

го фосфора, фосфокреатина и других энергетических источников, которые стимулируют не только обменные процессы, но и процессы термogenesis и термoлиза организма.

Таким образом, «оболочка» тела в области головы и конечностей имеет более низкую температуру, чем на других ее участках; в онтогенезе температура «оболочки» головы и спины повышается, а на конечностях и брюхе снижается; в период полового созревания организм механические терморегуляции активизируются.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гриван В. I, Коляда И. В. В кн. Вопросы адаптации с.-х животных. Краснодар, 1971.
2. Макарова А. Р., Иванцов В. Г., Муратов Ш. X. В сб. Физиолого-генетические исследования адаптации у животных. Л., 1976.
3. Слоцкий А. Д. Физиология терморегуляции и термической адаптации у с.-х животных. М.—Л., 1967.
4. Скворцова А. А., Хренов И. И. В сб. Регуляция обмена тепла и других функций у с.-х животных в условиях высоких температур. Краснодар, 1960.
5. Стояновский С. В. В кн.: Вопросы адаптации с.-х животных. Краснодар, 1971.
6. Ташлухаметов У. Т. Тр. 11-та экперим. биология, 7. Фрунзе, 1971.
7. Тень В., Арап Н. М. В сб.: Вопросы адаптации с.-х животных. Краснодар, 1971.

Поступило 6 VI 1990 г.

Биолог. журн. Армении, № 3 (44) 1991

УДК 612.017.1

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА L-ЛЕЙЦИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

Т. К. ДАВТЯН\*, Б. Х. ИСМАИЛ\*\*, Т. И. ИГНАТОВА\*\*, Ю. Т. АЛЕКСАНИАН\*

Армянский НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А. Б. Алексаняна, Ереван;\* Институт цитологии АН СССР, Ленинград\*\*

Изучено влияние Лей-ОМЕ на активность лимфоцитов периферической крови человека, стимулированных в культуре МЛ. Показано, что МЛ-стимулированные лимфоциты человека подавляются Лей-ОМЕ. Последний стимулирует вторичный иммунный ответ лимфоцитов к вирусу гриппа человека.

Ուսումնասիրված է Լեյ-ՕՄԷ ազդեցությունը բուսական ծագման միտոգենով, կուլտուրայով խթանված մարդու պերիֆերիկ արյան իմֆոցիտների ակտիվության վրա: Ցույց է տրված, որ միտոգեն-խթանված իմֆոցիտների ակտիվությունը ճշգրտվում է Լեյ-ՕՄԷ կողմից: Վերջինս խթանում է մարդու գրիպի վիրուսի նանդեպ իմֆոցիտների երկրորդային իմուն պատասխանը:

Influence of Leu-OME to human blood's peripheric lymphocytes is studied stimulated in cell culture with PWM. It is shown, that PWM-stimultized human lymphocytes are suppressed with Leu-OME. The latter stimulates secondary immune response of lymphocytes to human influenza virus.

Сокращения: МЛ—митоген лактоноса, Лей-ОМЕ—метилловый эфир L-лейцина, МПКЧ—мононуклеары периферической крови человека, ЭТС—эмбриональная телячья сызоротка, ИФА—иммуноферментный анализ, АОК—антителообразующие клетки.

Эфиры L-аминокислот известны как лизосомотропные агенты, способные свободно проникать в лизосомы клеток млекопитающих и метаболлизировать до свободных форм L-аминокислот, с последующей полимеризацией их внутри лизосом, что обуславливает лизосомотропные эффекты этих соединений [3, 12]. В частности, метиловый эфир L-лейцина (Лей-Оме) образует в моноцитах, полиморфноядерных лейкоцитах продукты конденсации в виде дипептидов Лей-Лей-Оме [10, 11].

Ранее было показано, что как Лей-Оме, так и продукт его конденсации (Лей-Лей-Оме) элиминируют из клеточных популяций моноциты, полиморфноядерные лейкоциты, а также подавляют активность натуральных киллеров в цитотоксическом тесте к клеткам линии K562 [10, 11, 13]. Недавно было установлено, что лимфоциты периферической крови человека, обработанные Лей-Оме, способны отвечать на растворимый антиген в клеточной культуре с образованием клеток, синтезирующих антитела к использованному антигену [2, 3]. Однако следует отметить, что влияние Лей-Оме на активность лимфоцитов человека изучено недостаточно.

Задачей настоящей работы являлось изучение действия Лей-Оме на функциональную активность лимфоцитов периферической крови человека, стимулированных в клеточной культуре МЛ.

*Материал и методики.* МПКЧ, получали из крови доноров центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-paque (Cyrusa, Sweden) с помощью центрифугирования при 1200 об/мин в течение 10 мин МПКЧ трижды отмывали забуференным физиологическим раствором (рН 7.5). Для обработки их Лей-Оме клетки в концентрации  $10 \cdot 10^6$  клеток в мл в среде RPMI-1640, содержащей 2,5 мМ Лей-Оме, инкубировали при комнатной температуре в течение 40 мин [2]. Клетки отмывали центрифугированием дважды средой RPMI-1640, содержащей 2% ЭТС. Обработанные и необработанные Лей-Оме МПКЧ засевали по  $1 \cdot 10^6$  клеток в мл в лунки 96-луночных плат. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640, содержащую 10% ЭТС, и различные концентрации МЛ (от 0,5 до 10 мкг/мл). Платы с засеянными клетками инкубировали в течение 7 дней при 37° в инкубаторе с поддувом  $\text{CO}_2$ , после чего собирали культуральные супернатанты для определения секретиримых иммуноглобулинов человека классов М и G с помощью ИФА, используя антитела против иммуноглобулинов человека.

Реакцию бласттрансформации лимфоцитов человека ставили по описанной в литературе методике [5].

При проведении экспериментов использовали инактивированный ультрафиолетовым облучением штамм R91H3N2 вируса гриппа человека типа А, любезно предоставленный А. Г. Букриной (Центральный ордена Ленина институт усовершенствования врачей, Москва). МПКЧ стимулировали вирусом гриппа и (или) МЛ по описанной методике [6]. На 7 день культивирования МПКЧ с помощью ИФА определяли отдельные АОК по описанной методике [7].

*Результаты и обсуждение.* Активация человеческих лимфоцитов МЛ представляет собой прекрасную модель для изучения различных аспектов регуляции иммунного ответа, механизмов кооперации Т- и В-лимфоцитов, действия различных иммуномодуляторов на процесс антителообразования в культуре и т. д. [4, 5]. Для изучения дей-

ствия Лей-ОМе на функциональную активность лимфоцитов человека нами также была избрана модель лимфоцитов человека (МПКЧ), стимулированных в культуре МЛ. Для изучения оптимальных доз МЛ, индуцирующих синтез иммуноглобулинов человека классов М и G, МПКЧ от 10 доноров стимулировали вышеуказанным лектином в концентрациях от 0,5 до 10 мкг в мл в течение 7 дней. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 1. Как видно из

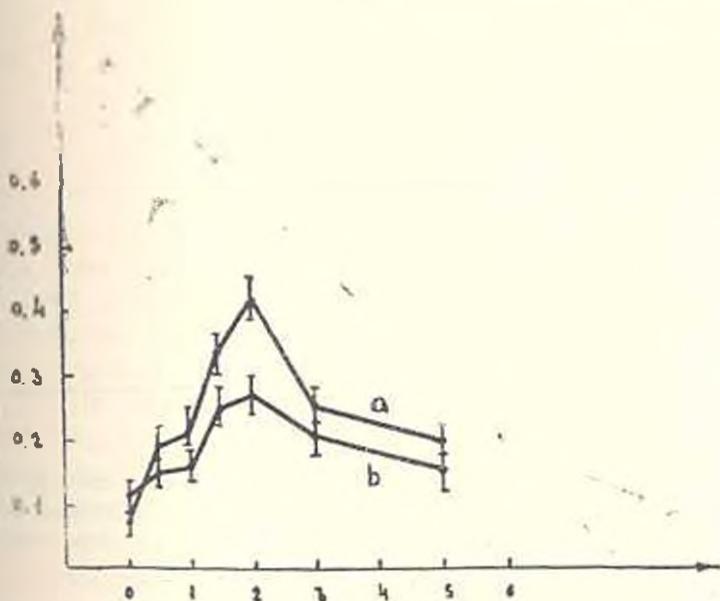


Рис. 1. Влияние различных доз МЛ на продукцию иммуноглобулинов человека МПКЧ в культуре. а—синтез IgG; б—синтез IgM. На оси абсцисс—различные дозы МЛ. На оси ординат—оптическая плотность при длине волны 492 нм ( $P < 0.01$ ).

приведенных данных, оптимальные дозы МЛ, индуцирующие синтез иммуноглобулинов человека классов М и G, составляли 1—2,5 мкг/мл. В проведенных нами опытах на 7 день культивирования при использовании указанных оптимальных доз отмечалось увеличение продукции иммуноглобулинов в 2—3,5 раза по сравнению с нестимулированными контрольными культурами. Эти данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями по изучаемому вопросу [5].

Для определения влияния Лей-ОМе на синтез IgM и IgG МПКЧ, полученные от 3 доноров, стимулировали оптимальными дозами МЛ. Содержание иммуноглобулинов М и G определяли в супернатанте на 7 день культивирования клеток. Результаты исследований представлены на рис. 2. Как видно из этих данных, обработка МПКЧ Лей-ОМе ингибирует синтез IgM и IgG, индуцированный оптимальными дозами МЛ. Следует отметить, что синтез иммуноглобулина G ингибируется в среднем в 1,5 раза, а синтез иммуноглобулина М в 2 раза по сравнению с контрольными культурами, необработанными Лей-ОМе.

Результаты изучения влияния Лей-ОМе на бласттрансформацию МПКЧ приведены в таблице 1.

Как видно из приведенных данных, обработка Лей-ОМе ингибирует реакцию бласттрансформации тимфоцитов.

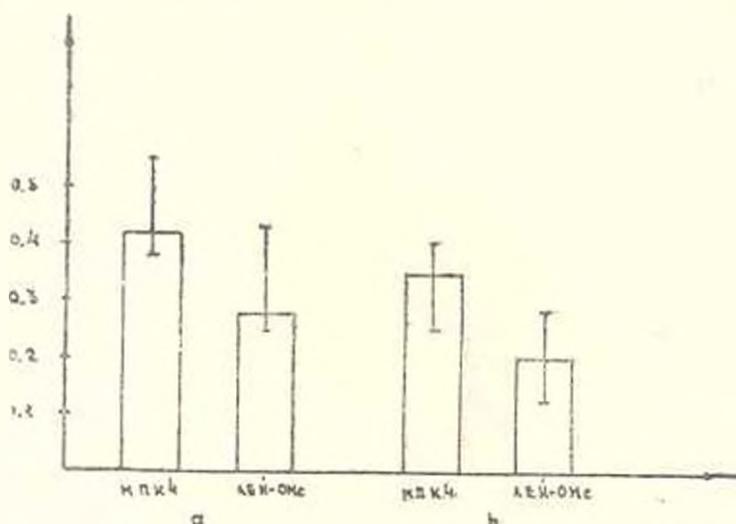


Рис. 2. Влияние Лей-ОМе на синтез иммуноглобулинов человека МПКЧ в культуре, стимулированной МЛ в концентрации 2,5 мкг/мл. а—синтез JgG; б—синтез JgM. На ось ординат—оптическая плотность при длине волны 492 нм ( $P < 0,05$ ).

Таблица 1. Влияние Лей-ОМе на бласттрансформацию МПКЧ

Культура лимфоцитов человека	Включение <sup>3</sup> H-тимидина в МПКЧ, стимулированные различными дозами МЛ			
	0	1 мкг/мл	1,5 мкг/мл	2 мкг/мл
МПКЧ	720 ± 12	1160 ± 25	2059 ± 24	622 ± 53
МПКЧ + Лей-ОМе	323 ± 21	891 ± 43	1261 ± 75	542 ± 82

Примечание: цифры в табл. обозначают расп./мин.

Таким образом, данные по исследованию влияния Лей-ОМе на синтез иммуноглобулинов человека и на бласттрансформацию МПКЧ свидетельствуют о способности изучаемого препарата подавлять как синтез иммуноглобулинов, так и бласттрансформацию МПКЧ. Эти данные можно объяснить тем, что МЛ, являясь поликлональным стимулятором преимущественно В-лимфоцитов, осуществляет это взаимодействие посредством активации макрофагального звена (моноцитов) [9]. В то же время Лей-ОМе, как выше было отмечено, элиминирует из популяции иммунокомпетентных клеток моноциты и поэтому, как нам представляется, проявляет иммуносупрессивное действие. Однако следует отметить, что в литературе имеются и данные о том, что синтез иммуноглобулинов и пролиферация лимфоцитов человека, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр, усиливается после обработки этих клеток Лей-ОМе [5].

Результаты изучения вторичного иммунного ответа обработанных Лей-ОМе МПКЧ в культуре на вирус гриппа человека представлены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние Лей-ОМе на вторичный иммунный ответ МПКЧ к вирусу гриппа человека *in vitro*

Число АОК на $1 \cdot 10^6$ клеток	Культура МПКЧ
46±12	МПКЧ + 2 мкг/мл МЛ
192±20	МПКЧ, необработанные Лей-ОМе, + 2 мкг/мл МЛ + 2 мкг/мл вируса гриппа человека
298±25	МПКЧ, обработанные Лей-ОМе, + 2 мкг/мл МЛ + 2 мкг/мл вируса гриппа человека

Примечание:  $P < 0,05$ .

Из приведенных в таблице данных видно, что после обработки Лей-ОМе в популяции МПКЧ, стимулированных вирусом гриппа, с помощью ИФА обнаруживались АОК в количестве  $298 \pm 25$  на  $1 \cdot 10^6$  клеток. Количество же АОК, содержащихся в культуре стимулированных вирусом гриппа МПКЧ, необработанных Лей-ОМе, составляло  $192 \pm 20$  на  $1 \cdot 10^6$  клеток. Следовательно, в проведенных нами экспериментах Лей-ОМе усиливало вторичный иммунный ответ МПКЧ к вирусу гриппа человека в культуре. Полученные данные подтверждают имеющиеся в литературе представления, согласно которым интенсивность антителообразования к вирусу гриппа в значительной степени зависит от соотношения клеток, проявляющих хелперную и супрессорную активность [1], имея в виду, что Лей-ОМе элиминирует также супрессорные Т-лимфоциты из популяции МПКЧ [13].

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований можно сделать заключение о том, что Лей-ОМе в зависимости от использованной модели индукции иммунного ответа в клеточной культуре проявляет либо иммуносупрессорную, либо иммуностимулирующую активность. Выявление механизмов этих процессов является задачей дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Andres E. N., Katz J. M., Jucson D. C., White D. O. J. Immunol., 127, 2, 669—672, 1981.
2. Borrebaeck C. A. K., Danielsson L., Möller S. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 148, 3, 941—946, 1987.
3. Borrebaeck C. A. K. Immunol. Today, 9, 11, 335—359, 1988.
4. Hatahata S., Lipsky P. E. J. Immunol., 142, 8, 2567—2607, 1989.
5. Shan S., Klessing T., Lukowsky A., Volk H. D., Porstman T., Von Baehr R. Biomed., Biochem. Acta, 45, 467—476, 1986.
6. Michel D. H., Collard R. E. J. Immunol., 131, 3, 1229—1233, 1983.
7. Möller S. A., Borrebaeck C. A. K. J. Immunol. Meth., 79, 195—204, 1985.
8. Ohm N., Danielsson L., Carlsson R., Borrebaeck C. A. K. Immunol., 66, 4, 485—490, 1989.
9. Rosenberg S. A., Lipsky P. E. J. Immunol., 122, 926—932, 1979.
10. Thiele D. L., Lipsky P. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 2468—2479, 1985.
11. Thiele D. L., Lipsky P. E. J. Immunol., 131, 786—799, 1985.
12. Thiele D. L., Kurosaka M., Lipsky P. E. J. Immunol., 131, 2282—2294, 1983.
13. Thiele D. L., Lipsky P. E. J. Immunol., 136, 1038—1048, 1986.

Поступило 13.XI 1991 г.