

УДК 616.438+616.155.32:57.083.3

ИММУНОЛОГИЯ

А. В. Зильфян, Х. С. Саядян, В. Г. Хачатрян, М. С. Петросян

Гель-фильтрационная характеристика белковых продуктов жизнедеятельности лимфоцитов тимуса

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР Ю. Т. Алексаняном 18/V 1988)

Иммунная система у высших животных, находясь под сложным влиянием нервных, эндокринных и медиаторных воздействий, обладает высокой степенью автономности в распознавании и элиминации генетически чужеродных клеток и субстанций. Эту важную функцию она осуществляет с помощью гормонов, медиаторов и других биологически активных соединений, вырабатываемых самой иммунной системой. Описано около 30 растворимых субстанций этого ряда, играющих роль в развитии иммунных реакций (¹⁻³). В настоящее время лимфокины представлены в двух категориях: первая—продукты активированных (митогенами или антигенами) лимфоцитов в бесклеточной среде культивирования; вторая—продукты жизнедеятельности интактных лимфоцитов (ПЖЛ) (⁴). Широкий спектр биологически активных веществ (БАВ), вырабатываемых в условиях стимуляции, рассматривается в качестве факторов, модулирующих реакции опосредованного клеточного иммунитета (⁵⁻⁶), ингибирующих синтез вазоактивных веществ в лейкоцитах, провоцирующих инициативную фазу воспалительного процесса (⁹) и др. В этой связи нам представляется более целесообразным и обоснованным изучение продуктов жизнедеятельности «интактных» лимфоцитов, поскольку подобная направленность исследований открывает широкие перспективы изучения биологической роли вырабатываемых лимфоцитами «гормоноподобных» веществ в деятельности не только иммунной, но и других интегративных систем организма (сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной и др.).

В настоящей работе ставилась задача провести биохимические исследования с целью нахождения активных фракций белков из ПЖЛ для дальнейшего изучения их физико-химических и биологических характеристик.

Опыты ставили на 180 белых беспородных крысах-самцах массой 120—160 г. ПЖЛ получали следующим образом: животных забивали, извлекали тимус, который гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Портера в среде 199. Затем центрифугированием в градиенте плотности фикола ($d=1,079$ г/см³) в течение 30 мин при 3000 об./мин выделяли пул клеток с плотностью меньше 1,079 г/см³, после чего производили морфологический контроль и подсчет числа лимфоцитов в камере Горяева. Полученные лимфоциты инкубировали при 37°C в

течение 6 ч в среде 199, после чего центрифугировали 15—20 мин при 1500 об./мин и отделяли надосадочную жидкость, содержащую ПЖЛ. После инкубации также проводили морфологический контроль целостности лимфоцитов (процентное содержание дистрофически измененных и распавшихся лимфоцитов). Содержание белка в ПЖЛ определяли по методу Идзакки (¹⁰). Хроматографический анализ ПЖЛ проводили гель-фильтрацией на колонке размерами 1,8×18 см с сефадексом G-100. Колонку уравнивали 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4. Скорость элюции составляла 20 мл/ч. Оптическую плотность фракций белков в элюате определяли на спектрофотометре при 280 нМ. Фракции собирали в объеме по 3,0 мл. На рис. 1 изображена элюционная кривая разделения ПЖЛ с помощью сефадекса G-100. На оси абсцисс

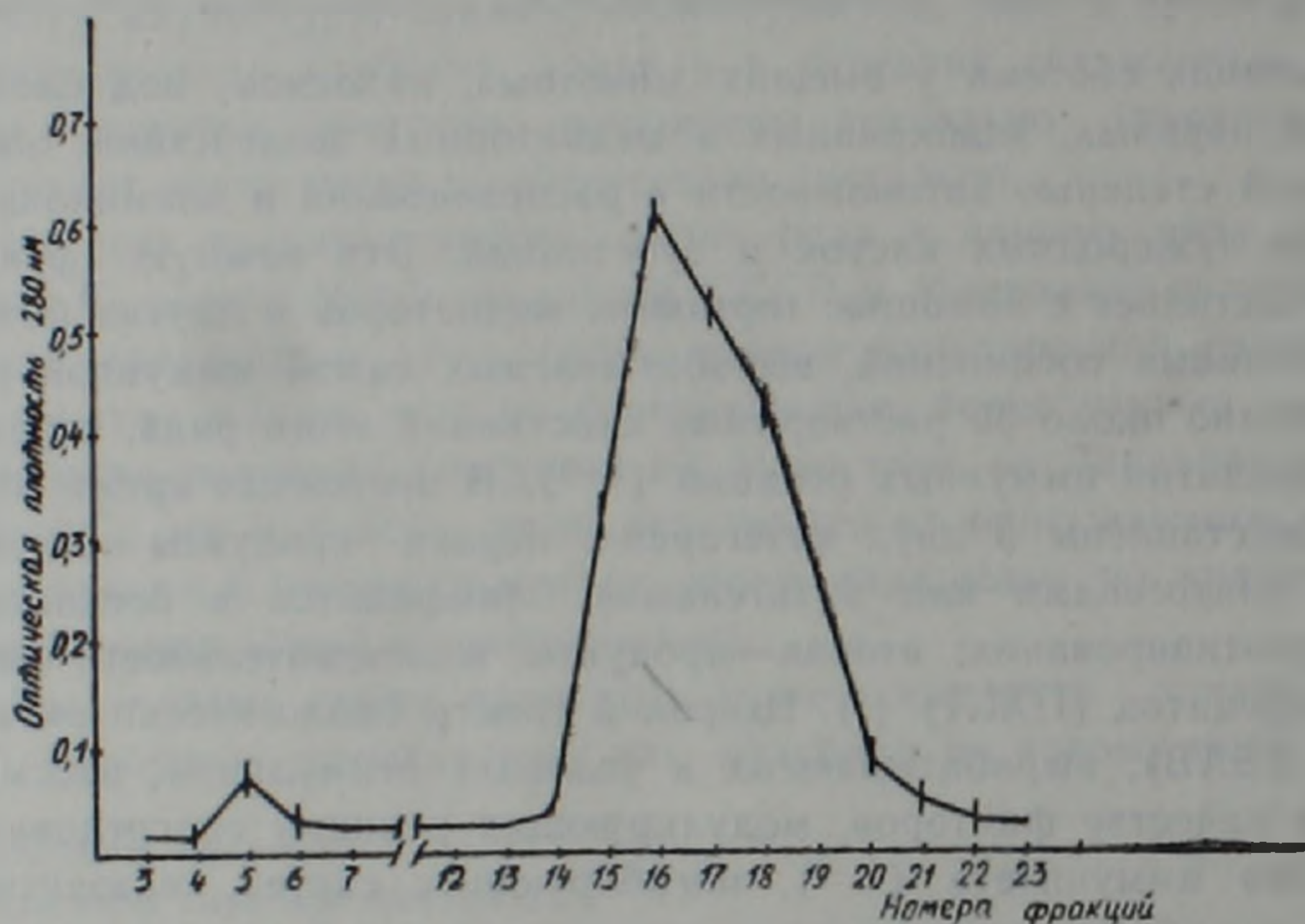


Рис. 1. Элюционная кривая ПЖЛ при разделении на сефадексе G—100

отмечены номера пробирок с фракциями белков, на оси ординат—их оптическая плотность. Как видно из рисунка, гель-фильтрационная кривая характеризуется двумя основными пиками. Первый небольшой пик состоит из оптической плотности белков, выходящих во фракциях 4—6. Второй большой пик, который занимает значительную площадь, состоит из оптической плотности белков, выходящих во фракциях 14—20.

Характерно, что гель-фильтрационные профили исследуемых белков общего пула ПЖЛ различных экспериментов, при одинаковых условиях их выполнения, являются сходными. В дальнейшем при разделении ПЖЛ и изучении молекулярных масс выделенных фракций был использован гель фирмы Toyo-Soda (Япония), обладающий лучшими, чем сефадекс G-100, характеристиками. Гель Toyopearl HW—55F имеет наиболее широкий спектр деления и делит белки с молекулярной массой от 1000 до 700 000 дальтон. Однако наибольшая эффективность разделения наблюдается в диапазоне от 10 000 до 200 000 (¹¹). Калибровочная кривая, полученная нами, в основном совпадает с приведенной в паспорте геля. Анализ белков лимфокинов проводили на колон-

ке размерами 1,6×95 см. Элюцию проводили буфером в составе: 25 мМ трис-HCl pH 7,54; 250 мМ NaCl. Скорость элюции составляла 80 мл/ч. Оптическую плотность собранных фракций определяли на проточном УФ-спектрофотометре. Для определения свободного объема колонки использовали голубой декстран с молекулярной массой 2×10^6 дальтон. На рис. 2 показано распределение калибровочных белков. Здесь же приведены молекулярные массы изучаемых белковых фракций. На оси абсцисс отмечен объем элюции в миллилитрах, на оси ординат при калибровочных белках — молекулярные массы, а при

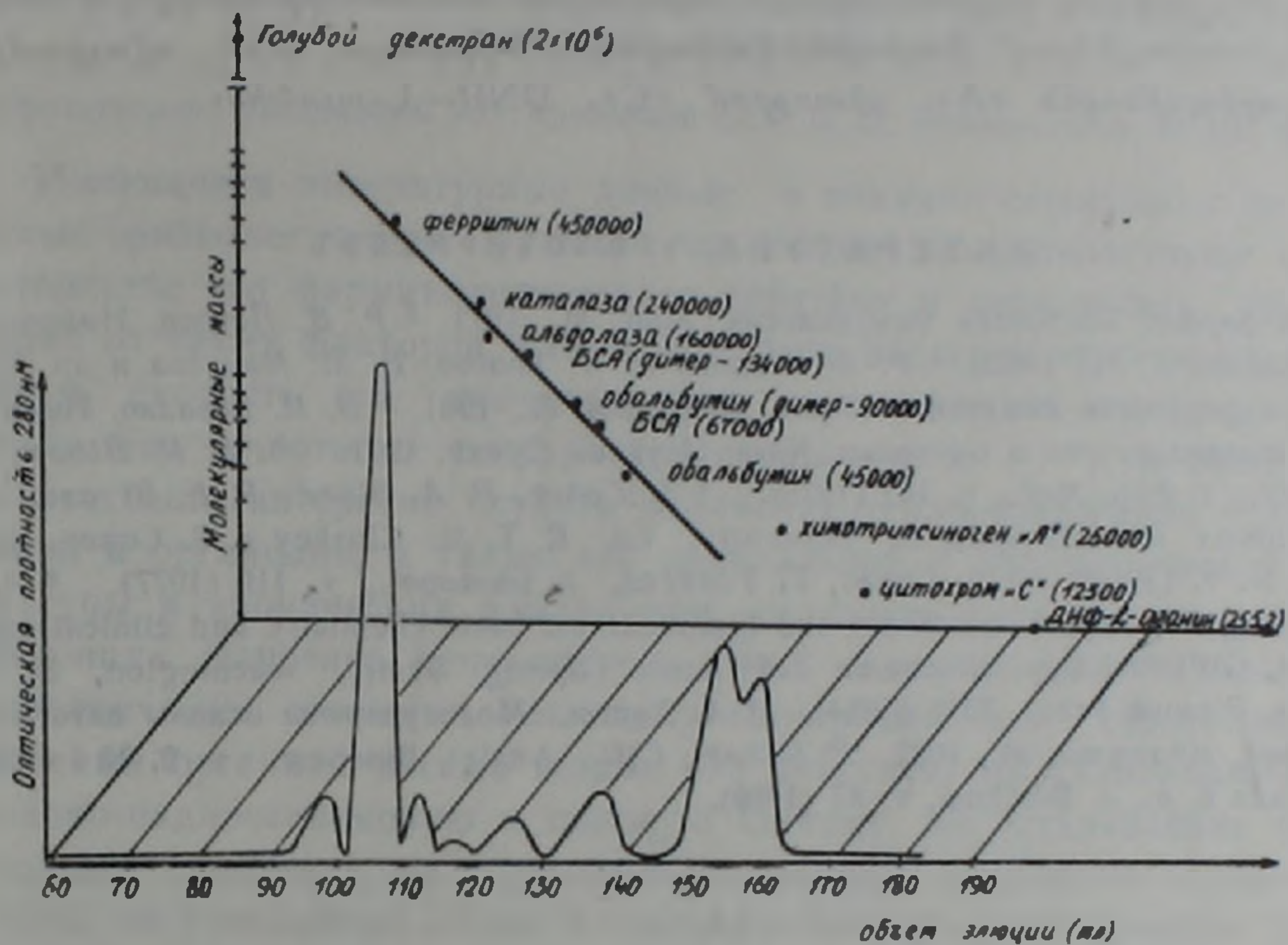


Рис. 2. Разделение ГЖЛ при помощи геля Toyo-pearl HW-55F Колонка размерами 1,6×95 см; элюат 25 мМ трис-HCl буфер (pH 7,45); 250 мМ NaCl; фракции собирали по 1 мл; скорость элюции 80 мл/ч; $t = 25^\circ\text{C}$; объем образца 1,5 мл; детектор UV (280 нм)

изучении белковых фракций — оптическая плотность. Калибровочные белки в количестве 10 мг в 0,5 мл буфера проводили через колонку. В качестве калибровочных белков использовали: ферритин, каталазу, альдолазу, БСА, овальбумин, химотрипсиноген «А», цитохром «С», DNP-L-аланин. На спектрограмме видно распределение основных пиков по молекулярным массам. Первый пик выходит в пределах 150 000 дальтон, второй — 72 000, третий — 56 000, четвертый — 29 000, пятый — 23 000. На спектрограмме во фракциях 155 и 160 мл, по всей вероятности, элюируются низкомолекулярные пептиды с молекулярной массой менее 2000 дальтон. Из сравнения двух кривых, полученных гелефильтрацией на сефадексе G-100 и Toyo-pearl HW-55F, видно, что гели фирмы Toyo-Soda дают возможность получить более качественное разделение белковых смесей.

Ուրցագեղձի լիմֆոցիտների կենսագործունեության սպիտակուցային
արգասիքների գել-ֆիլտրացիոն բնութագիրը

Գել-ֆիլտրացիայով (Toyopearl HW 55F) ի հայտ է բերված լիմֆոցիտների կենսագործունեության արգասիքների հինգ սպիտակուցային ֆրակցիաներ, որոնք բնութագրվում են 150 000, 72 000, 56 000, 29 000 և 23 000 դալտոն: 155 և 160 մլ ֆրակցիաներում ի հայտ է բերված ցածր մոլեկուլյար պեպտիդներ, որոնց մոլեկուլյար մասսան կազմում է 2 000 դալտոն:

Հետազոտվող սպիտակուցների մոլեկուլյար մասսաները որոշվել է հայտնի սպիտակուցներով՝ ֆերիտին, կատալազա, ալդոլազա, BSA, օվալբումին, խիմոտրիպսինոգեն «A», ցիտոքրոմ «C», DNP—L-ալանին:

ЛИТЕРАТУРА—ԻՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Ф. Бернет, Клеточная иммунология, Мир, М., 1971. ² Р. В. Петров, Иммунология, Медицина, М., 19866. ³ Р. В. Петров., Р. Н. Хаитов, В. М. Мальков и др. Контроль и регуляция иммунного ответа, Медицина, Л., 1981. ⁴ В. Н. Говалло, Иммуни-тет к трансплантатам и опухолям, Киев, Наукова Думка, 1977. ⁵ B R Bloom, E. Shevach, J. Exp. Med., v. 142 (1975). ⁶ S. Cohen, P. A. Ward, P. E. Blizazli, 197: Mechanisms of cell-mediated immunity, Ed. R. T. Mc Cluskey a. S. Cohen, John Willy, N. Y. (1974). ⁷ S. Cohen, T. Yoshida, J. Immunol., v. 119 (1977). ⁸ A. L. Goldstein, Ed. Thymic hormones and lymphokines: basic chemistry and clinical applications, GWUMC Dep. Biochem. 3rd Annu. Spring Symp., Washington, N. Y. London, Plenum Press, XIV (1984). ⁹ А. Хорст, Молекулярные основы патогенеза болезней, Медицина, М., 1982. ¹⁰ Itzhaki, Clll. Analyt. Biochem. v. 9, № 4 (1964). ¹¹ Fujuta e. e., J. Biochem, v. 87 (1980).