

УДК 612.112.94-06:612.438.018-085.2

Ключевые слова: лимфоциты человека; субпопуляции лимфоцитов; тимозин.

С. М. Шергин, Г. З. Шубинский,
В. С. Кожевников, М. И. Мусатов, О. Т. Кудаева,
В. С. Туаев

ВЛИЯНИЕ ТИМОЗИНА НА СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *in vitro*

Отдел иммунологии (зав.— проф. В. П. Лозовой) Института клинической и экспериментальной медицины СФ АМН СССР, Новосибирск

Представлена акад. АМН СССР В. П. Казначеевым

Многочисленными исследованиями *in vivo* и *in vitro* установлено, что большинство биологически активных веществ тимуса и прежде всего тимозин индуцируют экспрессию маркеров Т-лимфоцитов и усиливают иммунологические реакции, опосредуемые или регулируемые Т-клетками [4, 12, 13]. Экстракты тимуса, содержащие тимозин различной степени очистки, нашли широкое применение в идентификации незрелых предшественников Т-клеток среди лимфоцитов периферической крови человека [9, 12, 13]. Показано, что при ряде иммунопатологических состояний инкубация лимфоцитов с тимозином вызывает увеличение доли Т-лимфоцитов за счет уменьшения количества «нулевых» лимфоцитов [9]. Однако в настоящее время недостаточно исследовано действие тимозина и экстрактов тимуса на экспрессию маркеров, характерных одновременно как для Т-, так и для В-лимфоцитов человека, а также влияние экстрактов тимуса на дифференцировку предшественников В-лимфоцитов. Возможность последнего была продемонстрирована в опытах с лимфоцитами мышей [8].

В настоящей работе изучено действие тимозина (IV фракция экстракта тимуса теленка) *in vitro* на экспрессию маркеров на Т- и В-лимфоцитах.

Методика исследования. Сепариро-

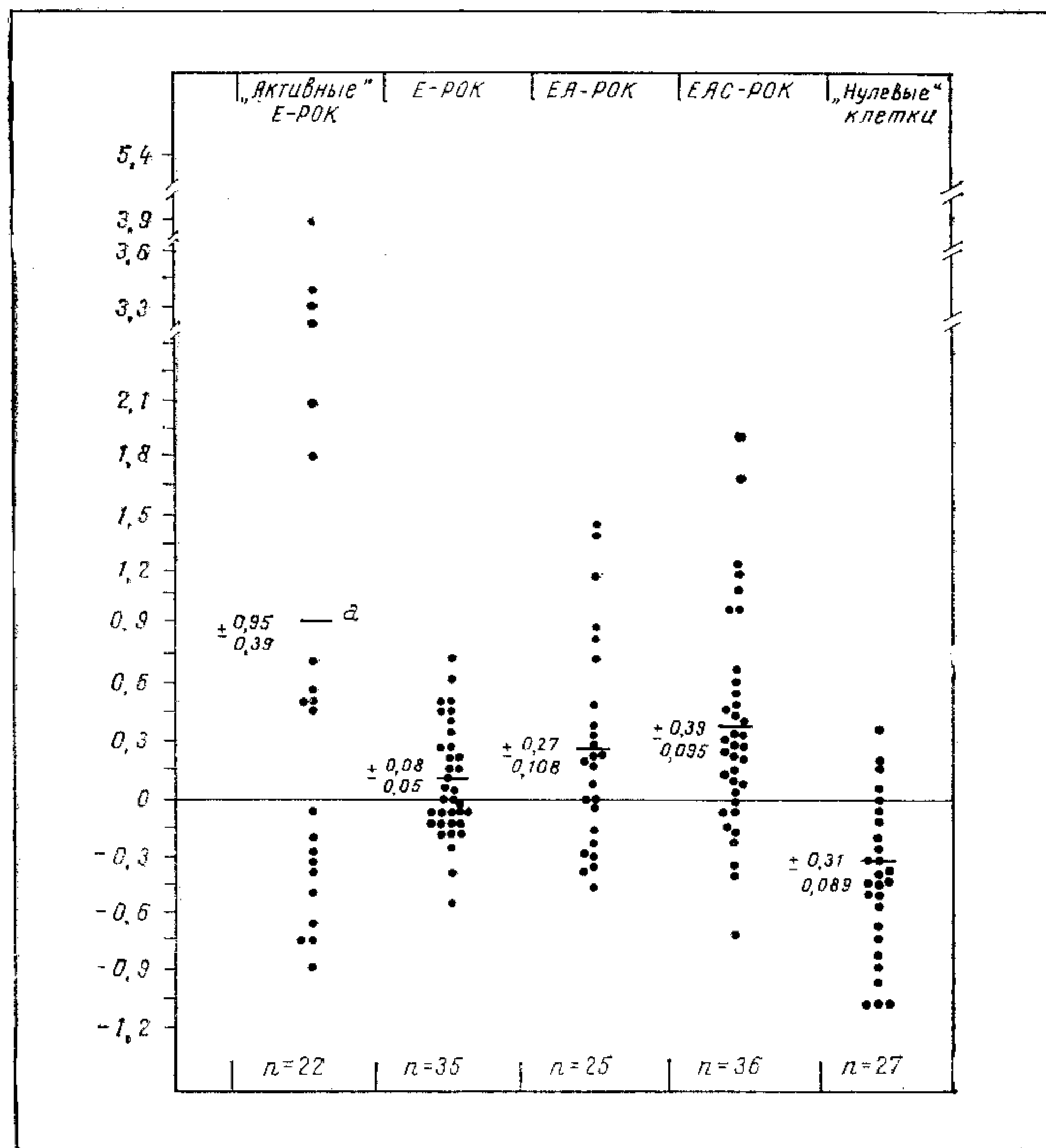


Рис. 1. Индивидуальные различия в чувствительности к тимозину субпопуляций лимфоцитов.

a — средние значения индекса чувствительности для соответствующих РОК. По оси ординат — значения ИЧ.

ванные в градиенте плотности фиколла—верографина [1] мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров инкубировали ($5 \cdot 10^6$ мононуклеаров в 1 мл) в течение 90 мин при 37°C с 300 мкг/мл тимозина (IV фракция экстракта тимуса теленка [5]) или без него в среде, содержащей 90 % среды Игла и 10 % пулированной инактивированной сыворотки IV (AB) группы. После инкубации и однократного отмывания определяли содержание различных видов розеткообразующих

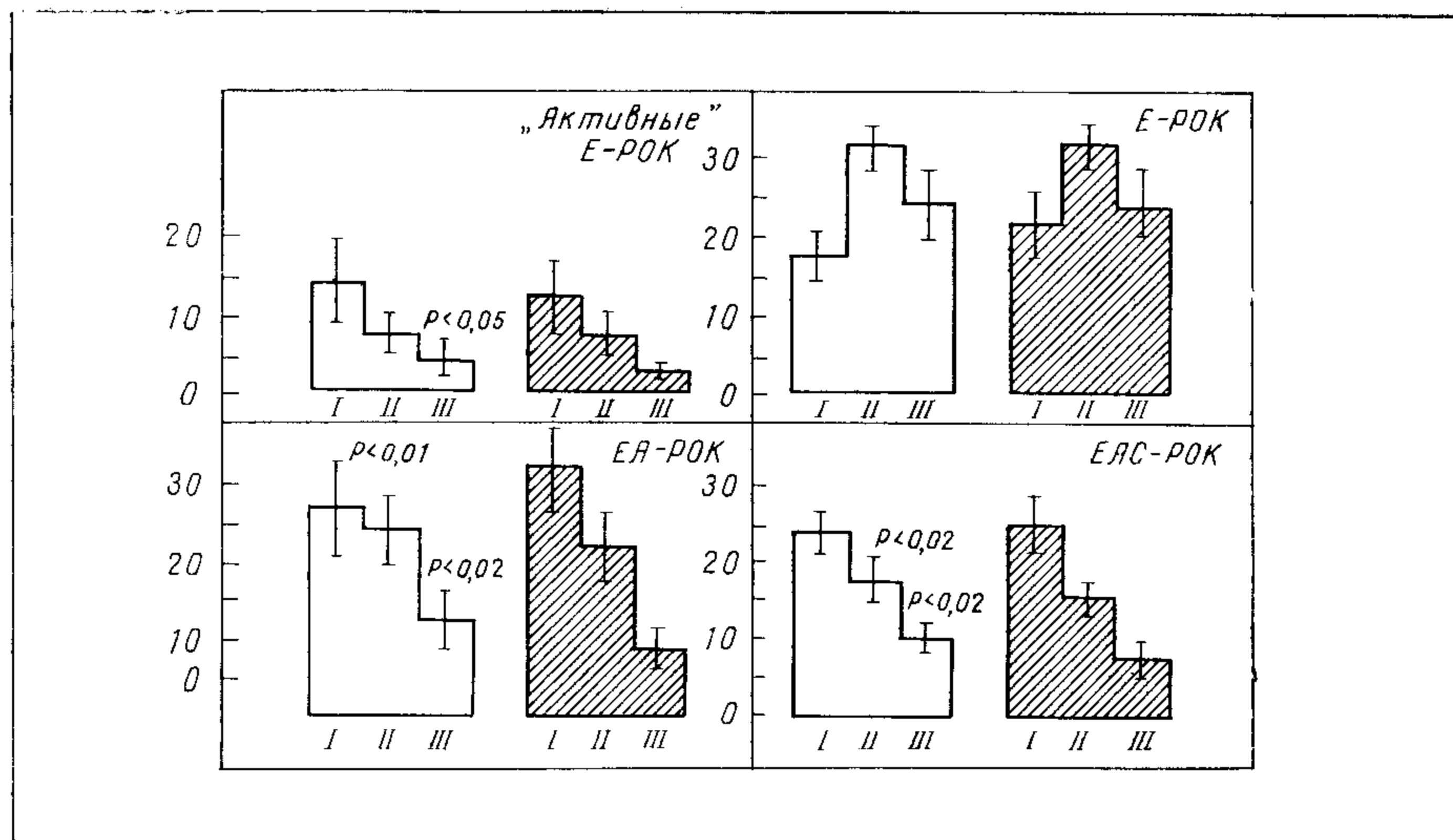
Влияние тимозина на процентное содержание субпопуляций лимфоцитов человека *in vitro*

Исследуемые суспензии мононуклеарных клеток	Содержание различных типов РОК ($X \pm m$, %)				
	«активные» Е-РОК	Е-РОК	ЕА-РОК	ЕАС-РОК	нулевые клетки
Контроль 1 (интактные клетки)	$11,3 \pm 2,34$	$48,5 \pm 2,02$	$28,7 \pm 2,91$	$20,1 \pm 1,70$	$28,9 \pm 2,95$
Контроль 2 (после инкубации без тимозина)	$9,9 \pm 1,50$	$50,1 \pm 2,42$	$28,8 \pm 2,07$	$20,3 \pm 1,65$	$31,0 \pm 2,55$
Опыт (после инкубации с тимозином)	$11,9 \pm 2,46$	$51,6 \pm 2,20$	$34,8 \pm 2,88$	$26,0 \pm 1,90$	$23,1 \pm 3,02$
<i>P</i>	$>0,05$	$>0,05$	$<0,02$	$<0,001$	$<0,01$
<i>n</i>	22	35	25	36	27

Примечание. *P* — достоверность различий по *t*-критерию Стьюдента для сопряженных пар между опытом и контролем 2. Различия между контролем 1 и контролем 2 недостоверны. *n* — число наблюдений.

Рис. 2. Изменение avidности РОК после инкубации с тимозином *in vitro*.

Светлые столбики — содержание РОК после инкубации с тимозином, заштрихованные — содержание РОК в контроле. Для статистически достоверных различий (по *t*-критерию Стьюдента для сопряженных пар) над соответствующим столбцом указано значение *P*. По оси ординат — процент клеток, образующих соответственно: I — низкоавидные, II — среднеавидные, III — высокоавидные розетки.



клеток (РОК): лимфоцитов с рецепторами к эритроцитам барана (E-РОК) [6], «активных» E-РОК [15], клеток с рецепторами к C'3-компоненту комплемента (EAC-РОК) [3] и к Fc-фрагменту иммуноглобулинов (EA-РОК) [2]. При подсчете в зависимости от количества прикрепившихся к лимфоциту соответствующих тест-эритроцитов выделяли низкоавидные (с 1—2 эритроцитами), среднеавидные (с 3—10 эритроцитами) и высокоавидные (с более чем 10 эритроцитами) группы РОК. Истинными РОК считали лимфоидные клетки с более чем 3 эритроцитами. Количество «нулевых» клеток определяли по формуле: % «нулевых клеток» = 100% — (% E-РОК + % EAC-РОК). Действие тимозина количественно оценивалось по индексу чувствительности (ИЧ): $ИЧ = \frac{A-B}{B}$, где *A* — процент лимфоцитов данного типа РОК после инкубации с тимозином, *B* — процент этого же типа РОК после инкубации без тимозина.

Количество лимфоцитов с мембранно-встроенными иммуноглобулинами определяли по методу Lobo и Horvitz [5].

Результаты исследования. Влияние экстракта тимуса на субпопуляции лимфоцитов характеризуется значительным разнообразием индивидуальной чувствительности клеток от разных доноров (рис. 1). Наибольшая гетерогенность между лимфоцитами доноров наблюдается в чувствительности к тимусному экстракту «активных» E-РОК, а наименьшая — в чувствительности E-РОК.

Сравнение результатов статистической обработки данных по процентному содержанию лимфоцитов в клеточных суспензиях, инкубированных с тимозином или без тимозина (см. таблицу), показывает, что тимозин в обследованной группе доноров достоверно увеличивает содержание EA-РОК и EAC-РОК и уменьшает число «нулевых» клеток. Не установлено статистически значимых различий в содержании E-РОК и «активных» E-РОК между контролем и опытом. Однако, как видно из рис. 2,

тимозин значительно увеличивает содержание высокоавидных РОК среди «активных» E-РОК. Не выявлено изменений avidности клеток под влиянием тимозина среди E-РОК. Увеличение содержания EAC-РОК сопровождается возрастанием числа высоко- и среднеавидных РОК. Содержание субпопуляции EA-РОК увеличивается под влиянием тимозина почти исключительно за счет высокоавидных розеток, при этом статистически достоверно снижается количество низкоавидных розеток. Данные, представленные на рис. 3, демонстрируют, что тимозин не изменяет количества иммуноглобулин-положительных клеток, что соответствует данным других авторов [14], однако статистически значимо увеличивает число шапочкообразующих лимфоцитов. Приведенные результаты по изменению avidности «активных» E-РОК подтверждают ранее полученные данные [14] об индукции тимозином *in vitro* экспрессии маркеров зрелых T-лимфоцитов человека.

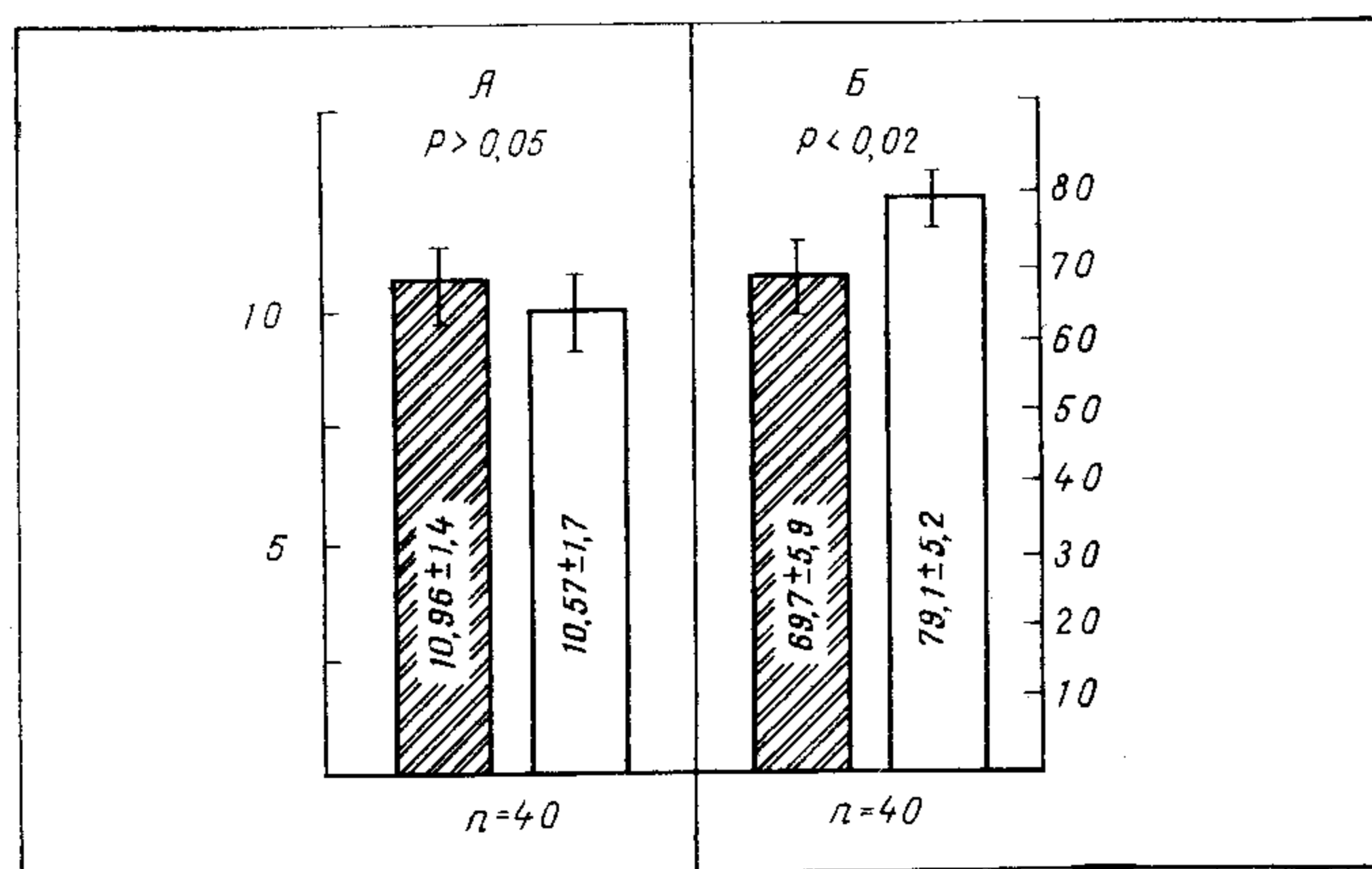


Рис. 3. Влияние тимозина на иммуноглобулин-положительные лимфоциты.

A — процентное содержание иммуноглобулин-положительных клеток среди лимфоцитов после инкубации с тимозином (светлый столбик) и в контроле (заштрихованный столбик); B — процентное содержание шапочкообразующих клеток среди иммуноглобулин-положительных лимфоцитов после инкубации с тимозином (светлый столбик) и в контроле (заштрихованный столбик).

Выявлено также действие тимозина на экспрессию рецепторов к Fc-фрагменту иммуноглобулинов. В использованном нами методе ЕА-розеткообразования в отличие от предложенного Morretta и соавт. [7] не обнаруживаются Т-клетки с Fc-рецепторами. Это свидетельствует о том, что использованная IV фракция экстракта тимуса индуцирует дифференцировку В-клеток. Данное предположение подтверждается и усилением под действием тимозина подвижности иммуноглобулиновых рецепторов [10], а также увеличением экспрессии С'З-рецептора [8]. Однако нельзя исключить, что увеличение количества ЕАС-РОК происходит вследствие возрастания числа Т-клеток, несущих С'З-рецепторы, так как недавно было показано, что около 4 % Т-клеток периферической крови человека несут эти рецепторы [11].

Выявленная широта действия тимусного экстракта может быть обусловлена как плеiotропным действием тимозина, так и присутствием в IV фракции экстракта тимуса дополнительных веществ, например «универсального иммунопоэтического полипептида» [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Хейфец Б. Б., Абалакин В. А. — Лабор. дело, 1973, № 10, с. 579.
2. Шергин С. М., Мусатов М. И., Кожевников В. С. — Там же, 1978, № 3, с. 62.
3. Galili U., Schlesinger M. — J. Immunol., 1975, v. 115, p. 827.
4. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. B. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 249, p. 125.
5. Lobo P. I., Horvitz D. A. — J. Immunol., 1976, v. 117, p. 936.
6. Mendes N. F., Tolnai M. E. A., Silveira N. P. A. et al. — Ibid., 1973, v. 111, p. 860.
7. Morretta L., Ferrarini M., Morretta A. et al. — Ibid., 1976, v. 117, p. 2171.
8. Scheid M. R., Goldstein G., Hammerling U. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 249, p. 531.
9. Scheinberg M. A., Cathcard E. S., Goldstein A. L. — Lancet, 1975, v. 2, p. 424.
10. Sidman C. I., Unanue E. R. — Nature, 1975, v. 257, p. 149.
11. Stobo J. — J. Lab. clin. Med., 1978, v. 91, p. 9.
12. Touraine J. L., Touraine F., Incefy G. S. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 249, p. 335.
13. Vogel J. E., Incefy G. S., Good R. A. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 1174.
14. Wybran J., Levin A. S., Fudenberg H. H. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 249, p. 300.
15. Yu D. T. Y. — J. Immunol., 1975, v. 115, p. 91.

Поступила 30/IV 1979 г

THYMOSIN EFFECT ON HUMAN LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN VITRO

S. M. Shergin, G. Z. Shubinsky, V. S. Kozhevnikov,
M. I. Musatov, O. T. Kudaeva, V. S. Tuaeov

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

The incubation of healthy donors peripheral blood lymphocytes with thymosin was shown to increase the content of high avidе «active» lymphocytes bearing receptors for SRBC,

lymphocytes bearing receptors for C₃ component of complement and for Fc-portion of immunoglobulins. The proportion of cap-forming Ig-positive lymphocytes was shown to increase too. The role of T and B lymphocyte subpopulations and their precursors as thymosin action target cells is discussed.