

УДК 547.963.32+591.143.3+591.144 [591.147.1/2]

БИОХИМИЯ

Х. С. Саядян, А. В. Зильфян, Р. А. Саакян,  
М. И. Геворкян, Г. Г. Геворкян

### Влияние экстракта парашитовидных желез на синтез ДНК в лимфоцитах тимуса и селезенки лабораторных животных

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР В. Г. Мхитаряном 29/1 1988).

Наиболее изученный продукт, секретруемый парашитовидными железами (ПЩЖ), — паратиреоидный гормон (ПТГ) — обладает широким диапазоном влияния на кальцийзависимые функции. Эти гормональные воздействия распространяются не только на органы-мишени — кости и почки, но и на клетки органов, не являющихся его непосредственными мишенями. Это относится прежде всего к клеткам тимуса, костного мозга, хондроцитам, эпителию молочной железы, клеткам скелетной мускулатуры и сердца, опухолевым клеткам и др. (1). В некоторых из названных клеток ПТГ активирует поступление  $Ca^{2+}$  в клетки путем увеличения уровня цАМФ (2). В ряде случаев эффекты ПТГ опосредованы увеличением концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле без изменения концентрации цАМФ (3).

С другой стороны, известно, что ПЩЖ наряду с ПТГ секретруют и другие белки, такие как паратиреоидный секреторный белок (ПСБ) (4), белок Н, сходный с тимическим убиквитином (5,6). Кроме того, ПЩЖ секретруют фрагменты ПТГ 34-84 и 37-84. Небольшие количества N-концевого гормона также высвобождаются в ПЩЖ (2). Биологическое действие всех остальных белков, секретруемых ПЩЖ, кроме ПТГ, на органы-мишени остается неизвестным.

Нами было сделано предположение, что некоторые секреты ПЩЖ должны обладать иммуномодуляторными свойствами. Проверка этого предположения явилась целью нашего исследования.

В экспериментах были использованы лимфоидные клетки крыс линии Август и мышей линии СВА. Гомология гормонов крыс с гормонами человека является одной из самых высоких в ряду лабораторных животных (7). Наиболее исследованной иммунологической моделью являются мыши.

В качестве модулирующих агентов были использованы экстракты ПЩЖ и ПТГ, выпускаемый Московским эндокринным заводом под названием «паратиреоидин».

Скорость включения меченого тимидина в ДНК определяли на основе метода (8).

Для получения лимфоцитарной суспензии животному делали атлантоокципитальную децервикацию, обрабатывали наружные покровы 10%-ной перекисью водорода, затем 76%-ным спиртом. Такая об-

работка позволяла получать культуры высокой стерильности. Для получения клеток паренхиматозных органов их помещали в стеклянный гомогенизатор Портера и гомогенизировали в среде 199 с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой, 20 ммоль НЕРЕС с антибиотиками из расчета 40—80 Е/мл. В качестве антибиотика использовали гентамицин, который обладает как бактерицидной, так и фунгицидной активностью.

В эксперименте брались суспензии с количеством живых клеток не менее 90% их общего числа. Полученную суспензию фильтровали через капроновую сетку, дважды отмывали холодной средой при 1500 об/мин 10 мин и затем ресуспендировали в среде культивирования. Среду культивирования компоновали из следующих ингредиентов: RPMI—1640 („Flow“, Великобритания), 90,5% ТЭС (GIBCO, США), 20 ммоль НЕРЕС, 2 ммоль *L*-глутамина, гентамицин („Sporha“, Болгария) из расчета 40—80 Е/мл, 2-Меркаптоэтанол („Fluca“, Австрия) из расчета 4,2 мл на 996 мл RPMI—1640.

Плотность клеток при посадке в плашки составляла не более  $10^7$  в 1 мл. Все манипуляции с клетками проводили в ламинарных боксах фирмы «ЭТИ» (ФРГ). В качестве митогенов использовали конканавалин А (Sigma, США) и фитогемагглютинин (ФГА), (Difco, США). В каждую лунку добавляли митогены так, чтобы конечная концентрация конканавалина А составляла 2—4 пг на лунку, а ФГА—0,1 мкл исходного раствора. Для каждой серии препаратов определяли нижние наименьшие концентрации, еще обладающие активностью.

Инкубацию клеток производили в течение 48 ч. За 16 ч до конца инкубации в каждую лунку добавляли меченый тимидин фирмы Rgha (ЧССР) с конечной активностью 1 мкю/мл. После окончания инкубации содержимое лунок переносили на ацетатцеллюлозные фильтры марки HA фирмы Millipore (США). Лунки промывали 20-кратным объемом забуференного физиологического раствора, затем 10-кратным объемом 5%-ного ТХУ и затем 10-кратным объемом этилового спирта. Мишени вырезали и помещали в сцинтилляционные флаконы с толуольной сцинтилляционной жидкостью. Сцинтиллятор готовили из расчета на 1 л толуола 0,4 г РОРОР, 4 г РРО. Эффективность счета достигала для  $^3\text{H}$  в таком сцинтилляторе 36—40%. Подсчет активности проводили на фотометрах фирмы ЛКВ «Beta-rack» (Швеция). Активность изотопов определяли по числу распадов в минуту.

Конечную обработку результатов проводили на персональном компьютере Apple—2 (США).

На рис. 1,а показано влияние различных доз экстракта ПЩЖ на включение меченого тимидина в синтез ДНК в спленоцитах крыс, а на рис. 2,а—в тимоцитах. Введение полученного препарата в культуральную среду в дозе 20 мкл (маточный раствор 2мг/мл) вызывало снижение включения меченого тимидина в ДНК на 37,4%. Вместе с тем наблюдалась определенная парадоксальная реакция при снижении доз изучаемого препарата. В частности доза в 5 мкл не вызывала статистически достоверных изменений, в то время как 40-кратное уменьшение дозы приводило к еще большему снижению интенсивности синтеза ДНК в спленоцитах крыс. Тимоциты реагировали на вве-

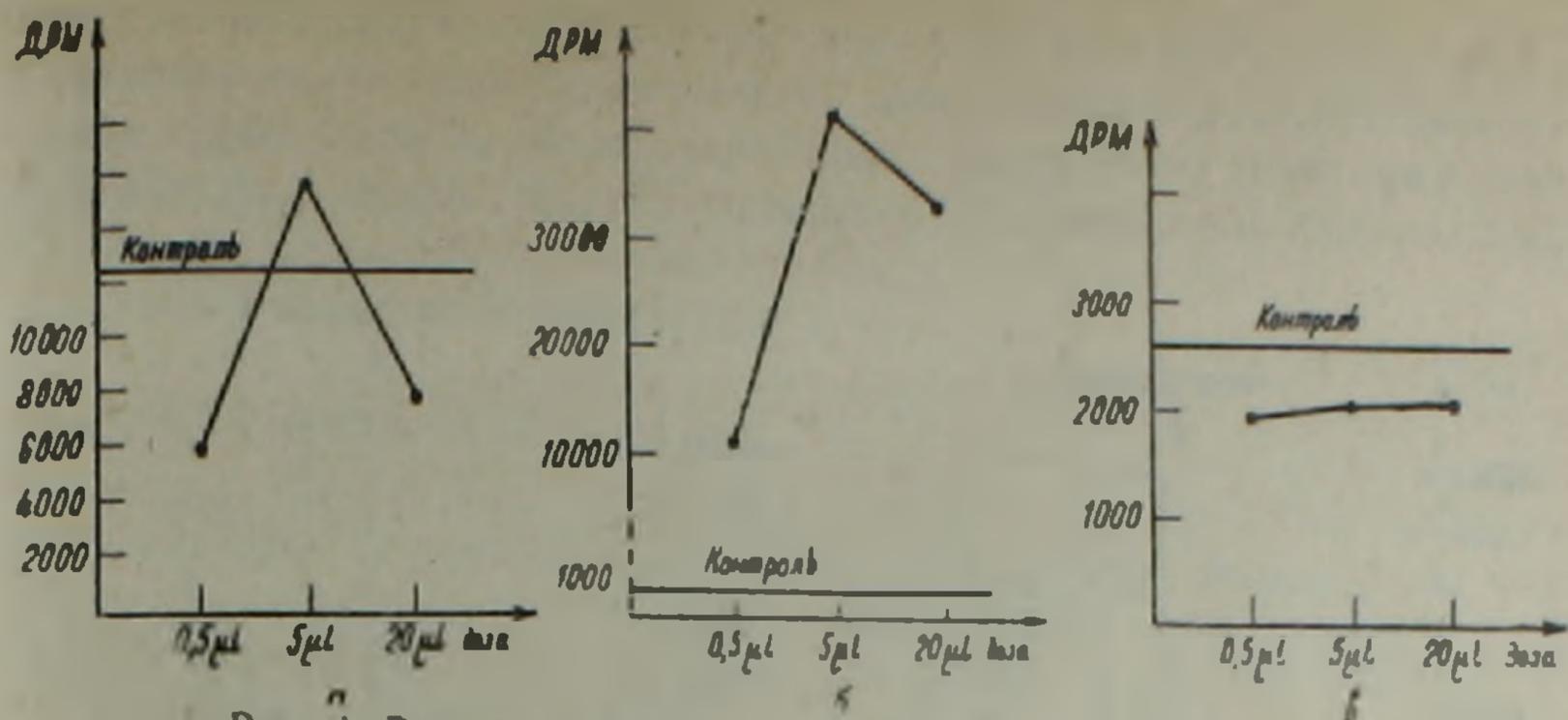


Рис. 1. Влияние различных доз экстракта паразитовидных желез на включение меченого тимидина в синтез ДНК в спленocyтaх крыс линии Август: а—в норме; б—при добавлении конканавалина А; в—при добавлении ФГА

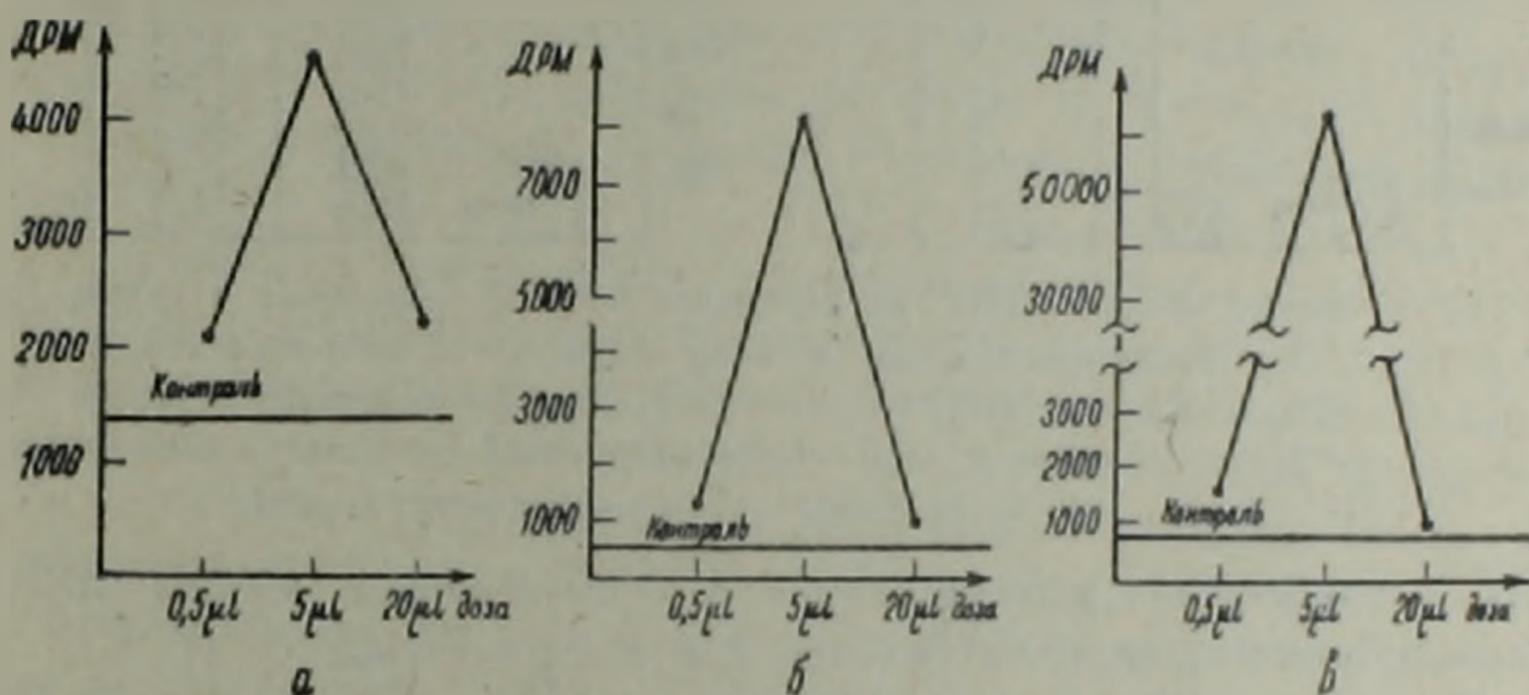


Рис. 2. Влияние различных доз экстракта паразитовидных желез на включение меченого тимидина в синтез ДНК в тимocyтaх крыс линии Август: а—в норме; б—при добавлении конканавалина А; в—при добавлении ФГА

дение экстракта в культуральную среду увеличением синтеза ДНК, причем здесь также наблюдалось нелинейное действие. Дозировки в 20 мкл вызывали статистически недостоверное увеличение синтеза ДНК, в то время как доза в 5 мкл действовала намного сильнее и увеличивала синтез ДНК более чем в 3 раза. Уменьшение первоначальной дозировки в 40 раз также уменьшало включение трития практически до контрольных цифр. Таким образом, клетки из тимуса и селезенки реагировали на введение экстракта ПЩЖ с разнонаправленным эффектом. Как видно из рис. 3 и 4, эффект ПТГ и полученного грубого экстракта разнонаправлен в тимусе и однонаправлен в селезенке.

С целью выяснения механизмов действия полученного нами экстракта на метаболизм лимфоцитов мы ввели в культуральную среду митогены—конканавалин А, который является активатором практически всех популяций лимфоцитов, и ФГА, который, как известно, стимулирует митогенную активность в основном Т-клеток.

Введение конканавалина А в культуральную среду стимулирова-

ло включение трития в ДНК и в селезенке и в тимусе, причем степень воздействия в зависимости от дозировки также была одинакова: при 4-кратном уменьшении дозы возрастала, а при 40-кратном — уменьшалась по сравнению с первоначальной дозой (рис. 1,б,2,б).

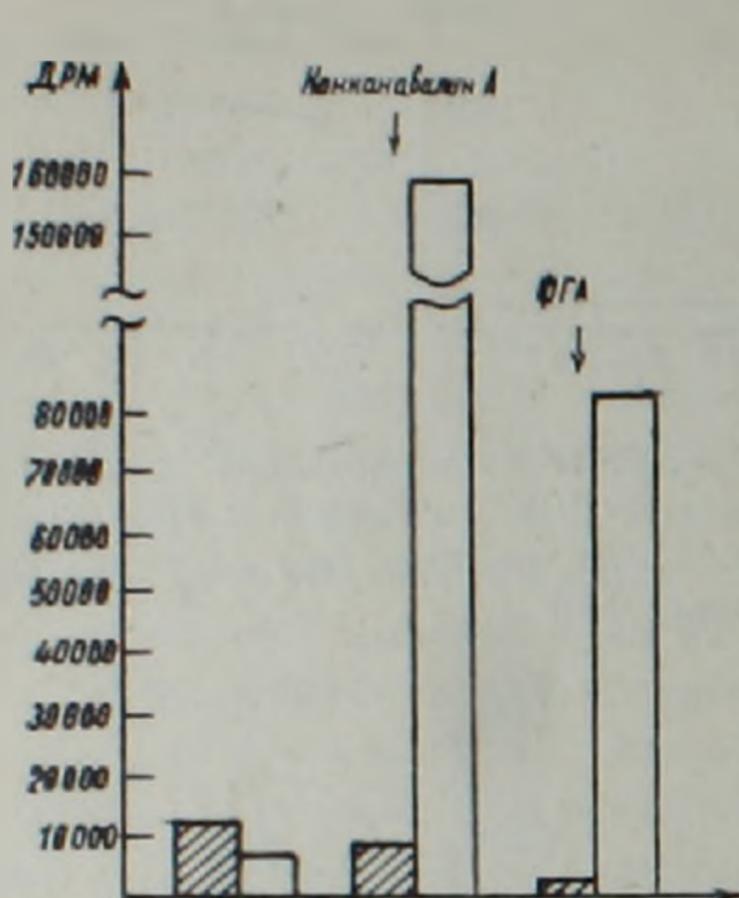


Рис. 3. Влияние ПТГ на включение меченого тимидина в синтез ДНК в спленоцитах крыс в норме и при митогенной стимуляции

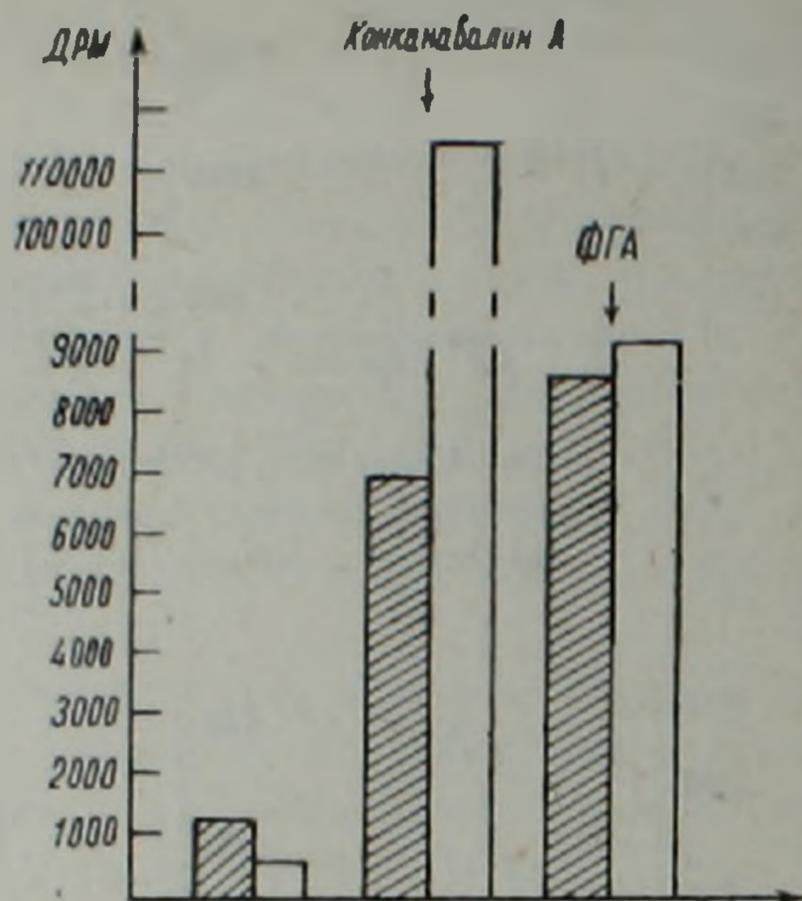


Рис. 4. Влияние ПТГ на включение меченого тимидина в синтез ДНК в тимоцитах крыс в норме и при митогенной стимуляции. Заштрихованная часть — контроль, незаштрихованная — опыт

ПТГ в присутствии конканавалина А стимулировал синтез ДНК в обоих органах на порядок сильнее, чем экстракт (рис. 3, 4).

Введение ФГА в культуральную жидкость, в которой инкубировались спленоциты (рис. 1,в) практически не действовало на синтез ДНК. В тимоцитах же наблюдалась иная картина (рис. 2,в). Экстракт в дозе 20 мкл в присутствии ФГА не изменял митотической активности тимоцитов. В дозе 5 мкл включение меченого тимидина в ДНК увеличивалось в 4 раза, а в дозе 0,5 мкл — в 2 раза по сравнению с контролем. Эффект ПТГ и экстракта при введении ФГА различался в обоих органах. В селезенке ПТГ стимулировал синтез ДНК приблизительно в 30 раз, в то время как экстракт не оказывал действия. В тимусе ПТГ практически не изменял контрольного уровня синтеза ДНК, а экстракт повышал его в 2—4 раза.

Введение полученного экстракта в культуральную среду, содержащую спленоциты мыши линии СВА, не вызывало изменений во включении меченого тимидина в ДНК. В тимоцитах же влияние экстракта было значительным: в дозе 20 мкл экстракт вызывал увеличение синтеза ДНК приблизительно в 2 раза, 4-кратное уменьшение дозы вызывало стимуляцию синтеза ДНК в 4 раза, при дальнейшем уменьшении дозировки до 0,5 мкл включение трития в ДНК оставалось выше контрольного уровня в 3 раза.

В дозе 20 мкл ПТГ практически не влияет на синтез ДНК и в

тимусе и в селезенке мыши. При 4-кратном уменьшении дозировки в обоих органах синтез увеличивается приблизительно в 7 раз. При 40-кратном уменьшении дозировки ПТГ действует разнонаправленно: стимулирует синтез ДНК в тимоцитах приблизительно в 2 раза и подавляет его в спленоцитах почти в 3,4 раза.

Присутствие конканавалина А в культуральной жидкости снижает включение трития в ДНК в лимфоцитах селезенки мыши во всех трех используемых дозах: около 1,2 раза в дозе 20 мкл, в 1,6 раза в дозе 5 мкл и в 1,5 раза в дозе 0,5 мкл. В тимоцитах в присутствии конканавалина А уменьшается синтез ДНК при дозировке в 20 мкл экстракта, несколько увеличивается в дозе 5 мкл и не изменяется по сравнению с контролем в дозе 0,5 мкл.

Добавление в культуральную среду, содержащую спленоциты мыши, ФГА снижало синтез ДНК в 1,4 раза при дозе экстракта 20 мкл и стимулировало при дозе 5 мкл приблизительно в 1,3 раза. В дозе 0,5 мкл включение трития практически не отличалось от контрольного уровня. В тимоцитах добавление ФГА в культуральную жидкость снижало синтез ДНК при дозировке экстракта в 20 мкл в 2,3 раза. 4- и 40-кратное уменьшение дозировки не вызывало изменений в синтезе ДНК.

Полученные данные не дают возможности однозначно определить, существует один или несколько факторов, обладающих иммуномодуляторной активностью в полученных экстрактах. Однако совершенно очевидно, что получаемые препараты обладают мощными биологическими потенциями по отношению к лимфоидным клеткам. Не до конца выясненным остается биологический смысл существования подобной регуляции. Однако ряд факторов, таких как единовременное развитие в эмбриогенезе ПЩЖ и тимуса из одной группы клеток (3—4 жаберные каналы), выделение из тимуса продуктов, обладающих высокой кальцийрегулирующей активностью, резкое повышение уровня гормонов ПЩЖ после тимэктоми, а также необычайно яркие проявления в Вастинг-синдроме недостаточности функции кальцийрегулирующей системы (<sup>9, 10</sup>) позволяет предположить существование тесных реципрокных взаимодействий между тимусом и ПЩЖ, о чем также свидетельствуют полученные нами результаты.

Центральная научно-исследовательская лаборатория  
Ереванского медицинского института

Խ. Ս. ՍԱՅԱԴՅԱՆ, Ա. Վ. ԶԻՆՅԱՆ, Ի. Ա. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Գ. Գ. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ, Մ. Ի. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Հարվահանաձև գեղձերի մզվածքների ազդեցությունը  
ԴՆԹ-ի սինթեզի վրա լսրուրատուր կենդանիների բիմուսի  
և փայծաղի լիմֆոցիտներում

Հետադոտված է Са—հոմեոստազը ապահովող հորմոնների և հարվահանաձև գեղձերի մզվածքների ազդեցութլունը տարրեր լիմֆոիդ հյուսվածքներից սուսցված լիմֆոցիտների միտոտիկ ակտիվության վրա: Ցույց է տրբ-

ված, որ հետազոտվող նյութերը ունակ են փոփոխելու լիմֆոցիտների ֆունկցիոնալ ակտիվությունը ինչպես նորմալում, այնպես էլ մտոգենների ազդեցության տակ:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ը Ն Ո Ւ Ր Յ Ո Ւ Ն

- <sup>1</sup> И. А. Држевецкая, Ю. М. Држевецкий, Итоги науки и техники. Физиология человека и животных, т. 27, с. 78, Наука М., (1983). <sup>2</sup> J. A. Flisher, J. W. Blum, W. Born e. a., Calc. Tiss Intern., v. 34, № 4, p. 313—316 (1982). <sup>3</sup> E. M. Brown, Miner. Electrol. Metabol., v. 8, № 3—4, p. 130—150 (1982). <sup>4</sup> B. Kemper, J. H. Habener, A. Rich, J. T. Potts Jr., Science, v. 184, № 4133, p. 59—61 (1974). <sup>5</sup> J. R. Moran, W. Born, C. R. Tuschmid e. a., Endocrinology, v. 108, № 6, p. 2264—2268 (1981). <sup>6</sup> J. J. Morrissey, D. V. Cohn, Endocrinology, v. 103, № 6, p. 2081—2090 (1978). <sup>7</sup> H. T. Keutmann, Clinics in Endocrinology and Metabolism, v. 3, № 2, p. 173—197 (1974). <sup>8</sup> Л. А. Зильбер, Иммунохимический анализ, Медицина, М., 1969. <sup>9</sup> Е. Н. Кемелева, Вилочковая железа, София, Здоровье, 1985. <sup>10</sup> Р. В. Петров, Иммунология, Медицина, М., 1983.