

Л. М. Бикова, Г. Л. Синельникова, Б. В. Олійник

## Перебіг реакцій гіперчутливості уповільненого типу та “трансплантат проти хазяїна” під впливом небілкового чинника селезінки

*Исследовано влияние спленозида на реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и “трансплантат против хозяина” (РТПХ), течение которых зависит от иммунологической активности Т-лимфоцитов. Установлено, что даже однократное введение спленозида в дозе 50 мкг/10 г усиливает реакцию “трансплантат против хозяина” у новорожденных мышей-гибридов F<sub>1</sub>. На реакцию ГЗТ спленозид влияет дозозависимо, а именно: в дозе 50 мкг/10 г фактор усиливает, а в дозе 100 мкг/10 г – тормозит эту реакцию.*

### ВСТУП

Виділений з селезінки низькомолекулярний (М<1000Да) імунотропний чинник спленозид за хімічними властивостями відноситься до нуклеозидів і характеризується широким спектром біологічної активності [3]. Спленозид стимулює проліферацію кортизон- і радіорезистентних субпопуляцій Т-лімфоцитів та їх диференціювання, активує цитотоксичність природних клітин-кілерів, посилює імунну відповідь на тимусзалежні антигени та пригнічує алергійні реакції негайного типу [1, 3, 6].

Метою нашого дослідження було вивчення формування деяких інших ланок імунологічної реактивності, зокрема реакцій гіперчутливості уповільненого типу (ГУП) та “трансплантат проти хазяїна” під впливом спленозиду.

### МЕТОДИКА

Вивчення впливу спленозиду на ГУП проводили на мишах-самцях лінії СВА 5 - 6 місячного віку масою 20 – 25 г. Імунізували тварин одноразовим внутрішньоочеревинним

введенням 0,2 мл 5%-ї суспензії еритроцитів барана. Дослідним мишам вводили спленозид у дозах 50 мкг та 100 мкг на 10 г маси тіла внутрішньоочеревинно щодобово протягом 3 діб. Контрольні тварини одержували відповідний вміст ізотонічного розчину NaCl. На 5-ту добу експерименту тваринам у підшву задньої лівої лапи (дослідної) вводили 10<sup>8</sup> клітин еритроцитів барана, розведених у 0,02 мл ізотонічного розчину NaCl, а в праву (контрольну) лапу – ізотонічний розчин у такому ж об’ємі. Реакцію оцінювали через 24 год за різницею маси дослідної і контрольної лап. Після легкого ефірного наркозу тварин декапітували, відрізали вище п’яточного суглоба обидві стопи і зважували. Індекс реакції (ІР) обчислювали для кожної тварини за формулою [2]:

$$IP = \frac{D - K}{K} \times 100 \%$$

Контрольними групами були імунізовані миші, які не отримували препарат, та інтактні миші, котрі не були імунізовані, але отримали розв’язуючу дозу антигену.

Реакцію “трансплантат проти хазяїна” оцінювали за індексом збільшення селезінки

(ІЗС) [5]. У досліджах використовували мишей ліній СВА, С<sub>57</sub>В1/6 і гібридів першого покоління F<sub>1</sub> (СВА х С<sub>57</sub>В1). Гібридні тварини у віці 1 – 3 доби були реципієнтами лімфоїдних клітин однієї з батьківських ліній. За цих умов здатність розвитку реакції донорських клітин проти алоантигенів реципієнта детерміновано генетично [7]. Їм вводили через м'язи стегна (щоб завись не витікала) підшкірно, а потім внутрішньоочеревинно 10<sup>8</sup> лімфоцитів однієї з батьківських ліній, розведених у 0,1 мл середовища Ігла. ІЗС визначали через 10 діб. Контрольна група складалася з мишей того ж приплоду, яким вводили сингенні клітини (від гібриду F<sub>1</sub>). На 10-ту добу тварин зважували, декапітували під легким ефірним наркозом, вилучали селезінку та визначали її масу. ІЗС розраховували за формулою:

$$\text{ІЗС} = \text{Mg} / \text{Mk},$$

де Mg - відносна маса селезінки дослідних мишей, Mk - відносна маса селезінки контрольних мишей.

Позитивною реакцією “трансплантат проти хазяїна” вважали ту, при якій ІЗС був вищий ніж 1,3.

Для дослідження впливу спленозиду на активність лімфоцитів у реакції “трансплантат проти хазяїна” мишам-гібридам F<sub>1</sub> разом з лімфоцитами батьківської лінії внутрішньоочеревинно вводили спленозид у дозі 50 мкг / 10 г, розведений у 0,1 мл середовища Ігла. Застосування саме цієї дози спленозиду було зумовлено результатами експериментів з вивчення впливу спленозиду на масу селезінки новонароджених гібридів. Оскільки спленозид прискорює відновлення маси лімфоїдних органів у разі експериментальних імунодефіцитів [3, 6], необхідно було в'ясувати, чи не вплине спленозид (без лімфоцитів) на масу селезінки у мишей-гібридів. Тому 3-добовим мишам-гібридам однократно вводили спленозид по 50 мкг / 10 г і 100 мкг / 10 г. На 10-ту добу визначали відносну масу селезінки в цій групі тварин.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спленозид дозозалежно впливає на реакцію ГУТ, а саме в дозі 50 мкг / 10 г маси препарат підсилює, а в дозі 100 мкг / 10 г – гальмує цю реакцію: індекс реакції у інтактних мишей становив 8,6% ± 1,3% (n=6), у контрольних мишей – 17,8% ± 1,3% (n=23), у мишей, які одержали 50 мкг / 10 г спленозиду – 24,3% ± 1,6% (n=22), а у мишей, яким вводили спленозид у дозі 100 мкг / 10 г – 10,8% ± 1,6% (n=9). Різниця між кожною з груп тварин статистично достовірна (P < 0,01). Пояснення дозозалежного впливу препарату на ГУТ може бути таким. Біологічна активність спленозиду проявляється на різних моделях імунної відповіді на неоднакові антигени, тому цей чинник слід розглядати як поліклональний Т-клітинний стимулятор. Відомо, що активність Т-клітин, які посилюють імунні реакції, пропорційна їх кількості і має лінійну залежність. Для Т-супресорів, навпаки, залежність дії від їх кількості є пороговою. Малі дози препарату незначно стимулюють проліферацію Т-клітин, кількість супресорів при цьому не сягає критичної величини і вони не можуть проявити супресорну активність. Водночас, стимуляція проліферації інших субпопуляцій Т-клітин призводить до підсилення реакції ГУТ. Інша ситуація при введенні тваринам великих доз препарату. В цьому випадку посилена проліферація лімфоїдних клітин спричинює накопичення Т-супресорів, їх кількість сягає порогової, і в результаті є всі умови для реалізації їх гальмівного ефекту на реакції імунітету, а саме реакції ГУП.

Для дослідження впливу спленозиду на інтенсивність реакції “трансплантат проти хазяїна” слід було застосувати таку дозу спленозиду, яка б не вплинула на масу селезінки новонароджених тварин. Спленозид, введений 3-добовим мишам-гібридам у дозі 100 мкг / 10 г, на 10-ту добу зменшує відносну масу селезінки (29,21 ± 0,31; n=5) порівняно з контрольними тваринами (34,72 / 10 г ± 0,59 мг / 10 г; n=5, P < 0,001;), тоді як спленозид, введений в дозі 50 мкг / 10 г,

не впливає на цей показник ( $34,84 \pm 0,22$ ;  $n=5$ ). Саме тому в експериментах з вивчення впливу спленозиду на розвиток реакції “трансплантат проти хазяїна”, використовували препарат в дозі 50 мкг/ 10 г. Результати цих експериментів показали, що трансплантація  $10^8$  лімфоцитів мишей СВА (одна з батьківських ліній) гібридним 3-добовим мишам супроводжується збільшенням маси селезінки ( $59,91/ 10 \text{ г} \pm 0,72 \text{ мг}/ 10 \text{ г}$ ;  $n=5$ ) порівняно з тваринами, яким вводили  $10^8$  лімфоцитів мишей-гібридів (тобто, сингенні клітини) ( $39,34/ 10 \text{ г} \pm 0,47 \text{ мг}/ 10 \text{ г}$ ;  $n=5$ ,  $P < 0,001$ ). ІЗС у цьому випадку становив 1,39. При введенні мишам-гібридам разом з лімфоцитами батьківської лінії спленозиду в дозі 50 мкг/ 10 г, відносна маса селезінки була  $82,44/ 10 \text{ г} \pm 8,41 \text{ мг}/ 10 \text{ г}$  ( $n = 5$ ,  $P < 0,02$ ), ІЗС - 2,09.

Таким чином, результати дослідження свідчать про те, що навіть одноразове введення спленозиду посилює реакцію “трансплантат проти хазяїна” у мишей-гібридів  $F_1$ . Відомо, що індукція реакції “трансплантат проти хазяїна” залежить від взаємодії двох функціонально різних класів Т-клітин:  $T_1$ -незрілих кортизончутливих лімфоцитів з фенотипом  $Lyt - 2,3^+$  та  $T_2$ -зрілих кортизонрезистентних клітин з фенотипом  $Lyt - 1^+$ . Механізм цієї взаємодії не з'ясований. Також не встановлено, чи належать  $T_1$ - та  $T_2$ -клітини до автономних популяцій лімфоцитів, чи  $T_2$ -клітини є нащадками  $T_1$ -клітин. Проте, відомо, що інтенсивність реакції “трансплантат проти хазяїна” пропорційна вмісту Т лімфоцитів [4]. Оскільки спленозид діє на зрілу кортизонрезистентну популяцію Т-лімфоцитів, індукуючи їх проліферацію [3, 6], тобто сприяє генерації саме тих лімфоцитів, які беруть участь у розвитку реакції “трансплантат проти хазяїна”, то можна припустити, що в цьому полягає механізм стимулюю-

чої дії спленозиду на реакцію “трансплантат проти хазяїна”.

**L.M.Bykova, G.L.Sinelnikova, B.V.Oliynik**

### **COURSE OF DELAYED – TYPE HYPERSENSITIVITY AND GRAFT VERSUS HOST REACTIONS UNDER THE INFLUENCE OF SPLEEN NONPEPTIDE FACTOR**

The effects of splenoside on the reactions of delayed – type hypersensitivity and graft versus host were investigated. Even single splenoside injection (50 mg/ 10g b.w.) increased graft versus host reaction in newborn mice – hybrids  $F_1$ . Splenoside influences the delayed – type hypersensitivity reaction in dose – depending manner: the dose of 50 mg/ 10g increases the reaction and 100 mg/ 10g decreases it.

*V.P.Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бикова Л.М., Бойко М.Г., Олійник Б.В. Стимуляція цитотоксичної активності натуральних клітин кілерів небілковим чинником селезінки // Фізіол.журн. - 1998. - 44, № 3. - С.204.
2. Бутенко Г.М., Гершіна О.П., Максимов Ю.М. та ін. Експериментальне вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів - Методичні рекомендації. - К., МОЗ АМН України, фармакол. комітет МОЗ України. - 1998.
3. Олейник Б.В. Небелковий фактор из селезенки. - В кн.: Регуляция иммунного гомеостаза. Л., 1986. - С. 152-154.
4. Пол У. Иммунология. - М.: Мир, 1989. - 800 с.
5. Тесенов В. Реакция «трансплантат против хозяина» на мышья-гибридах первого поколения. - В кн.: Иммунологические методы / Под ред. Фриделя. - М., Мир, 1979. - С. 182 – 187.
6. Тронько М.Д., Олійник Б.В., Бойко М.Г. та ін. Стимуляція лімфоцитопоезу небілковим чинником селезінки // Фізіол. журн. 1998. - 44, N3. - С. 197-199.
7. Труфакин В.А., Шмаков А.Н. Иммунная система и ее регуляторная роль в процессах пролиферации и дифференцировки в организме // Вест. АМН СССР. - 1991. - № 12. - С.23-29.

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

*Матеріал надійшов до редакції 28.03.2000*