

ISSN 0365-9615

**БЮЛЛЕТЕНЬ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНЫ**

5

2004

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФАКТОРОВ ЭПИФИЗА НА ФУНКЦИЮ ТИМУСА И КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КОСТНОГО МОЗГА И СЕЛЕЗЕНКИ У МЫШЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

И.Ф.Лабунец, Г.М.Бутенко, В.Х.Хавинсон*

*Институт геронтологии АМН Украины, Киев; *Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН*

Исследовано *in vitro* влияние факторов эпифиза на титр тимического сывороточного фактора в супернатанте 3-часовых культур стромы тимусов, количество стромальных клеток-предшественников для фибробластов и CD4⁺-клеток в костном мозге, а также CD8⁺-клеток в селезенке у взрослых и старых мышей линии СВА. Установлено, что эпиталамин, эпиталон и мелатонин *in vitro* значительно повысили титр тимического сывороточного фактора в супернатанте стромы тимусов мышей разного возраста и увеличили долю CD4⁺-клеток в костномозговой суспензии старых животных. После инкубации клеток селезенки старых мышей с мелатонином процент CD8⁺-лимфоцитов уменьшился. У взрослых и старых мышей доля костномозговых клеток-предшественников фибробластов существенно не изменилась после инкубации с препаратами.

Ключевые слова: эпиталамин, эпиталон, мелатонин, тимус, костный мозг

Эпифиз занимает особое место в нейроэндокринных влияниях на иммунную систему при старении [7,14]. В то же время возрастная дисфункция ее периферического звена определяется степенью нарушений как гормональной функции тимуса, так и функции микроокружения костного мозга, которую в последнем, в частности, выполняют стромальные фибробласты и Т-хелперы [2,4,12]. Нами установлено, что введение взрослым и старым мышам линии СВА факторов эпифиза индольной и пептидной природы привело к повышению в крови уровня тимического сывороточного фактора (ТСФ), количества стромальных клеток-предшественников для фибробластов (КОК-Ф) и Т-клеток с хелперными функциями в костном мозге [5,10]. Кроме того, у старых мышей количество Т-супрессоров в селезенке снижалось. Наряду с эффектами *in vivo*, выявлено прямое влияние эпиталамина и мелатонина на изменение уровня некоторых лимфокинов в супернатанте 3-часовых культур спленоцитов взрослых и старых мышей линии СВА [5].

Цель работы — исследовать возможность прямого влияния мелатонина, эпиталамина и его синтетического тетрапептида эпиталона на способность стромального компонента тимуса к секреции ТСФ, а также на количество КОК-Ф и Т-клеток с регуляторными функциями в костном мозге и селезенке у мышей линии СВА разного возраста.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на взрослых (4-5 мес) и старых (23-24 мес) мышах-самцах линии СВА из питомника Института геронтологии АМН Украины. Тимус, костный мозг и селезенку получали от животных в утренние часы после декапитации под эфирным наркозом.

ТСФ исследовали в супернатанте краткосрочных культур стромы тимусов мышей [5]. С этой целью из органа выделяли клетки, а его стромальную ткань инкубировали при 37°C в течение 3 ч в 1.0 мл среды без препаратов (контроль), а также с препаратами: 0.1 и 1.0 мг эпиталамина, 0.1 мкг эпиталона, 25 пг и 100 пг мелатонина. Контрольные и исследуемые супернатанты пропускали через ультрафильтр "CF-25" ("Amicon)

и использовали для определения ТСФ [8]. Результаты выражали в виде \log_2 титра гормона.

Количество КОК-Ф определяли методом культивирования 1×10^6 клеток костного мозга в монослойных культурах [9]. Одновременно такое же количество клеток культивировали с 0.1 мг эпителиамина и 25 пг мелатонина. Через 12 сут все культуры фиксировали 96% этанолом и окрашивали азур-эозином. Подсчитывали число колоний, содержащих не менее 50 клеток, выросших в контрольных культурах, и после добавления препаратов.

При определении Т-клеток с регуляторными функциями 1×10^6 клеток костного мозга и селезенки инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 0.1 мл среды 199 (контроль) или в 0.1 мл среды, содержащей для костномозговых клеток 0.1 мг эпителиамина, 0.1 мкг эпиталона, 125 пг мелатонина соответственно, для спленоцитов — 25 пг мелатонина. После отмывания клеток от препаратов в контрольных и исследуемых образцах с помощью иммуофлюоресцентного метода определяли долю $CD4^+$ -клеток (костный мозг) и $CD8^+$ -клеток (селезенка) [3]. Использовали биотинированные моноклональные антитела к L3T4 и Lyt-2 ("Sigma"). $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клетки (в процентах на 300 000 клеток) подсчитывали на цитофлюориметре "FACStar Plus" ("Becton Dickinson").

Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В супернатанте стромы тимусов старых мышей титр ТСФ значительно ниже, чем у взрослых животных (табл. 1). Пептидные препараты и мелатонин *in vitro* существенно повысили значения этого показателя у мышей разного возраста. Эффект эпителиамина *in vitro* зависел от дозы и возраста животных. Если у взрослых мышей титр ТСФ значительно вырос в ответ только на большую дозу препарата, то у старых — уже на дозу 0.1 мг. Действие эпиталона на рост уровня ТСФ у взрослых и старых мышей проявилось в дозе, которая была, соответственно, в 10 000 и 1000 раз меньше эффективной дозы эпителиамина у мышей того же возраста.

После культивирования клеток костного мозга взрослых мышей с факторами эпифиза доля КОК-Ф и $CD4^+$ -клеток существенно не изменилась (табл. 2). У старых мышей наблюдалось некоторое снижение доли КОК-Ф и значительное увеличение $CD4^+$ -клеток после инкубации костномозговой суспензии со всеми препаратами. Существующие различия в контрольных величинах

Таблица 1. Влияние *in vitro* факторов эпифиза на титр ТСФ в супернатанте 3-часовых культур стромы тимусов мышей разного возраста (\log_2 ; $n=6$)

Препарат, доза	Взрослые мыши	Старые мыши
Контроль (среда 199)	4.1±0.7	1.3±0.4*
Эпителиамин		
0.1 мг	4.6±0.9	4.4±1.1*
1.0 мг	6.0±0.4*	6.0±0.9*
Эпиталон, 0.1 мкг	6.4±0.2*	6.8±0.9*
Мелатонин		
25 пг	8.2±0.6*	7.0±1.1*
100 пг	7.5±0.8*	6.4±0.5*

Примечание. $p < 0.05$ по сравнению *с контролем, *со взрослыми мышцами.

нах $CD4^+$ -клеток у старых мышей могут быть связаны с сезоном года, когда проводилось исследование.

Нами установлено, что в селезенке взрослых ($n=5$) и старых ($n=5$) мышей СВА доля $CD8^+$ -клеток составила 12.5 ± 1.3 и $28.1 \pm 1.2\%$ ($p < 0.05$). После инкубации спленоцитов с мелатонином значения показателя не изменились у взрослых мышей ($18.1 \pm 2.8\%$) и значительно уменьшились у старых (до $19.9 \pm 2.9\%$; $p < 0.05$).

Следовательно, мелатонин, эпителиамин и эпиталон способны непосредственно изменить секреторную функцию тимуса у взрослых и старых мышей линии СВА, а также долю $CD4^+$ -клеток в костном мозге старых мышей. В селезенке последних мелатонин *in vitro* изменил долю $CD8^+$ -клеток. В эпителиальных клетках тимуса и Т-хелперах костного мозга обнаружены высокоаффинные рецепторы к мелатонину [11]. По-видимому, поэтому повышение титра ТСФ в супернатантах культивируемой стромы тимусов и доли $CD4^+$ -костномозговых клеток наблюдалось уже в ответ на физиологические колебания концентрации мелатонина. Показано, что гормон регулирует экспрессию гена протимозина-альфа, [13]. Не исключено, что с действием мелатонина на генетический аппарат может быть связано изменение экспрессии лимфоцитарных маркеров L3T4 и Lyt-2. Для действия мелатонина на маркеры характерно модулирующее влияние. Ранее изменение уровня циклических нуклеотидов в клетках считалось одним из основных механизмов прямого действия пептидов эпифиза [6,7]. Однако сейчас с помощью микрочиповой технологии установлено влияние эпиталона на экспрессию ряда генов в клетках животных [1]. Есть предположение, что из-за низкой аффин-

Таблица 2. Влияние *in vitro* факторов эпифиза на долю (%) КОК-Ф и CD4⁺-клеток в костном мозге взрослых и старых мышей

Группа		Контроль (среда 199)	Эпиталамин	Мелатонин	Эпиталон
КОК-Ф	взрослые	23.0±3.2 (6)	26.7±8.0 (6)	23.8±7.7 (6)	
	старые	32.6±15.5 (6)	18.2±2.2 (6)	16.3±3.2 (6)	
CD4 ⁺ -клетки	взрослые	6.7±0.4 (6)			6.9±1.0 (6)
	старые	10.9±1.3 (6)			15.6±2.4* (6)
	старые	20.1±2.3 (5)	29.1±1.8* (5)	36.1±2.8* (5)	

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. В скобках — число исследований.

ности рецепторов к пептидам эпифиза на клетках тимуса прямой путь их воздействия на железу реализуется в ситуациях, требующих быстрой мобилизации гормонов [6]. Так, нами показано, что у взрослых мышей рост титра ТСФ наблюдался только при действии больших доз эпиталамина. При старении характер взаимосвязи между эндокринными железами изменяется, поэтому значение прямого пути влияния факторов эпифиза может увеличиться не только для эпителиального компонента тимуса, но и для Т-хелперов костного мозга. Нами установлено существенное повышение доли CD4⁺-костномозговых клеток после инкубации с пептидами эпифиза только у старых мышей. Высокая эффективность действия эпиталона на исследованные показатели также подтверждает перспективность его применения как иммуномодулирующего и репротекторного средства. Отсутствие влияния эпифизарных факторов *in vitro* на число КОК-Ф может свидетельствовать о том, что в организме их действие, скорее всего, реализуется через факторы его макроокружения.

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают возможность действия факторов эпифиза индольной и пептидной природы на клеточном уровне в центральных и периферических органах иммунной системы взрослых и старых мышей линии СВА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов С.В., Бохелер К.Р., Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. // Бюл. экспер. биол. 2002. Т. 133, № 3. С. 340-347.
2. Бутенко Г.М. // Пробл. старен. и долголет. 1998. Т. 7, № 3. С. 100-108.
3. Иммуноцитохимия и моноклональные антитела в онкогемпатологии / Под ред. В.Г.Пинчука, Д.Ф.Глузмана. Киев, 1990.
4. Лабунец И.Ф. // Журн. АМН України. 2000. Т. 6, № 4. С. 783-791.
5. Лабунец И.Ф., Бутенко Г.М. // Пробл. старен. и долголет. 1992. Т. 2, № 3. С. 280-285.
6. Слепушкин В.Д., Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. и др. Эпифиз, иммунитет и рак (теоретические и клинические аспекты). Томск., 1990.
7. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. СПб., 2001.
8. Bach J.F., Dardenne M., Bach M.A. // Transplant. Proc. 1973. Vol. 5, N 1. P. 99-101.
9. Friedenstain A.J., Chailakhyan R.K., Latsinic N.V. et al. // Transplantation. 1974. Vol. 17, N 4. P. 331-340.
10. Labunets I., Magdich L., Maksyuk T., Butenko G. // Advances in gerontol. 2000. Vol. 5. P. 63-64.
11. Liu Z., Zhao Y., Peng S. // Sci China B. 1995. Vol. 38, N 12. P. 1455-1461.
12. Maestroni G.J., Hertens E., Galli P. et al. // J. Pineal Res. 1996. Vol. 21, N 3. P. 131-139.
13. Molinero P., Soutto M., Benot S. et al. // J. Neuroimmunol. 2000. Vol. 103, N 2. P. 180-188.
14. Reiter R.J. // Exp. Gerontol. 1995. Vol. 30, N 3-4. P. 199-212.

Получено 20.02.04