

ВЫДЕЛЕНИЕ И ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА ТИМОЗИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА, ПРОДУЦИРУЕМОГО СТРОМАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ ТИМУСА

Описано получение и частичная очистка фактора, вырабатываемого стромальными фибробластами тимуса. Показано, что он способен активно влиять на ранние этапы созревания Т-лимфоцитов, в частности, увеличивать экспрессию Thy-1 антигена на мембранах тимоцитов. Проведено сравнение активности факторов, секретируемых стромальными элементами костного мозга и тимуса.

Принято считать, что ответственными за продукцию гормонов тимуса, контролирующих дифференцировку Т-лимфоцитов, являются его эпителиальные клетки. Роль отдельных типов клеток в продукции тимических гормонов можно исключить, располагая их чистыми культурами. Однако чистые культуры эпителия тимуса получены не были. В растущих тимических культурах, полученных в результате эксплантации фрагментов тимуса или клеточных взвесей, выделенных из него путем трипсинизации, обнаруживается, как минимум, два типа клеток — эпителиальные клетки и фибробласты [5]. Поэтому несмотря на то, что активность тимозина в среде от подобного рода культур определяется [7], нельзя указать, какой тип клеток ответственен за его синтез. Ранее нами была описана культура фибробластов тимуса, представляющая собой чистый диплоидный штамм этих клеток [4]. Такие культуры могут быть получены в первичных культурах тимических клеток из предшественников в том случае, если для эксплантации использовались клетки, выделенные из тимуса без применения трипсина [3].

Выяснилось, что один из наиболее изученных тимических гормональных препаратов — тимозин (фракция 5) представляет собой гетерогенное семейство полипептидов, отличающихся между собой по физико-химическим и биологическим свойствам [9, 10]. Вполне возможно, что не все биологически активные факторы, продуцируемые тимусом, синтезируются исключительно клетками эпителиальной природы.

По предварительным данным, культуральная среда от чистых штаммов фибробластов тимуса способна экспрессировать Thy-1 антиген у клеток костного мозга мышей СВА. Это обстоятельство не позволяет исключить фибробласты тимуса из числа возможных продуцентов факторов, обладающих активностью тимозина. Для решения этого вопроса необходимо выделение активных факторов из культуральной среды, если они присутствуют в ней, и их физико-химическая характеристика.

Материал и методы

Для экспериментов использованы морские свинки массой 180—400 г, мыши линий СВА и АКР—18—20 г. Культуры стромальных фибробластов тимуса и костного мозга получали по описанной методике [3—4]. Клетки для эксплантации выделяли из органов без применения

трипсина. Получали также клональные культуры тимических фибробластов путем многократного пассирования единичных колоний. Культуральную среду от штаммов 3—12 пассажей либо от клональных культур отбирали на 4—10-й день после пассажа и лиофилизировали. Лиофильно высушенную среду хранили при -20°C . Для дальнейших исследований ее растворяли в минимальном объеме воды таким образом, что материал концентрировался в 20—30 раз. Надосадочную жидкость диализировали при $+4^{\circ}\text{C}$ против 200 объемов дистиллированной воды в течение одних суток и затем против среды 199 также в течение 24 час. Биологическую активность определяли немедленно или после хранения при -20°C .

На колонку фирмы Pharmacia (Швеция) $2,5 \times 50$ см с сефадексом G—25 (объем геля 200 мл), уравновешенным водой, наносили 5 мл отфильтрованной среды и элюировали водой. Экстинкцию измеряли при длине волны 280 нм. Элюированный материал лиофилизировали. Первую по порядку элюции фракцию растворяли в 0,01 М ацетатном буфере, pH 4 и наносили на колонку фирмы Pharmacia $1,5 \times 30$ с КМ-сефадексом G—50 в натриевой формуле, уравновешенным тем же буфером. Элюцию проводили в непрерывном градиенте ионной силы (0,01 М, pH 4,0—0,05 М, pH 8,0 ацетатный буфер). Фракцию, элюированную с КМ-сефадекса G-50 при pH 4,8—5,0 и ионной силе около 10^{-2} , хроматографировали на колонке (К 0,9 $\times$ 30) с сефадексом G-50 (объем 14 мл), уравновешенным 0,25 мл 6 М мочевины. Объем фракций 1 мл.

Для тестирования активности препаратов и идентификации клеток использовали антитела мышей АКР против Thy-1 антигена мышей С₃H. В разведении 1/100 антитела были токсичны для 95—97% тимоцитов СВА и 5—10% клеток костного мозга мышей СВА в присутствии комплемента. Для идентификации фибробластов использовали антифибробластную сыворотку и антифибронектиновые антитела [2]. Тестирование проводили по Comigo и Boyse (по [6]) с использованием фракционированных и нефракционированных в градиенте плотности бычьего сывороточного альбумина клеток костного мозга мышей СВА. Гомогенность препаратов исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном теле в присутствии додецилсульфата натрия (плотность геля 15%). Окрашивание проводили Кумасси голубым, отмывание избытка красителя—7% уксусной кислотой [12]. В ряде опытов тестировали активность тимических сред по их способности снижать число аутологичных Е-розеток у крыс, для чего 0,4 мл препарата добавляли к 3,6 мл суспензии тимоцитов (концентрация 10^7 кл/мл), инкубировали 1,5 часа при 37°C и смешивали в отношении 1 : 4 с аутологичными эритроцитами. Подсчет розеток проводили через 18 ч. при 4°C и выражали в % от общего количества клеток (timoцитов).

Результаты и обсуждение

По данным реакции иммунофлуоресценции с антифибронектиновыми антителами и антифибробластной сывороткой, культуры, полученные от первичных колоний фибробластов тимуса и костного мозга, начиная

со второго пассажа не содержат клеток другого типа. То же относится к клональным штаммам тимических фибробластов.

Культуральные среды от тимических фибробластов, профильтрованные через фильтр РМ-10 (пропускающий белки с м. в. менее 10000), обладают максимальной активностью по экспрессии Thy-1 антигена у клеток костного мозга мышей СВА на 6—10-й день культивирования. Культуральные среды от штаммов костномозговых фибробластов не обладали такой активностью на всем протяжении культивирования (табл. 1). Активность по экспрессии Thy-1 антигена в трех исследованных клональных штаммах фибробластов тимуса представлена в табл. 2. Как видно из табл. 3, культуральные среды от тимических фибробластов снижали количество аутологичных розеток у крыс примерно наполовину.

Таблица 1

Наведение θ -антигена на фракцию А (10—17%) костного мозга мыши, разделенного в ступенчатом градиенте BSA, G-25 1 фракциями культуральных сред от клональных штаммов фибробластов тимуса морской свинки

№ клона	1	2	3
% наведения			
Костный мозг до фракционирования	6	3	11
Фракция А	0	2	29

Отфильтрованные культуральные среды от тимических штаммов при гель-хроматографии разделяются на три фракции (рис. 1). Актив-

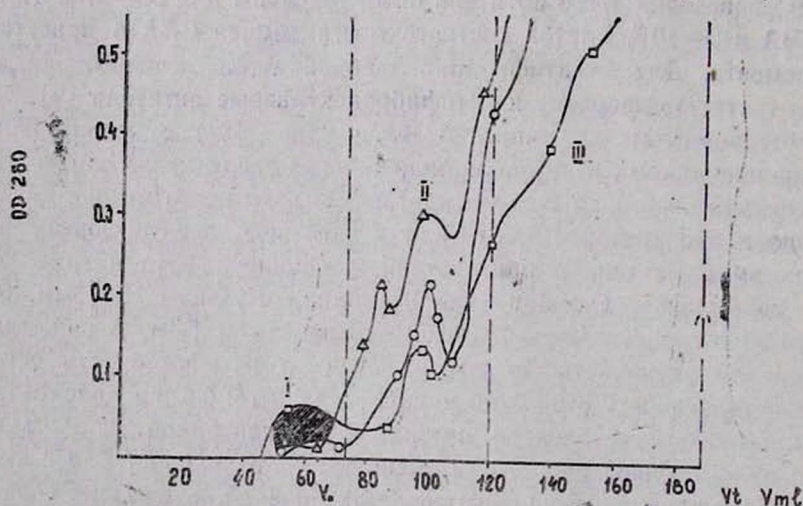


Рис. 1. Профиль элюции при 280 нм профильтрованных через фильтр РМ-10 (Амнокон) культуральных сред от штаммов фибробластов тимуса ($\square$), костного мозга (Δ), эмбриональной телячьей сыворотки ($\circ$). Гель-хроматография на сефадексе G-25. Фракции I, II и III собирали, как указано на рисунке. Активная фракция заштрихована.

ностью по экспрессии Thy-1 антигена обладает только первая фракция, выходящая в свободном объеме. Она была представлена не всег-

да в культуральных средах от штаммов фибробластов костного мозга. Лиофилизированная первая фракция испытывалась в концентрациях от 100 до 0,01 мкг/мл (табл. 4). Активной при всех концентрациях оказалась только тимическая фракция.

Таблица 2

Экспрессия Thy-антигена во фракциях клеток костного мозга мышей СВА под влиянием секретов стромальных фибробластов тимуса

Секрет		% клеток, экспрессирующих Thy-антиген					
		нефракционированные клетки костного мозга	фракция А (10—17% БСА)	фракция В (17—23% БСА)	фракция С (23—26% БСА)	фракция Д (26—29% БСА)	фракция Е (29—33% БСА)
Секрет фибробластов тимуса	Нефракционированная среда	10±2,2	12±3,5	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.
	1-я фракция с сефадекса С-25	10±3,3	16±4,2	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.
	1-я фракция с сефадекса КМ С-5)	13±3,1	42±9	8±1,8	не экспр.	не экспр.	не экспр.
Сек. фиб. кост. мозга	нефракцион. среда	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.
	1-я фракция с сефадекса С-25	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.	не экспр.

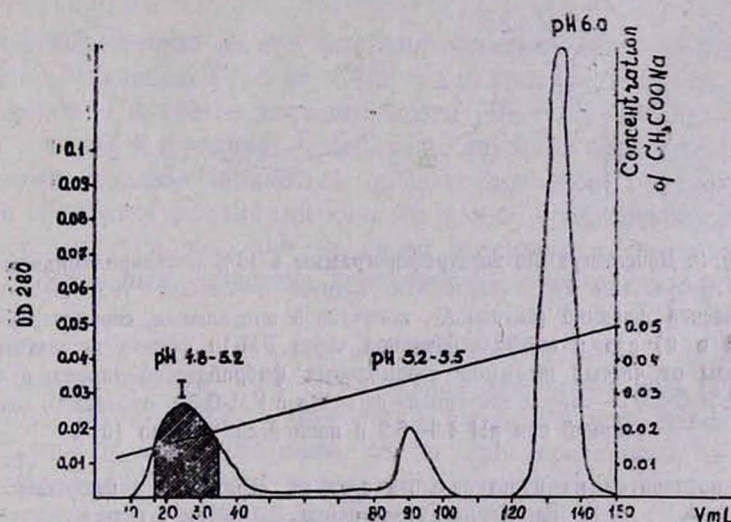


Рис. 2. Профиль элюции при 280 нм активной (1-й гель-хроматографической) фракции на сефадексе КМ-G-50. Элюция проводилась в линейном градиенте концентрации CH_3COONa (0.01—0.05 М). pH исходного раствора 4.0, pH конечного раствора 8.0. Активная фракция заштрихована.

Фракция, выходящая в свободном объеме при гель-хроматографии тимических сред, разделяется при градиентном элюировании с КМ-сефадекса еще на три фракции (рис. 2). Наибольшей активностью по экспрессии Thy-1 антигена обладала 1 фракция, элюированная при pH 4,8—5,0 и ионной силе около 10^{-2} (табл. 4). Активная фракция, элюированная с КМ-сефадекса при хроматографии на сефадексе G-50,

выходит практически в полном объеме колонки = 0.93. Фракция, выходящая в свободном объеме при гель-хроматографии, и фракция, элюированная с КМ сефадекса при pH 4,8—5,0, отличаются по гетерогенности. В 15% ПАГ фракция, выходящая в свободном объеме на сефадексе G—25, разделяется при электрофорезе на 5 полос. Фракция, элюируемая с КМ-сефадекса, движется одной полосой, совпадающей по подвижности с одной из полос, наблюдаемых на электрофореграмме 1-й гель-хроматографической фракции (рис. 3). Чистая фракция испытывалась в концентрациях от 0,1—100 мг/мл.

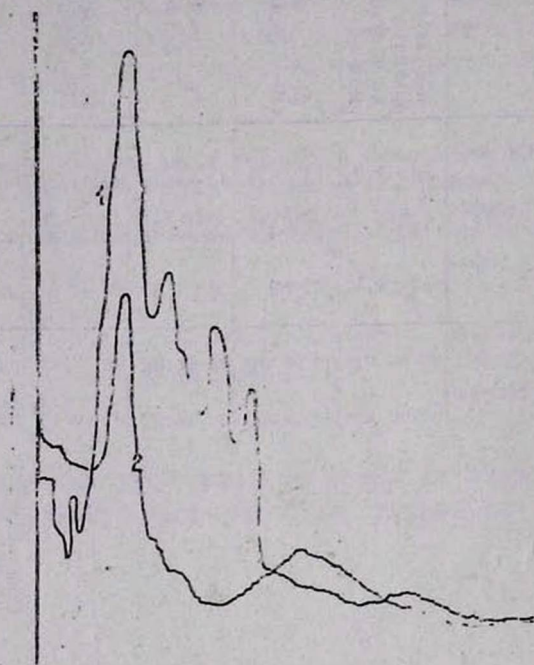


Рис. 3. Денситограмма электрофореграммы в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. 1—первой гель-хроматографической фракции (активной), полученной при элюции, сконцентрированной в 25 раз и профильтрованной через РМ-10 фильтр культуральной среды от чистых штаммов стромальных фибробластов тимуса с сефадекса G-25, 2—первой (активной) фракции с КМ-G-50 сефадекса, элюированной при pH 4.8—5.2 и ионной силе около 10^{-2} .

Таблица 3
Влияние препаратов из культуральных сред от стромальных фибробластов на образование аутологичных Е-розеток у крыс

Источник препарата	% розеткообразующих клеток от общего колич. клеток
Среда от культур фибробластов костного мозга	3.77
199 среда с бычьей сывороткой	3.32
Среда от культур фибробл. тимуса	1.78

Гормональные факторы тимуса, несомненно, вырабатываются его стромальными клетками [5, 8, 11, 13, 14]. Однако ответственность лишь эпителиальных клеток за продукцию гормонов дискуссионна, т. к. чи-

стые культуры этих клеток ни в одной из работ не использовались [5, 8, 11, 13, 14]. Фибробласты тимуса получены в виде чистых пассируемых штаммов [3, 4], и первые исследования культуральных сред от них показали, что они не могут быть исключены из числа возможных продуцентов гормонов тимуса, т. к. профильтрованные среды от фибробластов тимуса (но не костного мозга) способны наводить Thy-1 антиген у костномозговых клеток, т. е. обладают одной из активностей тимозина. Кроме того, как показано в настоящей работе, они снижают количество аутологичных Е-розеток у крыс. По-видимому, не все фибробласты тимуса производят активный фактор, о чем говорят данные исследования клональных штаммов (табл. 2). Тем не менее, как полные

Таблица 4

Процент экспрессии Thy-1 антигена на клетках костного мозга фракциям и культуральных сред, вышедших с сефадекса G-25 и с КМ-сефадекса G-50

Фракции	Экспрессия Thy-1 антигена в % от общего количества клеток	
	с сефадекса G-25	с КМ-сефадекса G-50
1	17% $\pm$ 4,5	3% $\pm$ 10
2	0	0
3	0	0

среды, так и выделенные из них фракции обладают высокой степенью активности по наведению Thy-1 антигена на клетки костного мозга, особенно на фракцию А клеток костного мозга (10—17% БСА). Объясняется это тем, что в фракцию А попадают крупные бластные формы, среди которых большое количество предшественников Т-клеток, способных при обработке фракциями культуральных сред превращаться в зрелые клетки тимуса, несущие на своей поверхности специфические маркеры. В остальных фракциях присутствуют достаточно зрелые Т-клетки (табл. 1).

По данным гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G-50 молекулярный вес ответственного за индукцию фактора около 5000 [1], изоэлектрическая точка—около 5. По своим биохимическим характеристикам он близок β_3 и β_4 тимозинам, но, по всей вероятности, не идентичен им, так как последние не участвуют в превращении предшественников Т-клеток в зрелые Т-клетки. Для более детальной характеристики требуются дальнейшие эксперименты, можно лишь утверждать, что выделенный фактор продуцируется стромальными, а не эпителиальными клетками тимуса, и выделяемый из диплоидных культур таких клеток, обладает рядом «тимозиновых» активностей, большей частью связанных с ранней дифференцировкой Т-клеток.

ЦИНЛ Ереванского
медицинского института

Поступила 26/X 1987 г.

**ԹԻՄՈՒՍԻ ՍՏՐՈՄԱԼ ՖԻԲՐՈԲԼԱՍՏՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ ԱՐՅԱԴԻՎՈՂ ԹԻՄՈՋԵՆԻՆ
ՆՄԱՆՎՈՂ ՖԱԿՏՈՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՄԱՍՆԱԿԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ**

Վերջին տարիների հետազոտությունները հայտնաբերել են, որ թիմուսի հայտնի հորմոնները արտադրվում են էպիթելային բջիջների կողմից և հիմնականում մասնակցում են բջիջների զարգացման վերին էտապներին:

Մեր կողմից հայտնաբերվել է, որ մաքուր դիպլոիդ ֆիբրոբլաստների շտամները կարող են արտադրել ֆակտոր (կամ ֆակտորներ), որը ակտիվ ազդեցություն է ունենում լիֆոցիտների վաղ հասունացման շրջանում: Ֆակտորը անշատում են աճող ֆիբրոբլաստների միջավայրից G.25 և G—50CM սեֆադեկսի միջոցով:

Մոլեկուլյար կշիռը կազմում է մոտավորապես 5000, pK—4,9—5,0:

Ստացված նյութը չի կորցնում իր ակտիվությունը 0,15կգ/մլ կոնցենտրացիայում:

A. A. IVANOV-SMOLENSKI, I. A. BEZVERSHENKO, N. S. FILYAKINA,
M. G. BOIKO, Kh. S. SAYADIAN

PARTIAL PURIFICATION OF THE OBTAINED THYMOSIN-LIKE FACTORS, PRODUCED BY THYMIC STROMAL FIBROBLASTS

It is shown, that thymic stromal fibroblasts produce factor, which activates the influence of Thy-1 antigen on the T-cells membrane. This factor has been obtained from guinea pigs thymus. For purification of this factor we have used Sephadex G. 25 and CH-G-50 Sephadex.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кондратьева Т. К. Автореферат канд. дис. М., 1981.
2. Фриденштейн А. Я., Иванов-Смоленский А. А., Кулагина Н. Н., Лурия Е. А. Иммунология, 1980, 4, с. 68.
3. Goldstein A. L., Low T. L. K., Medoo M. et al. PNAS USA, 1977, 74, 2, 725.
4. Goldstein A. L., Thurnnue G. B., Low T. L. K. et al. J. Reticuloendothel., 1978, 23, 4, 253.
5. Krnitsbeek A. M. Ann. New York Acad. Sci., 1979, 332, 109.
6. Ohta Y., Kasuo S., Yoneyama Y., Tesuka E., Yagi Y. Cancer. Immunol. Immunopathol., 1983, 15, 2, 108.
7. Reisner G., Linker-Israeli M., Sharon N. Cell. Immunol., 1976, 25, 129.

УДК 616.381—002:599.323.4

**Л. А. МИНАСЯН, В. В. АДИБЕКЯН, А. В. ЗИЛЬФЯН
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПЕРИТОНИТ У КРЫС,
ИНДУЦИРОВАННЫЙ E. COLI И ПОЛНЫМ
АДЬЮВАНТОМ ФРЕЙНДА**

Однократное внутрибрюшинное введение E. coli с полным адьювантом Фрейнда индуцирует у крыс гнойный воспалительный процесс, который характеризуется хроническим течением с четкой сменой его конкретных фаз. Предложена новая, максимально приближенная к условиям клиники модель перитонита, позволяющая осуществлять исследования, направленные на изучение аспектов патогенеза, патогенетической и симптоматической терапии указанного заболевания.

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении патогенеза и диагностики, а также лечении острого перитонита, это заболе-