

ного потомства гемивариэктомированных крыс имеют признаки опережающего развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Введение в количественную патологическую морфологию.— М., 1980.
2. Акмаев И. Г., Калимуллина Л. Б. // Арх. анат.— 1982.— № 12.— С. 48—59.
3. Бенедиктов Д. И., Сапир М. В. // Акуш. и гин.— 1991.— № 4.— С. 57—59.
4. Леонтьев Л. А. Биологическая роль овариопексий.— Минск, 1979.
5. Рыжавский Б. Я., Бачалдин С. Л., Сугкоева И. Р., Плотникова С. А. // Актуальные проблемы патологии беременности и детского возраста на Дальнем Востоке.— Новосибирск, 1989.— С. 151—156.
6. Рыжавский Б. Я., Учакина Р. В., Тюрюханова И. Д., Солoduха О. Е. // Бюл. Сиб. отд. АМН.— 1988.— № 1.— С. 67—69.
7. Рыжавский Б. Я., Учакина Р. В., Лебедев О. А. и др. // Там же.— 1989.— № 5.— С. 63—65.
8. Сурина М. П. // Пробл. эндокринологии.— 1967.— № 4.— С. 56—59.
9. Butsher R. L. // Biol. Reprod.— 1985.— Vol. 32, N 2.— P. 315—321.

© И. А. БЕЗВЕРШЕНКО, М. М. ГОЙДАШ, 1993

УДК 612.433.65.06:612.438.11-08

И. А. Безвершенко, М. М. Гойдаш

ДЕЙСТВИЕ СОМАТОТРОПИНА И НЕПЕПТИДНОГО МИТОГЕННОГО ФАКТОРА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ТИМОЦИТОВ

Лаборатория молекулярных механизмов иммунитета (руководитель — доктор мед. наук И. А. Безвершенко) Киевского НИИ эндокринологии и обмена веществ (дир. — проф. Н. Д. Тронько) Минздрава Украины

Гипофиз играет существенную роль в регенерации вилочковой железы [5, 8, 9], о чем свидетельствует инволюция тимуса, наступающая в результате гипофизэктомии [5, 8]. Известно также, что соматотропин (СТГ) ускоряет включение ³H-тимидина в ДНК кортизончувствительной популяции тимоцитов [8]. Кроме того, введение СТГ способствует восстановлению нормальной структуры тимуса у гипофизэктомированных животных [5]. В то же время восстановление массы вилочковой железы и количества тимоцитов в ней, наступающее после введения гидрокортизона, происходит за счет пролиферации кортизонрезистентных, так называемых двойных отрицательных (СД4⁻, СД8⁻) тимоцитов, не имеющих рецепторов для СТГ [4, 8, 9]. Ускорение регенерации вилочковой железы, уменьшенной в результате введения гидрокортизона, *in vivo* достигается также введением непептидного митогенного фактора (НМФ) [1]. Его митогенное действие на тимоциты сопряжено с внутри- и внеклеточным накоплением гипоксантина, который отменяет ограничение синтеза ДНК в тимоцитах, обусловленное относительным дефицитом пуриноклеозидфосфорилазной активности в этих клетках [7]. Аналогичное действие оказывает хорошо известный Т-клеточный поликлональный митоген — конканавалин А [2].

В настоящем исследовании мы попытались выяснить механизм действия СТГ на пуриновый метаболизм.

Материалы и методы

Опыты выполнены на крысах линии Wistar массой 180—200 г. Для воспроизведения митогенного действия СТГ на не-

10. Fleming M. W., Rhodes R. C., Bailey R. A. // *Ibid.*— 1984.— Vol. 30, N 1.— P. 82—86.

11. Redmer D. A., Christenson R. K., Ford J. J., Day B. N. // *Ibid.*— Vol. 31, N 1.— P. 59—66.

Поступила 09.10.91

B. Ya. Ryzhavsky, I. R. Yeryomenko, Ye. V. Vasilyeva, N. V. Nagorskaya — SPECIFIC FEATURES OF THE PROGENY OF UNILATERALLY OVARIECTOMIZED RATS

Summary. Five-day progeny of 12 hemiovariectomized rats (111 ratlings) and of 9 intact females (81 ratlings) were examined. Hemiovariectomy was carried out 1.5-2 months before pairing with intact males. Body, testicle, ovary, adrenal, and brain mass was measured. The number of follicles in the ovaries, the section size of the tortuous seminal canaliculi in the testes, 3 β -ol-steroid dehydrogenase activity in the adrenocorticocytes of the adrenocortical bundle zone were under study. The findings evidence a higher body mass, brain, testicular, and adrenal mass of the 5-day progeny of ovariectomized rats. Signs of advanced formation of the follicles and great numbers thereof were found in the ovaries. Another finding was a significant elevation of 3 β -ol-steroid dehydrogenase activity in the cells of the adrenocortical bundle zone. Therefore, 5-day ratlings of the test group presented with signs of advanced physical development of the examined endocrine glands.

разделенные тимоциты крысы использовали СТГ быка, выделенный методом S. Ellis [3] и любезно предоставленный нам доктором мед. наук Ф. П. Мартыненко. О митогенном действии на тимоциты судили по включению ¹⁴C-тимидина в ДНК тимоцитов крысы [5, 8]. Влияние СТГ и НМФ на распределение ¹⁴C-адениловой кислоты (АМ-2-Р) среди ее катаболитов изучали с помощью хроматографии на бумаге [1]. Тимоциты 4·10⁷ инкубировали в 4 мл среды Хенкса, содержащей 0,175 мМ АМ-2-Р в течение 45 мин при 37 °С в присутствии 50 мкг НМФ или без него. Для исследования действия СТГ в инкубационную среду вводили 250 мкг гормона. Для изучения действия СТГ на кортизонрезистентную популяцию тимоцитов крысам Wistar вводили по 5 мг гидрокортизона в 1 мл 0,14 М NaCl в течение 2 дней, после чего извлекали тимус и выделяли тимоциты с помощью слабо притертого гомогенизатора Поттера Эльвейема.

После 45-минутной инкубации неразделенных (суммарных) или кортизонрезистентных тимоцитов в присутствии НМФ или СТГ клетки отмывали средней Хенкса и добавляли новую порцию среды, содержащую такое же количество НМФ или СТГ, и снова инкубировали. В контрольные пробы НМФ или СТГ не добавляли. Через 20, 40 и 60 мин отбирали по 1 мл суспензии, клетки отделяли центрифугированием при 1500 об/мин и отбирали надосадочную жидкость. К осадку добавляли адекватное количество среды. Клетки и надосадочную жидкость экстрагировали 4,2 М раствором хлорной кислоты (конечная концентрация 0,42 М), нейтрализовали экстракт 4,22 М КОН и осадок хлората калия удаляли центрифугированием. 50 мкл нейтрализованного экстракта наносили на бумагу FN-2 (ГДР), хроматографировали в системе растворителей ацетонитрил—0,1 М ацетат аммония—аммиак (6:3:1) в присутствии свидетелей—АМФ, аденозина, гипоксантина, инозина и гуанозина [1]. Гуанозин отделяли от гипоксантина в системе растворителей ацетонитрил—0,1 М ацетат аммония—уксусная кислота (60:30:2).

Результаты и их обсуждение

Инкубация неразделенных тимоцитов с СТГ (концентрация 50—400 мкг на 5·10⁶ клеток в 1 мл) усиливает включение 2-¹⁴C-тимидина в ДНК кор-

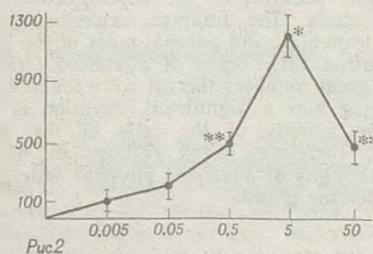
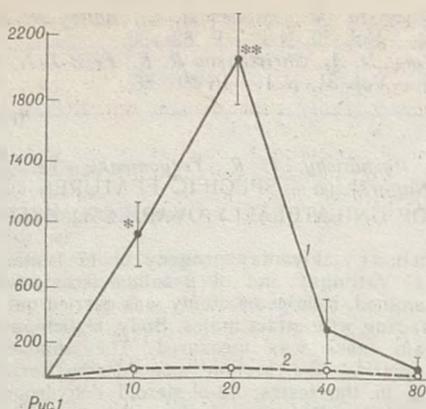


Рис. 1. Влияние СТГ на включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК суммарной (1) и кортизонрезистентной (2) популяции тимоцитов крыс. Время инкубации 4 ч.

По оси ординат (здесь и на рис. 2) — разница между уровнем включения метки в опыте и контроле (в имп/мин); по оси абсцисс — доза СТГ (в мкг на 10^6 клеток).
Здесь и на рис. 2 достоверность различий между уровнем включения метки в опыте и контроле: одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,02$.

Рис. 2. Влияние гипоксантина на включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК кортизонрезистентных тимоцитов мышей.

По оси абсцисс — доза гипоксантина (в мкг на 10^6 клеток)

тизонрезистентных тимоцитов. Максимальное включение тимидина наблюдалось при концентрации СТГ $100 \text{ мкг на } 5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Дальнейшее повышение концентрации гормона не увеличивает включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК тимоцитов. На рис. 1 представлена разница между включением $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК тимоцитов в присутствии СТГ и без него. Результат практически не отличается от ранее представленного G. Talwar [8]. Однако под влиянием СТГ накопления гипоксантина, образующегося из АМ-2-Р, мы не наблюдали. Таким образом, увеличение включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК неразделенных тимоцитов непосредственно не связано с накоплением гипоксантина. В таблице представлен уровень гипоксантина в неразделенных тимоцитах при концентрациях СТГ, ускоряющих включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК тимоцитов. Как и следовало ожидать, инкубация кортизонрезистентных тимоцитов с СТГ не приводит ни к ускорению включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК (см. рис. 1), ни к увеличению накопления гипоксантина (см. таблицу). В то же время накопление гипоксантина под влиянием НМФ, выделенного из вилочковой железы, наблюдается только при использовании гидрокортизонрезистентных тимоцитов. Инкубация гидрокортизонрезистентных тимоцитов с гипоксантином в концентрациях, встречающихся при стимуляции НМФ ($25 \text{ мкг на } 5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл), вызывает увеличение включения $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК этих клеток (рис. 2). Это прямо указывает на то, что митогенное действие НМФ

зависит от накопления гипоксантина, вызываемого этим фактором. Усиление накопления гипоксантина под влиянием НМФ также наблюдается только в случае использования кортизонрезистентных тимоцитов (см. таблицу).

Таким образом, объектом митогенного действия СТГ и НМФ являются совершенно разные популяции тимоцитов. Можно утверждать также, что и механизм увеличения включения тимидина в ДНК тимоцитов под влиянием СТГ отличается от такового под влиянием НМФ. Действительно, вызываемого НМФ накопления гипоксантина в кортизонрезистентных тимоцитах достаточно для ускорения и/или отмены ограничения синтеза ДНК в этой популяции клеток, СТГ увеличивает включение тимидина в ДНК только кортизончувствительных клеток, не влияя при этом на уровень гипоксантина.

Представленные данные свидетельствуют о том, что регенерация вилочковой железы, по крайней мере, наступающая после введения гидрокортизона, происходит за счет разных источников и контролируется не единственным фактором. Известно, что быстрая инволюция вилочковой железы, наступающая после введения гидрокортизона млекопитающим, сопровождается энергичным размножением кортизонрезистентных субкапсулярных тимоцитов, несущих на поверхности Thy-1 антиген и не имеющих СД4 и СД8 антигенов. Принято считать, что восстановление массы и количества Т-клеток вилочковой железы происходит в основном за счет пролиферации именно этих клеток. Данные клетки чувствительны к токсическому действию дезоксигуанозина, который может накапливаться в них в силу особенного соотношения активности ферментов пуринового метаболизма и тормозит синтез ДНК [7]. Чувствительность этих клеток к дезоксигуанозину подавляется дезоксицитидином, который продуцируют и выделяют тимусные макрофаги. Активированные Т-лимфоциты периферической крови и медуллярные тимоциты, имеющие зрелый антигенный фенотип, также чувствительны к дезоксигуанозину, однако у этих клеток токсичность дезоксигуанозина и торможение синтеза ДНК подавляются гипоксантином, а не дезоксицитидином. Накопление гипоксантина кортизонрезистентными клетками в концентрациях, ускоряющих включение $2\text{-}^{14}\text{C}$ -тимидина под влиянием НМФ, свидетельствует о том, что этот фактор действует на медуллярные кортизонрезистентные клетки зрелого фенотипа. Таким образом, регенерация вилочковой железы, уменьшенной после введения гидрокортизона, может происходить за счет

Влияние НМФ тимуса на включение ^{14}C -АМ-2-Р во внеклеточный гипоксантин кортизонрезистентных тимоцитов и СТГ на включение во внеклеточный гипоксантин неразделенных тимоцитов крысы *in vitro* (имп/мин; $n=5$; $\Delta M \pm m$)

Время инкубации	СТГ	НМФ
20 мин	90 ± 251	$843 \pm 231^*$
40 мин	144 ± 69	$1081 \pm 130^{***}$
60 мин	36 ± 72	$1327 \pm 346^{**}$

Примечание. ΔM — разница между уровнем включения метки в опыте и контроле. Различия между контролем и опытом достоверны: одна звездочка — $p < 0,05$; две — $p < 0,02$; три — $p < 0,01$.

пролиферации двух кортизонрезистентных популяций, контролируемых разными факторами. Пролиферация кортизончувствительных клеток, формирующихся из субкапсулярных СДЗ⁺, СД4⁺, СД8⁺ кортизонрезистентных клеток, контролируется СТГ [10].

Выводы

1. СТГ не оказывает влияния на кортизонрезистентные тимоциты, чувствительные к НМФ.

2. НМФ увеличивает накопление внутри- и внеклеточного гипоксантина в железе, что оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию кортизонрезистентных тимоцитов.

3. Вызванное СТГ ускорение синтеза ДНК в кортикальных тимоцитах не связано с изменением концентрации внутри- и внеклеточного гипоксантина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безвершенко И. А., Гойдаш М. М., Премыслов В. Х. // Укр. биохим. журн.— 1989 — Т. 61, № 1.— С. 52—57.
2. Дмитренко Н. П., Комиссаренко С. В., Буханевич Т. В. // Иммунология.— 1985.— № 3.— С. 74—75.
3. Ellis S. // Endocrinology.— 1961.— Vol. 69, N 3.— P. 554—570.
4. Ceredig R., MacDonald R. // J. Immunol.— 1982.— Vol. 120, N 2.— P. 614—620.
5. Pandian M. R., Talwar G. P. // J. exp. Med.— 1971.— Vol. 134.— P. 1095—1113.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.379-008.64-92.9-07:616.36-008.931

Л. И. Апуховская, М. В. Стефанов, Л. В. Антоненко, Л. И. Омельченко

ТРАНСПОРТ ВИТАМИНА D₃ ЧЕРЕЗ КИШЕЧНИК И ЕГО ОБМЕН В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Лаборатория медицинской биохимии (руководитель — канд. биол. наук Л. И. Апуховская) Института биохимии АН Украины, Киев

Сахарный диабет, возникновение которого связано с недостаточностью функции β-клеток поджелудочной железы, сопровождается нарушением многих видов обмена в организме [2, 4]. Исследования последних лет свидетельствуют также о взаимосвязи развития сахарного диабета и обмена витамина D. С одной стороны, показано, что сахарный диабет приводит к развитию диабетической остеопении, нарушению минерального гомеостаза, который проявляется не только снижением содержания минеральных компонентов в сыворотке крови, но и усилением экскреции кальция с мочой, ингибированием его активного транспорта через кишечник [5, 13]. Одной из возможных причин перечисленных нарушений при сахарном диабете может быть недостаточностью обеспечения организма активными метаболитами витамина D, хотя данные литературы по этому вопросу несколько противоречивы [9, 10]. Кроме того, имеются указания, что 1,25-дигидроксиголекальциферол регулирует рост, созревание и функциональную активность β-клеток поджелудочной железы [6, 7].

С другой стороны, инсулин оказывает прямое стимулирующее влияние на активность гидроксилаз витамина D в печени и почках [8, 11]. Поэтому недостаточность инсулина может послужить

6. Pierpaoli W., Sorkin E. // Nature.— 1967.— Vol. 215, N 5.— P. 834—837.
7. Scharenberg G. M., Rijkers G. T., Spaapen J. M. et al. // J. Immunopharmacol.— 1988.— Vol. 10, N 6.— P. 675—680.
8. Talwar G. P. // Proc. Indian. nat. Sci. Acad.— 1979.— Vol. 45, N 2.— P. 97—114.
9. Wilson A., D'Amico A., Ewig T. et al. // Immunology.— 1988.— Vol. 140, N 5.— P. 1461—1469.
10. Zuniga-Pflucker J. C., Kruisbeek A. M. // J. Immunol.— 1990.— Vol. 144, N 10.— P. 3736—3740.

Поступила 29.01.92

I. A. Bezvershenko, M. M. Goidash — EFFECTS OF SOMATOTROPIN AND PEPTIDE MITOGENIC FACTOR ON THYMOCYTE PROLIFERATIVE ACTIVITY

Summary. Hydrocortisone-resistant thymocyte proliferation is stimulated by the nonpeptide mitogenic factor. *In vivo* incubation of hydrocortisone-resistant thymocytes in the presence of the nonpeptide mitogenic factor results in accumulation of extra- and intracellular hypoxanthine, originating from 8-¹⁴C-adenylic acid. Stimulation of *in vitro* incorporation of 2-¹⁴C-thymidine in the thymocyte DNA may be effected via the somatotrophic hormone in case nonseparated thymocytes (but not hydrocortisone-resistant ones) are used. No hypoxanthine accumulation in somatotropin-stimulated nonseparated rat thymocytes was observed. 2-¹⁴C-thymidine incorporation in the hydrocortisone-resistant thymocyte DNA was enhanced by incubation of the cells in the presence of hypoxanthine in concentrations observed after thymocyte stimulation with nonpeptide mitogenic factor. The authors come to a conclusion that somatotropin and nonpeptide mitogenic factor stimulate the proliferation of two different thymocyte populations, that may be involved in the process of proliferation and regeneration of the thymus exposed to steroids.

причиной нарушения обмена витамина D в организме. Снижение обеспеченности организма витамином D в свою очередь может усугублять степень уменьшения содержания инсулина, так как известно, что у крыс с недостатком витамина D ингибируется секреция инсулина. Введение витамина D приводит к нормализации этого процесса [5, 12].

Возможными причинами недостаточности витамина D при диабете могут быть как нарушение транспорта холекальциферола через кишечник, так и нарушения процессов его гидроксилирования. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование обмена витамина D при сахарном диабете. Изучение этой проблемы по-

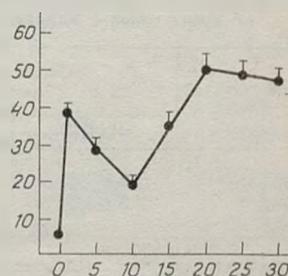


Рис. 1. Содержание глюкозы в сыворотке крови крыс после внутривенного введения аллоксана.

По оси ординат — уровень глюкозы (в мг/дл); по оси абсцисс — время наблюдения (в сут).