

## БИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ГУМОРАЛЬНОГО ФАКТОРА, ВЫРАБАТЫВАЕМОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

А. А. ЯРИНИН, В. Ю. ТАТАЕВ, Н. Н. ШАРОВА  
В. П. ШИЧКИН, И. В. МИРОШНИЧЕНКО

Институт иммунологии Минздрава СССР, Москва

Анализ цитоплазматической РНК выявил наличие мРНК лимфотоксина, уровень которой увеличивается после обработки клеток фторболовым эфиром. Эти данные свидетельствуют о том, что аутокринный фактор роста клеток РРМ1-6410 и синтезируемый ими цитотоксический фактор — один и та же молекула — лимфотоксин человека.

Յուշյո՛ւ ի տրո՛ւմ, որ Բ-լիմֆոցիտների նախորդների հոգնիք նախարկող տարրերը ֆունկցիոնալորը ունի րաճութուն (հեմոպոեզի) հսկողությունը և թիմուսում (որդանի ազդեցությամբ) պարճանաճութուն են արհեստի քիմիկատներու պրոճենով:

It was concluded that this bifunctional factor mediates different functions of TLP in bone marrow (control of haematopoiesis) and thymus (role in organ regeneration).

*Переводчик: Т-лимфоцитов — костный мозг.*

Процесс развития Т-лимфоцитов осуществляется в костном мозгу и тимусе. В костном мозгу происходит детерминация развития клеток в направлении Т-лимфоцитов, итогом которой является образование ПТЛ [10, 7]. Последние мигрируют в тимус, где реализуется дальнейшая дифференцировка Т-клеток. Таким образом, ПТЛ являются связующим звеном между двумя компартментами, в которых осуществляется развитие лимфоцитов Т-ряда.

В костном мозге ПТЛ выступают в качестве хелперов кроветворения [6]. В тимусе они служат камбиальными элементами, обеспечивая регенерацию органа после действия опустошающих факторов (стресса, облучения) [9]. И в костном мозгу, и в тимусе ПТЛ присутствуют как в менее активной, покоящейся, так и активированной формах [1], т. е. одни и те же клетки в разных органах выполняют различные функции.

Ранее нами было показано, что хелперная функция ПТЛ в реакциях гемопоэза опосредована гуморальным фактором [3, 12]. Пролиферация внутритимусных предшественников Т-клеток также обусловлена аутокринным ростовым фактором, выделяемым самими ПТЛ [5]. В данной работе показана идентичность этих факторов, обнаруженная в процессе их очистки; это свидетельствует о том, что различные функции ПТЛ в костном мозгу и тимусе опосредуются одним и тем же бифункциональным фактором.

Сокращения: ПТЛ — предшественники Т-лимфоцитов; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

**Материал и методика.** Источником исследованного гуморального фактора служили надосадки клеток линии TC, SC-1/2.0, полученной В. И. Швакшим и представляющей собой линию трансформированных ПТЛ [4]. Для получения надосадочных клеток культивировали в бесывороточной среде в течение 4 суток при 37°C в 1 мл нейтральной среды 7·10<sup>5</sup> клеток в 1 мл [2].

Очистку фактора осуществляли в три этапа [2]. Первый из них представлял собой осаждение в интервале 40—80%-ного насыщенности сульфата аммония. Второй этап очистки—гель-фильтрация на ультраделе А:А 54 (LKB) (колонны 0,7×85 см, скорость элюции—2 мл/ч, ионизирующий раствор—0,15 М NaCl на 0,05 М HEPES-буфере pH 7.2, размер порций элюата—1 мл). Активная фракция подвергалась дальнейшей очистке методом ВЭЖХ на колонках с сорбентом С-4 (хроматограф Altex); элюция осуществлялась в градиенте ацетонитрила на 30 мМ растворе бикарбоната натрия. Гомогенность фактора и его молекулярная масса определялись методом электрофореза в полиакриламидном геле с ацетилсульфатом натрия (Fast gel 8—25) с окрашиванием белковых фракций серебром в аппарате Fast system (Pharmacia).

Ростовую активность фактора оценивали по стимуляции пролиферации 3H-тимидином тимомитов. Тимомиты мышей линии СВА (10<sup>6</sup>/мл) культивировали в 96-луночных планшетах (Costar) в среде RPMI 1640 с добавлением 10%-ной телячьей эмбриональной сыворотки (принадлежность ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи), 1-глютамина (300 мкг/мл) и гентамицина (100 мкг/мл) в течение 5 суток при 37°C в атмосфере с 5%-ным CO<sub>2</sub>. Надосадки или очищенный фактор добавляли в равном объеме (0,2 мл на ячейку) в пробы культивирования; в контрольные лунки вместо фактора добавляли равный объем среды. За 8 ч до окончания культивирования в лунки вводили 1,8·10<sup>4</sup> Бк 3H-тимидина. Клетки собирали на харвестере (Flow) и оценивали включение метки на сцинтилляционном счетчике β-Tac. Обогащение SC-1+Thy-1+ клеток костного мозга (активированных ПТЛ) осуществляли методом последовательной адгезии (пептиста) на пластиковых чашках, нагруженных IgG-фракцией антисывороток к антигенам SC-1 и Thy-1 (антимозговых сывороток, истощенных соответственно тимомитами и костным мозгом) [1]. SC-1+Thy-1+клеток костного мозга мышей получали путем обработки костного мозга антисыворотками к SC-1 и Thy-1 антигенам в сочетании с компонентом морской спинки [1]. Фракцию дубль-отрицательных (L3T4-Lyt-2-) тимомитов получали обработкой тимомитов мышей моноклональными антителами к антигенам L3T4 (129-19.6) и Lyt-2 (435-17.2) в сочетании с компонентом кролика. В работе использованы также интерлейкин-2 (ИЛ-2) зависимая линия С11.4.2 (получена у О. П. Терехова), ИЛ-3-зависимая линия 32D 1-23 (получена у В. А. Носемейкина), моноклональные антитела к ИЛ-4 (11H1) и рецепторам для ИЛ-2 (7D4), моноклональные антитела обоих типов получены у Б. Д. Брошмана.

Селезеночное коликобразование осуществляли в чашках и эндотестах [1]. При постановке эндотеста мышам (CBA/J) вводили SC-1+Thy-1+клетки (10<sup>6</sup>) вместе с исследуемым фактором внутривенно. При постановке эндотеста мышам-гибридам внутривенно вводили только исследуемый фактор (в контроле—среду). Число колоний определяли на 9 сутки путем визуального подсчета колоний на поверхности селезенки, фиксированных раствором Буэля.

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

**Результаты и обсуждение.** Надосадки 1-суточных культур клеток линии TC, SC-1/2.0 и 6-часовых культур нормальных SC-1+Thy-1+клеток костного мозга мышей обладали ростовой активностью по отношению к тимомитам (рис. 1) и колониестимулирующей активностью в экзо- (рис. 2) и эндотестах. При этом мишенью ростового фактора, содержащегося в надосадках, служили ПТЛ, представленные в костном мозге SC-1+Thy-1+клетками, а в тимусе—L3T4-Lyt-2-клетками [1, 8] (рис. 1). В тестах колониобразования мишенью фактора являются кроветворные клетки, содержащиеся в SC-1+Thy-1+фракции,

которые без воздействия фактора не способны формировать колонии (рис. 2).



Рис. 1

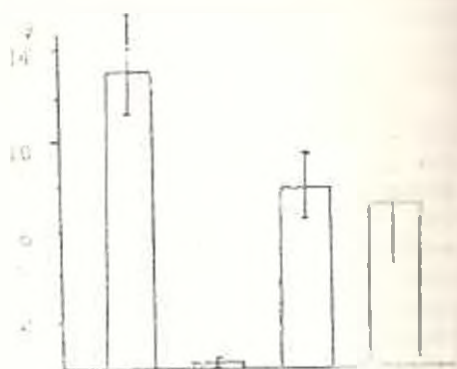


Рис. 2

Рис. 1. Проллиферативный ответ клеток различных типов на действие надосадка клеток TC.SC-1/2.0 (А) и очищенного ФРГ (Б). Отмечающие клетки: 1—нефракционированные тимоциты; 2—L3T4 Ly:2—timoциты; 3—SC-1—timoциты; 4—CTLE-2, 5—32D.1-23, 6—timoциты без добавления антигена; 7—timoциты в присутствии антигена к ИЛ-4, 8—timoциты в присутствии антигена к рецепторам для ИЛ-2. По оси ординат—индекс стимуляции (отношение включения 3H-тимидина в клетках к контрольным образцам).

Рис. 2. Хелперный эффект надосадков ПТЛ в тесте на железо-зависимое колониеобразование. Обученным мышам вводили: 1—клетки костного мозга; 2—SC-1+Thy-1—фракцию клеток костного мозга; 3—то же с добавлением надосадка SC-1+Thy-1+клеток костного мозга; 4—то же клетки с добавлением надосадка клеток линии TC.SC-1/2.0. По оси ординат—число экзоклонов в селезенке.

Очистка фактора, проводившаяся под контролем ростовой активности, подробно описана [2]. Здесь мы остановимся лишь на деталях, свидетельствующих об идентичности ростового и колоние-стимулирующего факторов. На рис. 3 представлены результаты гель-

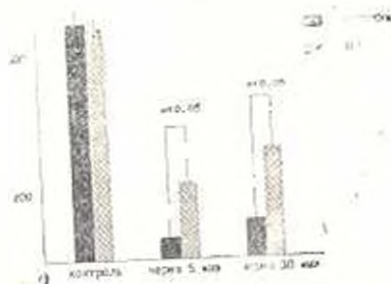


Рис. 3. Профиль гель-фильтрации надосадков клеток линии TC.SC-1/2.0 на ультрагеле AcA 54. Кривая элюции белка. Затрихованные прямоугольники—зоны элюции ростовых факторов; черные прямоугольники—зона элюции фактора, супрессирующего колониеобразование; белый—зона элюции фактора, стимулирующего колониеобразование. Стрелками помечены пики элюции белков с указанной молекулярной массой. По оси абсцисс—номера фракций, по оси ординат—абсорбция материала при 280 нм.

филтрации высолённых надосадков ПТЛ. На этом этапе очистки разделяются две фракции, обладающие ростовой активностью. Одна из них элюируется в зоне, соответствующей элюции белков с молекулярной массой около 30 кД, другая—в более низкомолекулярной зоне. Тестирование активности этих фракций выявило различия в кинетике пролиферативного ответа тимоцитов и спленоцитов на эти клетки с более быстрым развитием ответа на 30кД-компонент (пик ответа на 3—4 сутки), чем на низкомолекулярный компонент (пик ответа на 6—7 сутки). Дальнейшая очистка подвергался компонент с мол. массой 30 кД.

В той же 30 кД-фракции присутствовала колоннестимулирующая активность, которая на этом этапе очистки отделялась от более высокомолекулярного супрессорного фактора (мол. масса около 45 кД). (рис. 3). Ранее было показано, что супрессорный фактор выделяется вместе с хелперным фактором колониеобразования активированным ПТЛ и может быть инактивирован прогреванием при 56° или инкубацией при pH 2 или 10 [3]. Супрессорная активность определялась по отмене эффекта хелперного колоннестимулирующего фактора [12].

Первым двум этапам очистки были подвергнуты оба источника активностей с аналогичными результатами. Дальнейшей очистке был подвергнут только надосадок клеток линии TC. SC—1/2.0.

При ВЭЖХ ростовая активность элюируется при 23.1%-ной концентрации ацетонитрила (в отдельных экспериментах—также при 24%-ной концентрации). В основном, четвертом пике удельная ростовая активность составляла  $2,9 \cdot 10^6$  ед/мг белка при исходной удельной активности надосадка 18 ед/мг белка (единица активности—количество материала, дающее полумаксимальный ростовой эффект в культуре тимоцитов на 5 сутки ответа). Таким образом, удельная активность возросла в 160 млн раз. Выход активности при этом составлял около 6%. При электрофорезе материала пика в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия методом серебрения была выявлена единственная белковая фракция, с молекулярной массой 22 кД. Таким образом, ориентировочная оценка мол. массы фактора методом гель-филтрации оказалась завышенной, что неоднократно наблюдалось при аналогичной оценке мол. масс некоторых интерлейкинов. В виде примеси 22 кД-фракция присутствовала в соседних

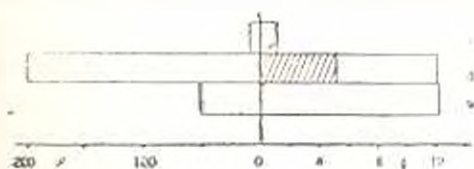


Рис. 4. Присутствие ФРТ и хелперного фактора колониеобразования в одной и тех же фракциях, полученных при ВЭЖХ надосадка клеток линии TC.SC-1/2.0. Цифры справа—номера фракций. Столбики слева—активность ФРТ (на шкале—единицы активности). Столбики справа—число колоний в селезенке. Незатрихованные столбики—число эндогенных колоний (в контроле—в среднем 1,1 колония), затрихованный столбик—число экзоколоний (в контроле отсутствуют).

порциях элюата, которые обладали соответственно выраженной ростовой активностью (рис. 4).

При тестировании колоннестимулирующей активности элюата ВЭЖХ, по данным экзотеста, хелперная активность выявлена в основном пике, содержащем гомогенный 22 кД-продукт. Из этого однозначно следует, что ростовая и хелперная колоннестимулирующая активности связаны с одной и той же молекулой. При оценке эффектов в эндотесте максимальная стимуляция колоннообразования обнаружена в той же и соседней фракции; в более слабой степени образование эндокolonий стимулировалось материалом других фракций, содержащих 22 кД-продукт и энде примеси (рис. 4).

Таким образом, ПТЛ продуцируют фактор с мол. массой 22 кД, который обладает как минимум двумя эффектами: он стимулирует пролиферацию ПТЛ тимуса без предварительной или сопутствующей стимуляции митогенами и усиливает образование кроветворных колоний в селезенке. Первый эффект отражает способность ПТЛ тимуса к самоподдержанию и самообеспечению пролиферации, что особенно отчетливо проявляется после облучения. Второй эффект, по-видимому, отражает кооперативные взаимодействия между ПТЛ и кроветворными клетками, в норме реализуемые в костном мозге. Таким образом, различные функции, которые ПТЛ осуществляют в костном мозге и тимусе, реализуются весьма экономно—путем выделения одного би-функционального фактора.

Хотя фактор очищен до гомогенности, его структура не выяснена. В связи с этим мы не можем с уверенностью утверждать, что имеем дело с новым цитокином. Ясно лишь, что этот фактор не идентичен ИЛ-2 (поскольку он не поддерживает рост ИЛ-2—зависимой линии СИ L-2, и на пролиферацию, вызванную фактором, не влияют антитела к рецептору для ИЛ-2), ИЛ-3 (поскольку он не поддерживает рост ИЛ-3—зависимой линии 32D, cl—23) и ИЛ-4 (поскольку антитела к ИЛ-4 не влияют на пролиферацию тимоцитов, вызванную фактором) (рис. 1). Для обозначения фактора мы используем аббревиатуру ФРТ (от «фактор роста тимоцитов» [5]).

В связи с тем, что ФРТ видоспецифичен, в настоящее время проводится работа по обнаружению и характеристике аналогичного фактора у человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мирошниченко И. В., Ярилин А. А., Шичкин В. П. и соавт. Иммунология, 2, 29—32, 1987.
2. Талаев В. Ю. Канд. дисс., М., 1990.
3. Шарова Н. И., Ярилин А. А., Мирошниченко И. В., Шичкин В. П. Иммунология, 1, 76—79, 1987.
4. Шичкин В. П., Ярилин А. А., Терехов О. П. Цитология, 29, 6, 689—694, 1987.
5. Шичкин В. П., Ярилин А. А., Прохазка Е. А., Талаев В. Ю. Иммунология, 6, 21—26, 1988.
6. Ярилин А. А., Мирошниченко И. В., Шарова Н. И. Иммунология, 6, 51—53, 1988.
7. Ярилин А. А., Мирошниченко И. В., Шичкин В. П. Итоги науки и техники, Иммунология, 23, М., 1990.

8. Fowlkes B. J., Edison L., Matheson B. J., Chused T. M. J. Exp. Med., 162, 82—822, 1985.
9. Kadish J. L., Basch R. S. J. Immunol., 111, 452—457, 1975.
10. Palacios R., Pelkonen J. Immunol. Rev., 101, 5—27, 1988.
11. Tull J. E., McCutcheon E. A. Radiat. Res., 14, 213—222, 1972.
12. Yarin A. A., Miroshnichenko I. V., Sharova N. I. et al. Biomedical Science, 1, 133—138, 1990.

Получено 23 I 1991 г.

Внеш. журн. Армении, № 2(44), 1991

УДК 575.155

## ЛИМФОТОКСИН ЧЕЛОВЕКА КАК АУТОКРИННЫЙ ФАКТОР РОСТА В-ЛИМФОБЛАСТОВ

Г. М. СЕРЕГИН, М. И. МЕКШЕНКОВ, Р. Л. ТУРЕЦКАЯ,  
С. А. МЕДОСНОВ

Институт биологии развития им. Н. К. Колымова АН СССР, Москва  
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва

Исследованиями РНВ-фактора и лимфотоксина (ЛТ) в культуре В-лимфоцитов, а также в культуре В-лимфоцитов, активированных факторами роста, показано, что ЛТ является фактором роста В-лимфоцитов. Эти данные свидетельствуют о том, что ЛТ является фактором роста В-лимфоцитов. Эти данные свидетельствуют о том, что ЛТ является фактором роста В-лимфоцитов.

Northern analysis showed the presence of lymphotoxin mRNA which is further induced after PMA treatment. These data suggest that both autocrine growth factor and cytotoxic activities correspond to the same molecule probably identical to lymphotoxin (TNF- $\beta$ ).

Лимфотоксин человека — мышиный фибробласт — аутокринный фактор роста — цитотоксический фактор.

Лимфотоксин человека, или ФНО- $\beta$ , является одним из продуктов Т-лимфоцитов, активированных митогеном или в реакции гиперчувствительности замедленного типа [20, 12]. Как и другой, родственный ему фактор, ФНО- $\alpha$ , ЛТ характеризуется чрезвычайно широким разнообразием биологических функций *in vivo* и *in vitro*. Оба цитокина обнаруживают сильную противоопухолевую активность *in vivo*, вызывая некроз трансплантируемой саркомы (Meib A), индуцируемой у мышей метилхолантеном [13, 24]. Обнаружено противовирусное действие ЛТ и ФНО- $\alpha$ , проявляющееся в защите ряда линий клеток человека и мыши от инфекции вирусами, например, вирусом стома-тита мочевого пузыря, энцефаломиокардита, герпеса-2 и аденовирусов [34, 18]. Возможно, ЛТ имеет и радиопротекторную активность,

Сокращения: ФНО- $\beta$  — фактор некроза опухолей типа  $\beta$ ; ФНО- $\alpha$  — фактор некроза опухолей типа  $\alpha$ ; ЛТ — лимфотоксин; ФМА — фибробласт — миретат — ацетат; КС — колонизирующая саркома.

