

здоровых доноров в градиенте плотности верографина — фикола [4]. Собранные с интерфазы МК трижды отмывали забуференным физиологическим раствором, после чего клеточную суспензию помещали в культуральную среду RPMI-1640. Идентификацию популяций Т-лимфоцитов осуществляли методами розеткообразования с различными видами тест-эритроцитов. Общее содержание Т-клеток определяли методом розеткообразования с эритроцитами барана — Е-РОК [1]. Содержание активных (ранних) Е-розеткообразующих клеток (Е-РОК_{ак}) проводили методом [8]. Для определения относительного содержания лимфоцитов, образующих розетки с аутологичными эритроцитами, был использован способ [7]. Популяцию лимфоцитов, обогащенную Т-клетками, получали осаждением Е-РОК в градиенте верографина — фикола с последующим лизисом эритроцитов гипоосмолярным шоком. Для оценки влияния ксенобиотиков на субпопуляционную структуру и функциональные свойства лимфоцитов МК предварительно в течение 24 ч инкубировали в культуральной среде, состоящей из среды RPMI-1640, 20 % инактивированной нагреванием при 56 °С сыворотки доноров IV группы крови, 2 мМ глутамин и 40 мкг/мл гентамицина. Клетки инкубировали в присутствии 10 мкМ БА или 10 нМ ТХДД, любезно предоставленного нам доктором Д. Небертом (Национальные институты здоровья, США). После 3-кратной отмытки от ксенобиотиков оценивали функциональные свойства обработанных лимфоцитов. Активность естественных киллеров (ЕК) определяли по их способности лизировать клетки мишени — К-562 [3]. Для оценки пролиферативной активности МК лимфоциты в количестве 10^6 на лунку стимулировали конканавалином А (Кона) в концентрации 25 мкг/мл в круглодонных планшетах для иммунологических исследований. Интенсивность пролиферации оценивали по включению ³Н-тимидина. В ряде экспериментов в качестве регуляторов пролиферации лимфоцитов использовали МК (10^6 на лунку), обработанные в течение 45 мин при 37 °С митомицином С (Мит С) в концентрации 35 мкг/мл. Для оценки активности бензпиренгидроксилазы к свежeweыделенным или стимулированным в течение 72 ч фитогемагглютинином (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл клеткам добавляли в качестве индуктора монооксигеназной системы — БА в концентрации 10 мкА. Активность бензпиренгидроксилазы определяли по количеству продукта ферментативной реакции — 3-оксисбензпирену на 1 млн клеток за 1 мин с помощью модифицированного нами метода [2]. Индекс индуцибельности определяли отношением активности фермента в индуцированных МК к активности фермента в интактных (контрольных) лимфоцитах.

Результаты исследования. Как следует из табл. 1, митогенная стимуляция способствует значительному усилению активности бензпиренгидроксилазы, как в контрольных, так и индуцированных БА мононуклеарах и не влияет на индекс индуцибельности фермента. В интактных МК, преинкубированных в течение 24 ч с БА, отмечается существенное изменение субпопуляционной структуры Т-клеток. Содержание лимфоцитов с маркерами зрелых активных Е-РОК среди МК,

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.916:661.715.6].017:615.277.4].015.44:616.155.32-018.15

Ключевые слова: лимфоциты, пролиферация, ксенобиотики, бензпиренгидроксилаза

А. Л. Лозовацкий, В. А. Осташевский,
О. М. Перминова, В. А. Козлов, И. Б. Цырлов

БЕНЗ(А)АНТРАЦЕН И 2, 3, 7, 8-ТЕТРАХЛОРДИБЕНЗО(Р)ДИОКСИН МОДУЛИРУЮТ МИТОГЕНСТИМУЛИРОВАННУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ

Лаборатория ксенобиохимии (зав.— доктор биол. наук И. Б. Цырлов) Института клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения АМН СССР, Новосибирск

Представлена акад. АМН СССР В. П. Казначеевым

Полициклические ароматические углеводороды и полигалоидированные ароматические углеводороды являются наиболее опасными для здоровья человека ксенобиотиками [5]. В настоящей работе исследованы функциональные свойства мононуклеарных клеток (МК) периферической крови человека при воздействии на них бенз(а)антрацена (БА) и 2,3,7,8-тетрахлордibenзо(Р)диоксина (ТХДД) в различных условиях инкубации лимфоцитов.

Методика исследования. МК выделяли центрифугированием гепаринизированной крови

Активность бензпиренгидроксилазы в культуре интактных и ФГА-стимулированных лимфоцитов человека

МК	Без БА	С БА	Индекс индукцибельности
	10 ⁻¹² М 3-оксибензпирена на 1 млн клеток за 1 мин		
ФГА-стимулированные (инкубация в течение 96 ч, внесение БА за 24 ч до конца инкубации) (n=58)	0,52±0,08	1,24±0,14	3,6±0,52
Свежевыделенные (инкубация без митогена в течение 24 ч в присутствии БА) (n=12)	0,016±0,004	0,07±0,02	5,4±1,70
<i>p</i>	<0,01 (<i>t</i> -критерий Стьюдента)	<0,01	>0,05

преинкубированных с БА почти в 2 раза превысило количество Е-РОК_{ак} среди клеток, не обработанных ксенобиотиком, и составило соответственно 79±7,3 и 48,6±9,8 % (n=6, p=0,05 — парный критерий Вилкоксона). После инкубации с БА менее зрелые Т-клетки с рецепторами к аутологичным эритроцитам — ауто-РОК практически исчезли из культуры МК. Так, исходное содержание ауто-РОК среди свежевыделенных Т-клеток в среднем составило 28,4±3,3 %. После инкубации с БА в течение 24 ч этот показатель снизился до 2,7±1,4 %. Среди контрольных лимфоцитов, преинкубированных без ксенобиотика, содержание ауто-РОК составило 8,8±1,0 % (n=5, p=0,05 — парный критерий Вилкоксона). Не отмечено увеличения процентного содержания погибших клеток или снижения общего числа МК по сравнению с контрольными лимфоцитами, не обработанными ксенобиотиками в указанных выше концентрациях.

Прирост относительного количества зрелых Т-лимфоцитов сопровождается изменением функциональных свойств МК. Преинкубация клеток с БА ведет к снижению их ЕК-активности. Средний процент лизиса клеток-мишеней — К-562 лимфоцитами, обработанными в течение 24 ч БА, составил 22,0 %. Тот же показатель для клеток, преинкубированных без ксенобиотика, был равен 29 % (n=5, p=0,05 — парный критерий Вилкоксона).

Предшествующая митогенной стимуляции обработка покоящихся клеток в течение 24 ч БА или ТХДД способствует усилению бласттрансформации лимфоцитов. Так, пролиферативный ответ

МК, преинкубированных с БА или ТХДД увеличивался соответственно на 21 % (n=11, p=0,068 — точный метод Фишера) и 38,5 % (n=7, p=0,01 — парный критерий Вилкоксона) по сравнению с контрольными клетками, преинкубированными без ксенобиотиков. Интересно отметить, что МК, преинкубированные в течение 24 ч с БА или ТХДД и стимулированные затем Кон А, после обработки Мит С, обладают достоверно большей способностью усиливать бласттрансформацию свежевыделенных аллогенных лимфоцитов по сравнению с контрольными клетками, не обработанными предварительно ксенобиотиками (табл. 2). Постоянное же присутствие БА в культуре МК на протяжении всего периода культивирования клеток с Кон А подавляет пролиферативный ответ лимфоцитов в среднем на 20 % (n=6, p=0,01 — парный критерий Вилкоксона).

Хотелось бы отметить, что сложившиеся представления о ксенобиотиках — индукторах монооксигеназной системы, как о веществах, обладающих исключительно токсической, супрессорной активностью, верно только для определенных условий воздействия этих соединений на лимфоциты. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что падение пролиферативной активности наблюдается в культуре клеток, стимулированных митогеном на фоне высокой активности бензпиренгидроксилазы, одной из форм цитохрома Р=450. Низкая активность фермента в покоящихся клетках, по всей видимости, не способствует образованию достаточного количества метаболитов, как известно, обладающих генотоксическими свойствами [6]. В этих условиях инкубации лимфоцитов увеличивается относительное содержание зрелых Т-клеток, усиливается митогенстимулированная пролиферация и хелперная активность преинкубированных МК, снижается их естественная цитотоксичность.

Таким образом, при одной и той же концентрации ксенобиотика способны модулировать функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Это свойство широко распространенных соединений может, на наш взгляд, оказывать существенное влияние на работу иммунной системы, в связи с чем требует дальнейшего изучения.

Таблица 2

Пролиферативный ответ МК в присутствии лимфоцитов, преинкубированных с БА или ТХДД

№	МК _{св} I	МК _{св} +МК _к II	МК _{св} +МК _{БА} III	МК _{св} +МК _{ТХДД} IV
1 ^a	2,4 ^b	3,0	4,1	3,8
2	2,9	3,5	5,4	4,2
3	2,3	3,2	6,5	3,6
4	1,4	2,8	4,0	3,5
М	2,3	3,1	5,0	3,8

Примечание. ^a свежевыделенные МК (МК_{св}) стимулировали Кон А в течение 96 ч отдельно или в присутствии Мит С-обработанных МК, преинкубированных 24 ч с БА (МК_{БА}) или ТХДД (МК_{ТХДД}). В качестве контроля к стимулированным лимфоцитам добавляли клетки, преинкубированные без ксенобиотиков (МК_к)^b число импульсов за 1 мин · 10⁴. I—II — p=0,05, I—III и I—IV — p<0,05, II—III — p<0,05, II—IV — p=0,05 (критерий Вилкоксона — Манна — Уитни).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лозовацкий А. Л., Шубинский Г. З., Козлов В. А. // Иммунологические аспекты лимфолиферативных заболеваний. — Новосибирск, 1987. — С. 138—146.
2. Остаевский В. А., Наров Ю. Э., Цырлов И. Б. // Вопр. онкол. — 1987. — Т. 33, № 11. — С. 62—65.

3. Рыкова М. П., Спиранде И. В., Зедгенидзе М. С. и др. // Иммунология.— 1981.— № 3.— С. 88—90.
4. Хейфец Б. Б., Абалкин В. А. // Лаб. дело.— 1973.— № 10.— С. 579—581.
5. Harris C. C., Vahakangas K., Newman M. J. et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— Vol. 82, N 10.— P. 6672—6676.
6. Leadon S. A., Stampfer M. R., Bartley J. // Ibid.— 1988.— Vol. 85, N 12.— P. 4365—4368.
7. Palacios R., Alarcon-Segovia D., Llorente L. et al. // Immunology.— 1981.— Vol. 42, N 1.— P. 127—135.
8. Yu D. T. J. // J. Immunol.— 1975.— Vol. 115, N 1.— P. 91—93.

Поступила 10.11.89

MODULATION OF THE LYMPHOCYTES PROLIFERATION BY BENZO(A)ANTHRACENE AND 2,3,7,8-TETRACHLORO-DIBENZO-P-DIOXIN

A. L. Lozovatsky, V. A. Ostashevsky, O. M. Perminova, V. A. Kozlov, I. B. Tsyrlou

Institute of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch, Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk

The influence of benzo(a)anthracene (BA) and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on functional properties of peripheral blood mononuclear cells (PBC) has been investigated. Incubation of mitogen-stimulated cells in the presence of xenobiotics induced high activity of benzo(a)pyrene-hydroxylase (BH) and suppressed lymphocyte blast transformation. Preincubation of unstimulated PBC with BA and TCDD caused insignificant increase of BH activity. The results show modulated effect of xenobiotics on functional properties of PBC.