Український Радіологічний Журнал
© Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва (2001) **УРЖ 2001; 9:** 404 - 406

Г.А. Зубкова, Т.І. Давидова
В.М. Славнов, Н.О. Ковпан
В.В. Марков, Є.В. Лучицький

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України, м. Київ

Вплив тимогену на Т-клітинну супресорну активність та рівень лімфоцитарного гамма-інтерферону в опромінених мишей лінії СВА

Influence of Thymogen on T-cell suppressor activity and the level of lymphocyte gamma-interferon in irradiated CBA mice

Цель работы: Изучить влияние тимогена на супрессорную активность Т-лимфоцитов и уровень лимфоцитарного гамма-интерферона у мышей после общего облучения.

Материалы и методы: Эксперименты проведены на мышах линии СВА, подвергнутых общему одноразовому икс-облучению в дозе 5 Гр на аппарате РУМ-17 (напряжение – 200 кВ, сила тока – 10 мА, фильтры – 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, фокусное расстояние – 50 см, мощность дозы – 0,48 Гр/мин). Тимоген вводили через 5 суток после радиационного воздействия – 7 инъекций подряд внутримышечно, в дозе 0,1 мкг. Исследование проводили на 5-й и 15-й день после облучения (спустя 3 суток после последнего введения препарата).

Результаты: Итоги исследования свидетельствуют, что общее облучение мышей вызывает существенное нарушение функциональной активности Т-лимфоцитов-супрессоров и значительно снижает способность лимфоцитов синтезировать гамма-интерферон в ответ на митоген. Курс иммунотерапии тимогеном восстанавливает супрессорную активность Т-лимфоцитов и уровень лимфоцитарного гамма-интерферона.

Выводы: На 5-й и 15-й день после икс-облучения у мышей достоверно снижается супрессорная активность Кон-А-индуцированых Т-лимфоцитов и способность лимфоцитов крови синтезировать гамма-интерферон в ответ на митоген. Введение тимогена восстанавливает Т-клеточную супрессорную активность и уровень лимфоцитарного гамма-интерферона.

Ключевые слова: общее облучение, супрессорная активность Т-лимфоцитов, гамма-интерферон, тимоген.

Objective: To study the influence of Thymogen on the suppressor activity of T-lymphocytes and the level of lymphocyte gamma-interferon in mice after total irradiation.

Material and Methods: The experiment was performed on CBA mice exposed to single total x-ray irradiation at a dose of 5 Gy using РУМ-17 unit (voltage 200 kV, amperage 10mA, filters 0.5 mm Cu + 1.0 mm Al, focal distance 50 cm, dose rate 0.48 Gy/min). Thymogen was administered 5 week after the exposure, 7 intramuscular injections in a dose of 0.1 µg. The study was done on the 5th and 15th days after the exposure (3 days after the last injection of the preparation).

Results: The results of the study suggested that total irradiation of the animals caused significant disturbances in the functional activity of T-suppressors and considerably reduced the ability of lymphocytes to produce gamma-interferon in response to the mitogen. The course of immune therapy restored suppressor activity of T-lymphocytes and the level of lymphocyte gamma-interferon.

Conclusion: On the 5th and 15th days after x-ray exposure of the mice, suppressor activity of Kon-A-induced T-lymphocytes as well as the capability of blood lymphocytes to produce gamma-interferon in response to mitogen decrease. Administration of Thymogen restores cellular suppressor activity and the level of lymphocyte gamma-interferon.

Key words: total irradiation, suppressor activity of T-lymphocytes, gamma-interferon, Thymogen.

Виняткова роль системи імунітету в забезпеченні гомеостазу та висока радіочутливість імунокомпетентних клітин дозволяють припустити, що переважна більшість медико-біологічних наслідків радіоактивного забруднення навколишнього середовища залежить від ступеня імунних порушень [1].

Відомо, що ураження імунокомпетентних клітин супроводжується частковою дисоціацією ДНК-мембранного комплексу та призводить до вторинного імунодефіциту, який проявляється аутоалергічними реакціями, опортуністичними інфекціями, онкологічною патологією, генетичними порушеннями та рядом інших ускладнень [2, 3]. Структура і вираженість імунологічної недостатності залежать від характеру й дози опромінення, а також початкового фізіологічного стану організму.

Результати радіаційного ураження імунокомпетентних клітин можуть проявитися і найближчим часом після радіаційного впливу, і у віддаленному періоді. При цьому при опромінюванні в першу чергу страждають функціональні властивості імунокомпетентних клітин, однією з найважливіших серед яких є здатність синтезувати цитокіни [3, 4].

Доведено, що зовнішнє опромінювання викликає глибокі структурні і функціональні зміни у лімфоїдних органах та у стані окремих регуляторних субпопуляцій лімфоцитів [1]. Як правило, виходять з уявлення про те, що порушення органів та лімфоїдних популяцій є результатом виключно пошкоджуючої дії опромінення. В той же час існує багато доказів його супресорного ефекту [1]. Відомо, що ступінь уражуючої дії опромінення на лімфоцити в цілому високий [2]. Зниження кількості тимоцитів реєструється вже при дозах, близьких до 0,02 Гр. Майже половина тимоцитів кіркового шару тимуса гине при дозах 0,02–0,03 Гр [3]. Зниження загальної кількості лімфоцитів крові при радіаційному впливі більшість авторів пояснюють ураженням радіочутливих клітин, до яких належать і Т-лімфоцити-супресори. За даними H. Rose [4], їх активність значно пригнічується при опроміненні клітин селезінки в дозі 0,15–0,25 Гр.

Але R.E. Anderson [3] наводить дані, які свідчать про існування Т-лімфоцитів-супресорів, здатних функціонувати після опромінювання дозою 20 Гр. Наведені вище відомості свідчать про порушення імунних механізмів, внаслідок яких формуються радіаційні імунодефіцити. Сучасним проблемам імунокорекції відповідає пошук шляхів впливу на окремі субпопуляції імунокомпетентних клітин, особливо на регуляторні лімфоцити з гальмуванням чи активізацією їх функцій. Виправданим, на думку дослідників, вважається застосування препаратів тимуса або їх синтетичних аналогів, що активізують процеси диференцировки імунокомпетентних клітин.

Ефект дії препаратів вилочкової залози залежить від конкретних проявів патологічного процесу, величини досліджуваного імунологічного показника та виду препарату [5]. Найбільш поширеним синтетичним пептидом тимуса є тимоген, який складається з двох амінокислот (глутаміл—триптофан). Клітинами-мішенями для тимогену є Т-лімфоцити, що знаходяться на різних стадіях диференцировки — від кістково-мозкових попередників до периферійних зрілих Т-клітин.

Виходячи з цього, мета наших досліджень полягала у вивченні впливу імунокоректора тимогену на супресорну активність Т-лімфоцитів та рівень лімфоцитарного гамма-інтерферону у мишей після зовнішнього опромінювання.

Методика дослідження

Експерименти проводили на мишах лінії CBA, підданих тотальному одноразовому ікс-опромінюванню в дозі 5 Гр на апараті РУМ-17 (напруга — 200 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри — 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, фокусна відстань — 50 см, потужність дози — 0,48 Гр/хв). Тимоген вводили починаючи з 5-ї доби після радіаційної дії — 7 ін'єкцій поспіль внутрім'язово в дозі 0,1 мкг за одне введення. Дослідження виконували на 5-ту та 15-ту добу після опромінювання (через 3 доби після останньої ін'єкції препарату).

Функціональну активність конканавалін-А-індукованих (Кон-А) Т-лімфоцитів-супресорів вивчали за ступенем інгібіції проліферативної відповіді лімфоцитів методом подвійної мітогенної стимуляції [6].

Рівень гамма-інтерферону визначали в стандартному тесті пригнічення цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту в культурі фібробластів [7]. Лімфоцити крові виділяли в градієнті щільності фікол-урографіну, після чого культивували в присутності Кон-А (20 мкг на 1 млн клітин) у середовищі Ігла з 10%-вої сироватки великої рогатої худоби протягом 24 годин. Отриманий супернатант являв собою матеріал для вивчення. За одиницю активності інтерферону приймали величину, зворотну його розведенню, в якому на 50% затримується деструкція моношару фібробластів, виражену в $\log_2$.

Результати обробляли методом варіаційної статистики [8] з використанням мікрокалькулятора «Електроніка МК-61» і відповідних програм. За вірогідні приймали показники при $p<0,05$ за таблицею Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Дослідження показали, що загальне опромінення мишей призводить до суттєвих порушень функціональної активності Т-лімфоцитів-супресорів. Зовнішнє опромінювання тварин вірогідно знижувало супресорну функцію лімфоцитів як на 5-ту, так і на 15-ту добу після радіаційного впливу (49,09% — інтактні; 25,94% — через 5; 32,37% — через 15 діб після опромінювання). Процент супресії через 5 діб був у 1,9, а через 15 діб — у 1,5 разу меншим порівняно з контролем ($p<0,05$).

Проведення імунотерапії тимогеном при зовнішньому опромінюванні відновлювало супресорну активність Т-лімфоцитів через 15 діб після радіаційної дії (табл. 1). У цей час процент супресії у тварин під впливом тимогену зростав від 32,37% до 45,41% ($p<0,05$), в результаті чого зникали вірогідні зміни порівняно з групою інтактних мишей.

Таким чином, при ікс-опроміненні мишей у дозі 5 Гр послаблюється супресорна активність Кон-А-індукованих Т-лімфоцитів. Ступінь послаблення залежить від тривалості часу, що минув після опромінювання. Введення тимогену в ранній пе-

Таблиця 1 — Функціональна активність Т-лімфоцитів-супресорів у опромінених мишей під впливом тимогену, %
Thymogen influence on the functional activity of T-suppressors in the exposed animals (%)

Група тварин	M ± m	n	p	p_1
Інтактні	49,09±1,75	12	—	—
Інтактні + тимоген	51,28±2,00	11	> 0,05	< 0,001
5 діб після опромінювання	25,94±1,79	11	< 0,05	—
15 діб після опромінювання	32,37±1,67	11	< 0,05	< 0,05
Опромінювання + тимоген	45,41±2,84	12	> 0,05	< 0,05

Примітка. Вірогідно відносно: p — групи інтактних;
p_1 — групи тварин «5 діб після опромінювання».

ріод після опромінювання мишей летальними дозами іонізувальної радіації приводить до відновлення Т-клітинної супресорної активності.

Здатність лімфоцитів крові опромінених тварин синтезувати гамма-інтерферон на 5-ту добу після радіаційного впливу знижена у 2,4 разу (p< 0,001) порівняно з інтактними (табл. 2). Через 15 діб після опромінювання, незважаючи на вірогідне зростання показника (порівняно з 5-ю добою), рівень лімфоцитарного гамма-інтерферону не досягає такого у інтактних тварин.

При використанні тимогену в опромінених мишей спостерігалась значна здатність лімфоцитів крові до синтезу гамма-інтерферону.

Отримані нами результати вказують на значні порушення в системі імунітету при зовнішньому опромінюванні. Цей факт можна пояснити як прямою дією опромінення на лімфоїдні клітини, так і ураженням тимуса та тимусзалежного ланцюга імунної системи [1–3]. Крім того, загальновідомо, що променеве ураження активізує секрецію глюкокортикоїдів, які додатково пригнічують функцію імунної системи [9]. Використання синтетичного пептиду тимуса тимогену відновлює Т-клітинну супресорну активність та здатність лімфоцитів крові синтезувати гамма-інтерферон.

Таблиця 2 — Рівень гамма-інтерферону в культуральному середовищі лімфоцитів крові мишей під впливом тимогену, $1/\log_2$
Thymogen influence on the level of gamma-interferon in the culture of blood lymphocyte of the mice ($1/\log_2$)

Група тварин	M ± m	n	p	p_1
Інтактні	3,13 ± 0,13	10	—	—
Інтактні + тимоген	3,83 ± 0,26	11	< 0,05	< 0,001
5 діб після опромінювання	1,28 ± 0,16	10	< 0,001	—
15 діб після опромінювання	2,57 ± 0,20	10	< 0,05	< 0,05
Опромінювання + тимоген	3,63 ± 0,26	11	> 0,5	< 0,001

Примітка. Вірогідно відносно: p — групи інтактних;
p_1 — групи тварин «5 діб після опромінювання».

Висновки

1. На 5-ту та 15-ту добу після ікс-опромінювання в дозі 5 Гр у мишей вірогідно знижується супресорна активність Кон-А-індукованих Т-лімфоцитів та здатність лімфоцитів крові синтезувати гамма-інтерферон у відповідь на мітоген.
2. В результаті введення тимогену відновлюються Т-клітинна супресорна активність та рівень лімфоцитарного гамма-інтерферону.

Література

1. *Савина Н.П., Ярилин А.А. // Иммунол. — 1994. — №4. — С. 39-43.*
2. *Жербин Е. А.,Чухловин А.Б. Радиационная гематология. — М.: Медицина, 1989.*
3. *Anderson R. E., Warner N.Z. // Advanc. Immunil. — 1976. — Vol. 24. —P. 215-335.*
4. *Rose H., Moldenhaur H., Kehrberg G. // Radiobiol. — 1985. — Vol. 26. — P. 289-297.*
5. *Чеботарев В.Ф., Котляренко Н. Н. // Актуальні проблеми екології, клінічної імунології та інфекційної патології: Матер. 3 наук. симпоз. — Луганськ, 1995. — С. 113-114.*
6. *Павлюк А.С., Крюкова Б. В., Петров Р. В. и др. Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов у человека: Т-супрессоры и Т-помощники: Метод. рекомендации. — М., 1988. — 28 с.*
7. *Ho M., Enders J.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1959. — Vol. 45, № 5. — P. 385-389.*
8. *Поляков А.В., Юдицкий Я.А. Статистические расчеты на программируемых калькуляторах: Метод. указания и программы для научно-исследовательской работы, курсового и дипломного проектирования студентов биологических факультетов. — К., 1985. — 53 с.*
9. *Мартыненко С.В., Гриневич Ю.А., Барабой В.А. // Тез. докл. съезда иммунологов России. — Новосибирск, 1992. — С. 29.*

Дата надходження: 02.04.2001.

Дата остаточного надходження: 10.07.2001.

Адреса для листування:
Зубкова Галина Анатоліївна,
Інститут ендокринології та обміну речовин,
вул. Вишгородська, 69, Київ, 04114, Україна