

**М. Д. Тронько, Л. М. Бикова, М. Г. Бойко,
Г. Л. Синельникова, Б. В. Олійник**

Реакції імунної системи під впливом непептидного чинника селезінки

Проведены иммунологические исследования по изучению влияния небелкового фактора селезенки — спленозида на цитотоксическую активность природных клеток-киллеров, реакцию связывания комплемента и иммунореактивность спленоцитов на чужеродный антиген. Показано, что даже однократное введение крысам препарата в дозе 300 мкг/100 г через 48 ч стимулирует цитолитическую активность спленоцитов относительно клеток-мишеней (эритроцитов барана). Аналогичные результаты получены в опытах in vitro. Введение спленозида морским свинкам вызывает снижение активности комплемента в сыворотке крови этих животных. Установлено, что спленозид в зависимости от дозы угнетает иммунореактивность спленоцитов сенсibilизированных мышей. Полученные результаты дополняют представления о биологической активности препарата спленозид.

Вступ

Головне призначення імунної системи полягає у тому, щоб забезпечити жорсткий контроль за сталістю генетично детермінованої біохімічної будови тканинних структур організму. Відбувається це завдяки ефекторним механізмам імунної системи [5]. До них належать цитотоксичні Т-клітини, зокрема, клітини, специфічні до певних антигенів (антигензалежна клітинна цитотоксичність) і клітини, які «неспецифічно» руйнують трансформовані та чужорідні клітини-мішені (природні клітини-кілери) [2]. Природні клітини-кілери — гетерогенна за антигенними показниками та функціональною активністю популяція лімфоцитів, якій належить регуляторна, протипухлинна, протівірусна активність, а також участь у трансплантаційному імунітеті.

Ще одним важливим ефекторним механізмом імунітету є взаємодія антиген — антитіло, яка призводить до активації системи комплементу. Останній бере участь у стимуляції фагоцитозу та антитілогенезу, посилює хемотаксис, цитоліз та імунну адгезію, сприяє звільненню гістаміну з тучних клітин. Функціонування ефекторних механізмів імунної системи регулюється іншими клітинами імунної системи через медіатори такі, як інтерлейкін-2 та інтерферон, а також різноманітними біологічно активними чинниками ендогенної та екзогенної природи. Саме таким чинником може бути лімфоцитозстимулюючий чинник селезінки, одержаний у нашій лабораторії [4]. За фізико-хімічними властивостями цей низькомолекулярний (молекулярна маса менша ніж 1000 Да) небілковий імунотропний чинник з робочою назвою «спленозид», являє собою комплекс нуклеозидів неідентифікованого складу. Об'єктом дії чинника є кортизон- і радіорезистентна

популяція Т-клітин. При експериментальних пострадіаційній і стероїдогенній лімфоцитопеніях спленозид прискорює відновлення маси лімфоїдних органів і вмісту лімфоїдних клітин в організмі. Оскільки спленозид є натуральним продуктом небілкової природи, не викликає алергію, ефективний при вживанні — це вигідно відрізняє його від інших як природних, так і синтетичних імуномодуляторів.

Метою нашого дослідження було вивчити особливості впливу препарату спленозид на ефекторні реакції імунної системи такі, як цитотоксична активність природних кілерів, реакція зв'язування комплекменту та імунореактивність спленоцитів на чужорідний антиген.

Методика

Дослідження цитотоксичної активності природних кілерів проведено на 10—12-тижневих щурах-самцях популяції Вістар. Цитотоксичну активність клітин-кілерів визначали методом, розробленим та опробуваним в НДІ фтизіатрії та пульмонології ім. акад. Ф. Г. Яновського [9]. Метод базується на спектрофотометричному вимірюванні вмісту гемоглобіну, що звільняється зі зруйнованих кілерами клітин-мішеней (еритроцитів барана) в інкубаційному середовищі. Об'єктом дослідження були спленоцити, бо за даними літератури саме селезінка містить найбільшу кількість (7 % від загальної кількості лімфоїдних клітин в органі) великих грануловмісних лімфоцитів, які мають активність природних клітин-кілерів [2]. При вивченні впливу спленозиду на активність природних клітин-кілерів селезінки щурів *in vitro*, спленоцити попередньо інкубували з препаратом (10 мкг/10⁷ клітин) упродовж 90 хв при 37 °С. Цитотоксичну активність спленоцитів виражали за допомогою індексу цитотоксичності (ІЦ), який обчислювали за формулою:

$$\text{ІЦ} = \frac{E_e - E_n}{E_n} \cdot 100\%$$

де E_e — оптична щільність контролю еритроцитів; E_n — оптична щільність проби, що досліджується.

Щурам *in vivo* одноразово вводили препарат у дозі 300 мкг/100 г внутрішньоочеревино.

Вплив спленозиду на систему комплекменту вивчали на морських свинках-самцях масою 250—300 г. За добу до введення спленозиду у морських свинок пункцією серця під ефірним наркозом брали по 1 мл крові. Цим же тваринам внутрішньоочеревино вводили спленозид у дозі 100 мкг/100 г. На 5-ту добу після введення препарату повторно брали кров з серця. Центрифугуванням осаджували форменні елементи, а сироватку використовували для спектрофотометричного визначення титру комплекменту за 50 %-м гемолізом [6]. Принцип методу полягає у феномені лізису еритроцитів при наявності гемолітичних антитіл і комплекменту. За 50 %-ну гемолітичну одиницю активності комплекменту ($^1\text{CH}_{50}$) беруть ту його кількість, при наявності якої відбувається лізис 50 % еритроцитів у závisі протягом 45 хв при 37 °С.

Реактивність імунної системи вивчали за допомогою реакції клітинного пулу селезінки на введення Т-залежного тест-антигену — еритроцитів барана. Імунореактивність спленоцитів оцінювали за їх здатністю утворю-

вати імунні розетки з еритроцитами барана [8]. Метод вважають специфічним і високо чутливим для тестування імунної відповіді [1, 10]. Дослідження проводили за схемою: мишам лінії СВА масою 15–20 г протягом 3 діб вводили спленозид у дозі 50 мкг/10 г і 25 мкг/10 г. На 4-ту добу тварин імунізували внутрішньоочеревинним введенням 0,2 мл 5 % еритроцитів барана. Через 5 діб вивчали імунореактивність спленоцитів за методом розеткоутворення [8].

Результати та їх обговорення

Слід зазначити, що навіть одноразове введення шурам небілкового чинника селезінки через 48 год стимулює цитолітичну активність спленоцитів відносно клітин-мішеней (еритроцитів барана): ІЦ інтактних тварин був $11\% \pm 1\%$, а у тварин, що одержали спленозид в дозі 300 мкг/100 г – $25\% \pm 3\%$ ($n = 10$, $P < 0,001$). Аналогічні результати одержані в дослідях *in vitro*. Так, після попередньої інкубації спленоцитів із небілковим чинником селезінки цитолітична активність останніх значно збільшилася (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив спленозиду на цитотоксичну активність (%) спленоцитів *in vitro*

№ досліда	Інтактні спленоцити	Спленоцити, інкубовані зі спленозидом (10 мкг/10 ⁷ клітин)
1	17	28
2	18	38
3	5	30
4	4	15
5	5	24
6	3	12

$P < 0,01$.

Таким чином, небілковий чинник селезінки може бути ефективним потенційним засобом для лікування захворювань, що супроводжуються дефіцитом активності природних клітин-кілерів, зокрема, лейкемій, злоякісних новоутворень, вірусних інфекцій.

У зв'язку з важливістю ролі, яку відіграє комплемент у імунологічному нагляді, доцільним є вивчення впливу низькомолекулярного імуномодулятора спленозиду на систему комплементу. Як свідчать результати дослідження з визначення титру комплементу за 50 %-м гемолізом, одноразове введення спленозиду знижує активність комплементу у сироватці крові морських свинок (табл. 2). При багатьох захворюваннях як у людей, так і тварин

Таблиця 2. Кількість CH_{50} у сироватці крові морських свинок

Порядковий № тварини	До введення спленозиду	Після введення спленозиду
1	28	24
2	31	21
3	28	20
4	29	20
5	30	33
6	32	24
7	31	27
8	31	33

$P < 0,05$.

спостерігаються значні зміни активності комплементу [12]. Так, при гострому гломерулонефриті та системному червоному вовчаку гемолітична активність комплементу низька [14]. При ревматизмі, артриті, інфаркті міокарда [11] та різноманітних гострих інфекціях, активність комплементу часто буває вищою від нормального рівня. В трансплантаційній хірургії як терапевтичний захід може бути використана швидка інгібіція комплементу за допомогою розчинних рецепторів до нього [13], що призводить до зниження запального процесу та тканинної деструкції, збільшення термінів виживання трансплантату. При розвитку анафілактичної реакції для пригнічення фіксації комплементу та утворення анафілатоксину використовують бівалентні катіони, які перешкоджають фіксації компонентів комплементу C_1 , C_2 та C_4 , або флорідзин, який пригнічує зв'язування з C_3 [3]. Антикомплемтарний ефект препарату спленозид, визначений в наших експериментах, також може бути використаний у тих випадках, коли необхідно зменшити активність комплементу.

Оскільки небілковий чинник спленозид не є гомогенною речовиною, а являє собою комплекс нуклеозидів, можна припустити, що стимуляція цитолітичної активності та пригнічення комплементарної відбувається різними нуклеозидами, що входять до складу чинника.

Вивчалася реактивність імунної системи мишей на введення чужорідного антигену та вплив на цей процес препарату спленозид. Було показано, що введення препарату залежно від дози призводить до значного зменшення розеткоутворюючих клітин селезінки у імунізованих еритроцитами барана мишей: якщо кількість розеткоутворюючих клітин на 10^3 спленоцитів у контрольних мишей була 39 ± 2 , то у тварин, яким вводили спленозид у дозі 25 мкг/10 г цей показник становив 22 ± 3 ($P < 0,001$), а у дозі 50 мкг/10 г — 9 ± 1 ($n = 7$, $P < 0,01$). Зважаючи не те, що в утворенні імунних розеток беруть участь як Т-, так і В-лімфоцити, а спленозид є мітогенним чинником щодо Т-лімфоцитів [7], можна припустити, що він збільшує кількість Т-клітин-супресорів.

Висновки

1. Спленозид стимулює цитолітичну активність спленоцитів відносно клітин-мішеней в експериментах *in vitro* та *in vivo*.
2. Активність комплементу в сироватці крові морських свинок після одноразового введення спленозиду знижується.
3. За тестом розеткоутворення спленозид пригнічує імунореактивність спленоцитів сенсibilізованих мишей.

**M. D. Tronko, L. M. Bykova, M. G. Boyko,
G. L. Synelnykova, B. V. Olyinik**

SOME EFFECTOR REACTIONS OF IMMUNE SYSTEM UNDER THE INFLUENCE OF NONPEPTIDE SPLEEN FACTOR

The influence of low molecular nonpeptide preparation splenosid obtained from bovine spleen on the cytotoxic activity of natural killers, reaction of complement binding and the immune responsibility was investigated. It was shown that even single treatment

of rats with splenosid in a dose of 300 mkg/100 g in 48 hours stimulates the cytolytic activity of splenocytes on target cells (sheep erythrocytes). The same results were obtained in vitro. The treatment of quinea pigs with splenosid reduces the complement activity in serum. This preparation depresses the splenocyte immunoreactivity in sensibilyzed mice in a dose – dependent manner. The data obtained complete our knowleges about biological activity of splenosid.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гриневич Ю.А.* Структура и функция клеток, образующих розетки // Журн. микробиологии. – 1973. – № 5. – С. 114-118.
2. *Зак К.П., Киндзельский Л.П., Бутенко А.К.* Большие гранулосодержащие лимфоциты в патологии. – К.: Наук. думка, 1992. – 162 с.
3. *Левы Д.* Анафилактические реакции при анестезии и интенсивной терапии. – М.: Медицина, 1990. – 176 с.
4. *Олейник Б.В.* Небелковый фактор селезенки. – В кн.: Регуляция иммунного гомеостаза. – Л., 1986. – С. 152-154.
5. *Пол У.* Иммунология. – М.: Мир, 1987. – Т. I. – 476 с.
6. *Резникова А.С.* Комплемент и его значение в иммунологических реакциях. – М.: Медицина, 1967. – 204 с.
7. *Тронько М.Д., Олійник Б.В., Бойко М.Г. та ін.* Стимуляція лімфоцитопоезу небілковим чинником селезінки // Фізіол. журн. – 1998. – **44**, № 3. – С. 197-198.
8. *Фримель Х.* Иммунологические методы. – М.: Мир, 1979. – 518 с.
9. *Чернушенко Е.Ф., Круглова И.Ф., Круглов Ю.В.* Модификация метода определения цитотоксической активности киллерных клеток. Информ. письмо. – К., 1989.
10. *Bach J.F., Biozzi G., Greaves M.F. et al.* Summary of round table discussion on the technical aspects of the rosette test // Transplant. Proc. – 1972. – **4**. – P. 335-337.
11. *Homeister G.W., Satoh P., Lucchesi B.R.* Effect of complement activation in the isolated heart. Role of the terminal complement components // Circulat. Res. – 1992. – **71**. № 2. – P. 303-319.
12. *Morgen B.P.* Clinical complementology: Recent progress and future trends // Eur. J. Invest. – 1994. – **24**, № 4. – P. 219-228.
13. *Mossakowska D.E., Scesney S.M., Marsh H.C., Smith A.C.* Synergistic inhibition of complement activation by soluble CR₁ and low M₂ protease inhibitor BRL 248 94 A / J. Cell. Biochem. – 1994. – Suppl. 18d. – P. 158.
14. *Walport M.I.* Inherited complement deficiency. Clues to the physiological activity of complement *in vivo* // Quart. S. Med. – 1993. – **86**, № 6. – P. 355-358.

*Ин-т ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 6.03.99*