Total T4 RIA» та «Total T3 RIA» (фірми «Immunotech», Чеська Республіка).

З метою вивчення функціональної активності спленоцитів у щурів видаляли (на 14-ту добу після ксенотрансплантації, під ефірним наркозом) селезінку, гомогенізували та відмивали середовищем 199 («Медбіопром», Росія) тричі по 10 хв при 400 g. Еритроцити селезінки лізували 0,16 моль/л розчином NH_4Cl , забуференим тріс- HCl (рН 7,2), упродовж 40 с при 37°C. Після відмивання спленоцити ресуспендували в середовищі RPMI 1640 (фірми «Flow», Велика Британія), збагаченому 10 %-ю ембріональною сироваткою телят (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Росія), $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л 2-меркаптоетанолу (фірми «Sigma», США), 10 ммоль/л Перес (фірми «Sigma», США), 2 ммоль/л L-глутаміну

(«Serva», ФРН), антибіотиками і вносили в 96-лункові планшети (фірми «Linbro», ФРН).

Культивування клітин проводили без мітогенів (контроль) або при наявності фітогемаглютиніну (ФГА, фірми «Sigma», США) в оптимальній концентрації 12,5 мкг/мл. ФГА додавали на початку культивування одночасно зі спленоцитами. Визначали також функціональну активність лімфоцитів щурів під впливом препаратів ФП імунної реактивності до антигенних субстанцій стафілокока, що були одержані нами раніше [2, 6]. У дослідах використовували такі препарати: бичачий ФП до корпускулярного антигену *Staphylococcus aureus* (КАС) та ФП людини до стафілококового анатоксину (СА).

Культивування спленоцитів проводили при наявності препаратів ФП у дозі 1 МО/мл [18]. Культури клітин інкубували в атмосфері повітря з 5% CO₂ при 37 °С упродовж 72 год. Рівень проліферації лімфоцитів оцінювали за включенням [³H]-тимідину, який додавали в культуру в дозі 37 кБк на лунку з питомою активністю 37 ГБк/ммоль за 16–18 год до закінчення культивування. Рівень радіоактивності визначали на β-лічильнику «Intertechnic» (фірми «Intertechnic», Франція), після чого підраховували його середнє значення та індекс стимуляції (ІС) як співвідношення середніх значень контролю та досліду [11].

Статистичну обробку результатів проводили за методами варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Умови утримання тварин і проведення експериментів з ними строго контролювали. Однак коливання середніх значень концентрацій тиреоїдних гормонів у крові інтактних щурів за час проведення експериментів були значними, що є характерним для подібних тривалих досліджень [13]. Тому необхідно було використання одночасних контролів у всіх строках дослідження.

Внутрішньочеревне введення щурам йоду-131 призводило до істотного та тривалого зниження концентрації ЗТ₄, починаючи з 14-ї доби: концентрація гормону коливалась від 29,9 до 36,9% зі значеннями контрольних щурів (концентрація гормону у контрольних тварин була прийнята за 100%; рис. 1, а). Саме в цей період у щитовидній залозі реалізується майже вся поглинута доза опромінення від радіоактивного йоду, характер формування якої, як пошкоджуючого залозу фактора, є функція часу [5]. Динаміка концентрації ЗТ₃ була аналогічною (29,6–34,6% порівняно з контролем; див. рис. 1, б).

Хоча виявлені зміни концентрації тиреоїдних гормонів зумовлені прямою дією іонізуючої радіації на фолікулярні клітини щитовидної залози [8], не виключена також можливість опосередкованого впливу ¹³¹I внаслідок порушення функціональних зв'язків між центральними та периферичними ланками гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної системи [1, 4].

Ксенотрансплантація органної культури щитовидної залози новонароджених поросят призводила до вірогідного (порівняно з II групою) збільшення концентрації ЗТ₄ у крові щурів на 20,1% (рис. 2, а) на 14-ту

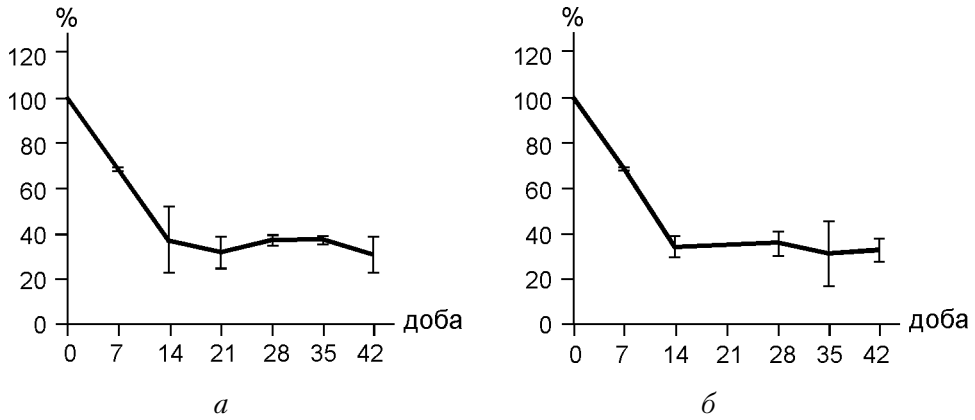


Рис. 1. Концентрація (% від контролю) загального тироксину (а) і загального трийодтироніну (б) у сироватці крові щурів у різні строки після однократного парентерального введення 8,325 МБк ¹³¹I. P < 0,05 для всіх строків порівняно з початковим значенням.

добу спостереження. Концентрація ЗТ₃ підвищувалась за цей період всього на 12,2 % (див. рис. 2, б). Така різниця може бути пов'язана з тим, що секреція тироксину і трийодтироніну щитовидною залозою здійснюється у пропорції 10 : 1 [14]. Що стосується повільного підвищення концентрації тиреоїдних гормонів, то це є характерним для подібних досліджень. Зокрема, ксенотрансплантація тиреоїдної тканини людини мишам з аналогічною моделлю гіпотиреозу призводила до нормалізації вмісту тироксину та тиреотропного гормону в крові тільки через 3—6 тиж [16].

При дослідженні функціональної реактивності імунокомпетентних клітин за допомогою мікрометоду бласттрансформації лімфоцитів встановлено, що рівень спонтанної проліферації лімфоцитів (за даними включення

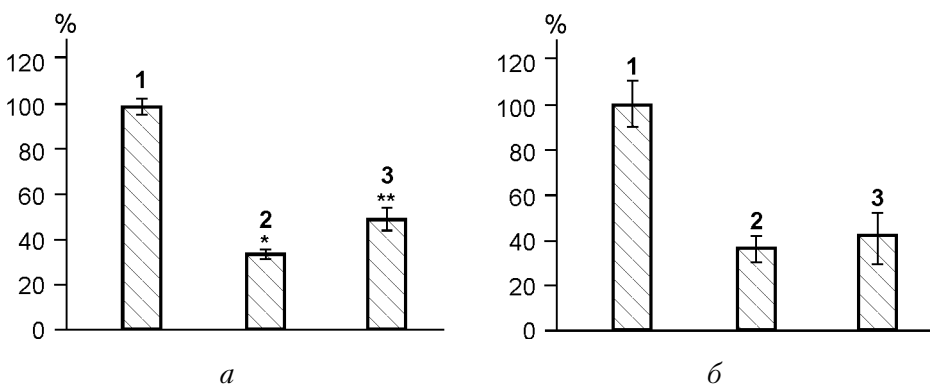


Рис. 2. Концентрація (% від контролю) загального тироксину (а) і загального трийодтироніну (б) у сироватці крові контрольних щурів (1), щурів з радіаційноіндукованим гіпотиреозом (2) і щурів з радіаційноіндукованим гіпотиреозом, яким була здійснена ксенотрансплантація органної культури щитовидної залози новонароджених поросят (3) на 14-ту добу спостереження. * P < 0,001 порівняно з I групою; ** P < 0,01 порівняно з II групою.

[³H]-тимідину в ДНК спленоцитів) щурів I групи становив 1626 імп/хв ± ± 25 імп/хв (таблиця). У тварин з радіаційноіндукованим гіпотиреозом значення його показника було майже на 50 % нижчим. Відомо, що зниження вмісту тиреоїдних гормонів впливає на імунологічну відповідь (зокрема внаслідок патологічних змін у Т-клітинній ланці імунної відповіді) [12].

Крім того, не виключена можливість імунологічних порушень у результаті прямої дії радіоактивного йоду на імунокомпетентні клітини. Показано, що у всіх лімфоїдних тканинах спостерігається виражена деструкція імунокомпетентних клітин протягом декількох годин після опромінення в дозі до 2 Гр [15]. Знижена в результаті радіаційного опромінення кількість Т- і В-лімфоцитів відновлюється лише через декілька місяців, а для нормалізації стану Т-лімфоцитів потрібно 3–5 років незалежно від того, чи потрапив тимус у зону опромінення [7].

У щурів III групи рівень спонтанної проліферації лімфоцитів підвищився до 72,4 % від контрольного значення, що корелює зі збільшенням вмісту тиреоїдних гормонів у тварин після ксенотрансплантації органної культури щитовидної залози новонароджених поросят у ці ж строки спостереження.

Функціональна активність лімфоцитів щурів I і III груп у відповідь на Т-клітинний мітоген (ФГА) знаходилася в межах норми (ІС становили 7,03 та 6,56 відповідно). У групі тварин з радіаційноіндукованим гіпотиреозом (II група) ІС лімфоцитів був значно нижчий (4,54), що вказує на зниження їх функціональної активності на ФГА-стимуляцію як наслідок

**Включення [³H]-тимідину в ДНК (імп/хв)
та індекс стимуляції (ІС) бласттрансформації лімфоцитів селезінки щурів**

Схема досліджу	Групи тварин		
	I група	II група	III група
Включення [³ H]-тимідину			
Без введення мітогенів (контроль)	1626±25 (10)	843±32 (8)*	1178±66 (10)*
Введення мітогенів			
фітогемаглютинін	11436±101 (10)**	3838±29 (8)**	7728±166 (10)**
фактор переносу людини до стафілококового анатоксину	9694±73 (10)**	3210±432 (2)**	8009±100 (10)**
фактор переносу біків до корпускулярного антигену стафілокока	10608±598 (10)**	6903±3067 (2)	7774±1241 (6)**
ІС			
Без введення мітогенів (контроль)	1,00	0,52	0,72
Введення мітогенів			
фітогемаглютинін	7,03	2,36	4,75
фактор переносу людини до стафілококового анатоксину	5,96	1,97	4,92
фактор переносу біків до корпускулярного антигену стафілокока	6,52	4,27	4,78

Примітка. *P < 0,001 порівняно з відповідною I групою; ** P < 0,001 порівняно з відповідною групою (контроль), у дужках — кількість тварин.

дії йоду-131. ІС проліферації спленоцитів тварин III групи свідчать про здатність ксенотрансплантації відновлювати функціональну активність імунокомпетентних клітин щурів у відповідь на ФГА. Передбачається, що поступове відновлення Т-клітинної реактивності відбувається, в першу чергу, внаслідок збільшення концентрації тиреоїдних гормонів у сироватці крові тварин з гіпотиреозом після ксенотрансплантації органної культури щитовидної залози.

Враховуючи здатність імуностимулюючих агентів змінювати радіостійкість лімфоїдних клітин і результати наших попередніх досліджень, де була показана імуномодулююча активність препаратів ФП імунної реактивності [19, 21], нами була проведена оцінка можливості застосування даних препаратів для корекції імунодефіцитного стану в тварин з радіаційноіндукованим гіпотиреозом.

При наявності препарату ФП людини до СА та препарату бичачого ФП до КАС у середовищі культивування ІС проліферації спленоцитів контрольної групи щурів становив 5,96 і 6,52, відповідно. У тварин II групи включення [³H]-тимідину в ДНК лімфоцитів при наявності ФП людини до СА в середовищі культивування становило 3210 імп/хв ± 432 імп/хв (P < 0,001), а ІС — 3,81. При дії бичачого ФП до КАС стимуляція лімфоцитів була більш виразною, ІС дорівнював 8,19. Однак недостатня кількість спостережень (n = 2) не дозволяє адекватно трактувати дію даного препарату на спленоцити щурів з радіаційноіндукованим гіпотиреозом.

Під дією досліджуваних препаратів спостерігали стимуляцію бласттрансформації лімфоцитів тварин, яким була здійснена ксенотрансплантація органної культури щитовидної залози, оскільки включення [³H]-тимідину в ДНК лімфоцитів щурів III групи збільшувалося при наявності в середовищі культивування ФП людини до СА і бичачого ФП до КАС до 8009 ± 100 та 7774 імп/хв ± 1241 імп/хв відповідно, а ІС лімфоцитів — до 6,80 і 6,60 відповідно. Проведені дослідження ще раз підтвердили здатність досліджуваних препаратів ФП імунної реактивності стимулювати проліферацію імунокомпетентних клітин. Одержані результати свідчать про можливість застосування даних субстанцій для відновлення функціональної активності лімфоцитів при радіаційноіндукованих імунодефіцитних станах. Також у цій модельній системі показана можливість застосування даних препаратів сумісно з ксенотрансплантатом органної культури щитовидної залози як імунореабілітуючого засобу.

Таким чином, введення щурам радіоактивного йоду в дозі 8,325 МБк/ммоль призводить до зниження вмісту тиреоїдних гормонів і пригнічення функціональної активності спленоцитів щурів. Ксенотрансплантація органної культури щитовидної залози новонароджених поросят спричинює збільшення концентрації тиреоїдних гормонів і функціональної активності спленоцитів щурів при відповіді на фітогемаглютинін або препарати ФП імунної реактивності. Зазначені мітогени активують включення [³H]-тимідину в ДНК спленоцитів контрольних щурів, щурів з радіаційноіндукованим гіпотиреозом і щурів з радіаційноіндукованим гіпотиреозом, яким була здійснена ксенотрансплантація органної культури щитовидної залози новонароджених поросят. Це свідчить про імуномодулюючі власти-

вості досліджуваних препаратів ФП імунної реактивності людського та бичачого походження, а також можливість їх застосування при імунodefіцитних станах.

**E. G. Goleva, I. P. Pasteur, T. A. Lyubchenko, E. U. Pasteur,
L. S. Kholodna, G. A. Zamotaeva, D. M. Grodzinsky**

**TRANSFER FACTOR OF IMMUNE REACTIVITY
AS A MODULATOR OF THE RAT'S LYMPHOCYTES FUNCTIONAL
ACTIVITY WITH RADIATION INDUCED HYPOTHYROIDISM**

The transplantation of the thyroid tissue is one of the perspective methods for rehabilitation of thyroid gland functional disorders that appear due to the influence of insufficient environmental conditions on organism. By means of micromethod of lymphocyte blasttransformation reaction on the base of [³H]-thymidine shift the functional activity of the Wistar rat's splenocytes was studied in case of radiation induced hypothyroidism with or without xenotransplantation of newborn pig thyroid gland organ culture. It was found that the level of thyroxine and triiodothyronine significantly decreased in serum of irradiated animals, the lymphocyte proliferation level was also reduced (by means of radioiodine introduction in dose of 8,325 MBk/mmole). Application of thyroid gland tissue xenotransplantate in this model of hypothyroidism helped to achieve the increasing of thyroid hormones levels in serum and rehabilitation of lymphocytes functional activity. The opportunities for correction of immunological disorders with the help of transfer factor of immune reactivity preparates were investigated. Transfer factor — is a low-molecular weight leukocyte extract (J 10 kD) with immunomodulating activities. This preparates activated the proliferation of splenocytes from animals with hypothyroidism and animals with hypothyroidism after xenotransplantation.

Taras Shevchenko National University, Kiev;

*V. P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,
Academy of Medical Sciences of Medical Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Багель И.М., Горох Г.А.* Влияние гамма-облучения на активность 5-дейодиназы и уровень тиреоидных гормонов у крыс. — В кн.: Радиобиол. съезд: тез. докл. (К., 20-25 сент. 1993 г.) — Пущино, 1993. — С. 56-57.
2. *Голева О.Г., Любченко Т.А., Холодна Л.С., Вершигора А.Ю.* Фактор переносу гіперчутливості сповільненого типу морських свинок до антигенних субстанцій стафілокока // *Фізіол. журн.* — 1996. — **42**, № 5-6. — С. 58-66.
3. *Гродзинский Д.М.* Методика применения радиоактивных изотопов в биологии. — К.: УАСХН, 1962. — 171 с.
4. *Дедов В.И., Дедов И.И., Степаненко В.Ф.* Радиационная эндокринология. — М.: Медицина, 1993. — 208 с.
5. *Ильин Б.Н., Борисова В.В., Ветух В.А.* Отдаленные биологические эффекты комбинированного действия радионуклидов различной тропности. — М.: Энергоатомиздат, 1991. — 160 с.
6. *Любченко Т.А., Голева О.Г., Холодна Л.С. та ін.* Людський специфічний Фактор переносу до антигенів *Staphylococcus aureus* // *Фізіол. журн.* — 1997. — **43**, № 3-4. — С. 25-32.
7. *Москалев Ю.И.* Отдаленные последствия ионизирующих излучений. — М.: Медицина, 1991. — 463 с.

8. Ткачѳв А.А. Аспекти радиационного поражения щитовидной железы. — Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. — Л., 1970. — 29 с.
9. Турчин І.С. Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія. — 1996. — 1, № 2. — С. 6-13.
10. Турчин І.С., Комісаренко І.В., Тронько М.Д. та ін. Трансплантація культур клітин і тканин щитовидної залози при гіпотиреозі: Метод. рекоменд. — К.: Чорнобильінтерінформ, 1997. — 15 с.
11. Холодная Л.С., Хоробрых В.В., Каулен Д.Р., Вершигора А.Е. Активация синтеза ДНК в лимфоцитах морских свинок под влиянием антигенов стафилококка // Журн. микробиол. — 1982. — № 8. — С. 107-112.
12. Чеботарев В.Ф. Эндокринная регуляция иммуногенеза. — К.: Здоров'я, 1979. — 211 с.
13. Шкуматов Л.М., Крылова И.И., Маркова А.Г. и др. Динамика концентрации тироксина и трийодтиронина в крови крыс в ранние сроки после субтотального удаления щитовидной железы или воздействия различных активностей ¹³¹I // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1994. — 34, вып. 3. — С.386-390.
14. Шрейбер В. Патологическая физиология желез внутренней секреции. — Прага: Авиценум, 1987. — 493 с.
15. Casarett G.W. Radiation histopathology. — Boca Raton: CRC Press, 1980. — Vol. 1. — 160 p.; Vol. 2. — 176 p.
16. Kasuga Y., Matsubayashi S., Sakatsume Y. et al. The effect of xenotransplantation of human thyroid tissue following radioactive iodine-induced thyroid ablation on thyroid function in the nude mouse // Clin. Invest. Med. — 1991. — 14, №4. — P.277-281.
17. Kinser J.A., Roesler H., Furrer T. et al. Nonimmunogenic hyperthyroidism — Cumulative hypothyroidism incidence after radioiodine and surgical treatment // J. Nucl. Med. — 1989. — 30, № 12. — P. 1960-1965.
18. Kirkpatrick C.H., Burger D.R., Lawrence H.S. Immunobiology of Transfer Factor. — New York — London: Acad. Press, 1983. — 387 p.
19. Lyubchenko T.A., Goleva E.G., Kholodna L.S., Pozur V.K. Studies of mechanism of action of leukocyte dialysates on functional activity of T- and B-lymphocytes. — In.: Congress of Molecular Medicine. Germany, Berlin, (May 3-5, 1997) // J. Molec. Med. — 1997. — 75, №5. — P. B59-B60.
20. Pasteur I.P., Tronko N.D., Drozdovich I.I. et al. Thyroid transplantation: possibility of application for the treatment of persistent hypothyroidism and study of mechanisms of interaction between graft and hypothalamic-pituitary axis of recipient. — In: Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects. — Vol.10. — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. — P. 289-293.
21. Vershigora A.E., Lyubchenko T.A., Goleva E.G. et al. Human specific Transfer Factor of cell-mediated immunity to Staphylococcus antigen substances. — In.: 10th International Symposium on Transfer Factor. Italy, Bologna, 1995. — Abstract Book. — P. 14.

Київ. ун-т ім. Тараса Шевченка;
Ін-т ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 17.05.99