

ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЙ ТИМОЗИН- β_1 АКТИВИРУЕТ Т-КЛЕТКИ

В.С.Априкян, С.Г.Чаилян, А.А.Галоян

*/Институт биохимии им.Г.Х.Бунятыана НАН РА/
375014 Ереван, ул.П.Севака 5/1*

Ключевые слова: гипоталамический пептид тимозин β_1 , Т клетки, пролиферация, секреция интерлейкина-2, жизнеспособность

Одним из основных направлений современной нейроиммунологии является изучение механизмов взаимодействия центральной нервной и иммунной систем. Известно, что функции межсистемных взаимодействий осуществляются посредством составных частей их систем, так называемых медиаторов, которые в большинстве своем являются пептидами [19]. Особый интерес представляют нейрогенные структуры гипоталамуса, как регуляторы активности иммунной системы. В последние годы выделен и охарактеризован ряд гипоталамических пептидов, обладающих выраженной разнонаправленной биологической активностью [15]. Изучаются их иммуномодулирующие свойства [1-6, 10].

Целью настоящего исследования явилось изучение способности одного из охарактеризованных гипоталамических пептидов: тимозина β_1 (Т β_1) изменять активность мышинных Т клеток.

Материал и методы

Т β_1 получали из гипоталамуса крупного рогатого скота методом ВЭЖХ. Пик нейропептида рехроматографировали и идентифицировали как Т β_1 [7, 9, 14]. Для получения Т-клеток, использовали спленоциты 8-недельных самок беспатогенных инбредных мышей BALB/c из питомника "Столбовая" РАМН. Т-клетки выделяли методом пассажа спленоцитов через двухслойные нейлоново-шерстяные колонки (Fenwal, США) [16]. Клетки 2×10^4 /мл культивировали в присутствии 2,0 мкг/мл конканавалина А в питательной среде (ПС) RPMI 1640 (ICN, США), содержащей 5,0% фетальной телячьей сыворотки (ICN, США), 2,0 мМ L-глутамина (Gibco, США), 2,0 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 7,0% CO₂. В последние 6 ч культивирования в пробы вносили ³H-тимидин по 0,5 мКи/мл. Пробы харвестировали на стекловолокнистые фильтры на харвестере Scatron A-5 (Flow, США) и оценивали пролиферацию клеток по включению радиоактивной метки в ДНК лимфоцитов на сцинтилляционном счетчике (TASC, Англия). Результаты выражали в *имп/мин* $\times 10^{-3}$.

Использовали также кональбумин (КоА) специфический клон Т-клеток хелперов D10 [17]. Клетки D10 2×10^4 /200 мкл культивировали с 2,5 мкг КоА в полной ПС 24 ч при 37°C в атмосфере 7,0% CO₂. Пробы метили радиоактивной меткой и результаты оценивали как описано выше.



Для оценки синтеза интерлейкина-2 (ИЛ-2) Т-клетками использовали ИЛ-2 зависимую линию цитотоксических Т-лимфоцитов STLL-2 [12]. Клетки $2 \times 10^4/100$ мкл культивировали с 2,5 мкг КоА в ПС 24 и 48 ч при 37°C в атмосфере 7,0% CO₂. Затем по 100 мкл супернатантов (с/н) добавляли к $2 \times 10^4/100$ мкл STLL-2. В качестве контроля в пробы добавляли стандартный ИЛ-2 (ICN, США) 100 ЕД/мл в аналогичном объеме. Пробы культивировали 24 ч при 37°C в атмосфере 7,0% CO₂, метили радиоактивной меткой, как описано выше. Для оценки синтеза ИЛ-4 использовали анти-ИЛ-4 моноклональные антитела (МонАТ) клон 11В11 (ККК, С.Петербург) 400 ЕД/мл [18]. Результаты выражали в ЕД/мл.

Жизнеспособность Т-клеток оценивали с помощью трипанового синего. Тβ₁ вносили в пробы одновременно с КоА в различных концентрациях. В контрольные пробы взамен препарата вносили воду для инъекций в аналогичных объемах. Все тесты проводили в 96-луночных микропланшетах (Falcon, США) в 0,2 мл ПС. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В процессе исследования была изучена способность Тβ₁ модулировать пролиферацию Т-клеток, индукцию синтеза ИЛ-2 и их жизнеспособность.

Исследование способности Тβ₁ модулировать пролиферацию Т-клеток было проведено как с использованием Т-клеток, полученных из спленоцитов мышей BALB/c, так и с использованием Т-клеток хелперов клона Д10. Было установлено, что в обоих случаях Тβ₁ достоверно повышал митоген-индуцированную пролиферацию Т лимфоцитов. Результаты данной серии экспериментов представлены на рис. 1 и 2. Так, Тβ₁ в дозах 10⁻⁵ и 10⁻⁶ г/мл повышал пролиферативный ответ Т-клеток в 1,7 и 2,6 (p<0,001) раза соответственно (рис.1). Аналогичным образом, Тβ₁ повышал и пролиферативный ответ Т-клеток Д10. Так, в дозах 10⁻⁵ и 10⁻⁶ г/мл он усиливал пролиферацию соответственно в 1,88 и 2,94 (p<0,001) раза (рис. 2).

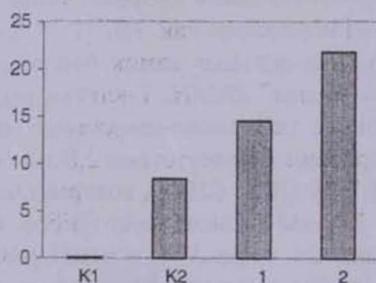


Рис. 1. Влияние Тβ₁ на пролиферацию Т-клеток. По оси ординат – количество имп/мин × 10³. По оси абсцисс – К₁ – контроль, без митогена; К₂ – контроль, КоА. Дозы Тβ₁: 1 – 10⁻⁵, 2 – 10⁻⁶ (г/мл).

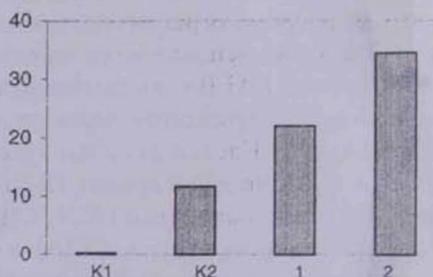


Рис. 2. Влияние Тβ₁ на пролиферацию клеток Д10. По оси ординат – количество имп/мин × 10³. По оси абсцисс – К₁ – контроль, без митогена; К₂ – контроль, КоА. Дозы Тβ₁: 1 – 10⁻⁵, 2 – 10⁻⁶ (г/мл).

Известно, что, помимо пролиферативной функции Т-лимфоцитов, одним из основных показателей их активации является способность Т-лимфоцитов секретировать специфический цитокин ИЛ-2, который является важным медиатором межкле-

точных взаимодействий во многих физиологических и патологических процессах [13]. В нашем исследовании с/н культур Т-клеток хелперов Д10 сенсibilизированных митогеном и обработанных $T\beta_1$ культивировали 24 и 48 ч с культурами ИЛ-2 чувствительных клеток СТЛЛ-2. В качестве контроля для стандартизации данной тест-системы использовали коммерческий ИЛ-2 с активностью 100 ЕД/мл. Результаты данной серии экспериментов представлены на рис. 3. Как следует из рисунка, $T\beta_1$ в значительной мере повышал митоген-индуцированный синтез ИЛ-2, который достигал максимума через 48 ч совместного культивирования нейропептида с клетками Д10. Так, $T\beta_1$ в дозах 10^{-5} и 10^{-6} г/мл повышал выработку ИЛ-2 через 24 ч культивирования соответственно в 2,2 и в 3,1 раза ($p < 0,001$) (рис. 3А). В пробах, культивированных 48 ч, $T\beta_1$ в тех же дозах повышал выработку ИЛ-2 соответственно в 2,43 и 3,52 раза ($p < 0,001$) (рис. 3В). Известно, что активированные Т-клетки секретируют и другой цитокин ИЛ-4, который также способен индуцировать пролиферацию СТЛЛ-2 [12]. Для выяснения принадлежности обнаруженного нами эффекта к одному из указанных цитокинов в с/н перед началом совместного их культивирования с клетками СТЛЛ-2 были внесены анти ИЛ-4 МоноАТ клона 11В11 в концентрации 400 ЕД/мл. Они, как известно, полностью блокируют пролиферацию индикаторных клеток, индуцируемую ИЛ-4. В нашем же исследовании такого эффекта не отмечалось. Таким образом, было подтверждено, что обнаруженный феномен является следствием секреции именно ИЛ-2.

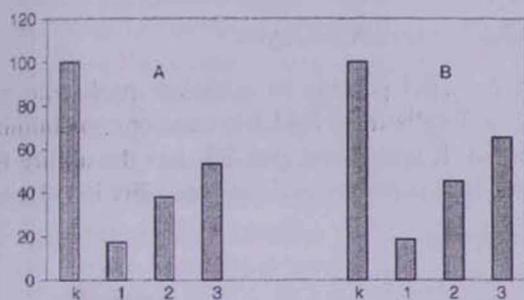


Рис. 3. Влияние $T\beta_1$ на секрецию ИЛ-2. По оси ординат – ИЛ-2 ЕД/мл. По оси абсцисс – 1 – контроль, стандартный ИЛ-2 100 ЕД/мл; 2 – контроль, КоА. Дозы $T\beta_1$: 3 – 10^{-5} , 4 – 10^{-6} (г/мл). А – 24 ч, В – 48 ч.

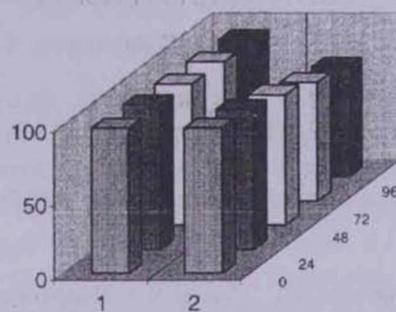


Рис. 4. Влияние $T\beta_1$ на жизнеспособность Т-клеток. По оси ординат – жизнеспособность (%). По оси абсцисс – время культивирования (ч).

Известно, что любой модулятор, особенно пептидной природы, оказывает влияние на микроокружение клетки, что отражается на ее функционировании [5]. Представлялось интересным выяснить действие $T\beta_1$ на жизнеспособность Т-клеток в период их активации. $T\beta_1$ вносили в культуры Т-лимфоцитов на начальной стадии их культивирования. Результаты оценивали на 0, 24, 48, 72 и 96 ч после начала инкубации и выражали в процентах. Результаты данной серии исследования представлены на рис. 4. Как следует из рисунка, $T\beta_1$ в значительной степени поддерживал жизнеспособность Т-клеток. Так, она была выше на 3,6–24,4% по сравнению с жизнеспособностью клеток в контрольных пробах. Эффект проявлялся наиболее на-

глядно после 48 ч, когда отмечался резкий спад жизнеспособности культивируемых Т-лимфоцитов. Данный факт свидетельствует о способности $\text{T}\beta_1$ поддерживать и повышать жизнеспособность Т-клеток.

Известно, что Т лимфоцит является главной клеткой иммунной системы и представляет собой ключевой элемент иммунного ответа [8, 11]. В этой связи актуальность нашего обнаружения очевидна. Выявленный феномен позволяет дополнить имеющиеся представления о роли гипоталамуса в осуществлении функций иммунной системы и открывает новые перспективы в расшифровке механизмов нейроиммунных взаимодействий.

Поступила 30.06.00

ՀԻՊՈԹԱԼԱՄՈՒՍԱՅԻՆ ԹԻՄՈՉԻՆ β_1 ՊԵՊՏԻԴԸ ԱԿՏԻՎԱՅՆՈՒՄ Է T ԲՅԻՋՆԵՐԸ

Վ.Ս. Ապրիկյան, Ս.Գ.Չալիլյան, Ա.Ա.Գալոյան

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսային թիմոզին β_1 ($\text{T}\beta_1$) պեպտիդի ազդեցությունը T բջիջների ակտիվության պրոլիֆերացիայի, ինտերլեյկին-2 (IL-2) արտադրման և կենսակայունության վրա: Օգտագործվել են ինչպես մկներից սրացված T, այնպես էլ T հելպեր փեսակի D10 բջիջներ:

Նայունաբերվել է, որ $\text{T}\beta_1$ ակտիվացնում է T բջիջները: Նա խթանում է T բջիջների պրոլիֆերացիան, IL-2 արտադրումը և նրանց կենսակայունությունը:

THYMOSIN β_1 PEPTIDE FROM HYPOTHALAMUS ACTIVATES T-CELLS

V.S.Aprikyan, S.G.Chailyan, A.A.Galoyan

The ability of hypothalamic thymosin β_1 ($\text{T}\beta_1$) peptide to modulate proliferation, interleukin -2 (IL-2) secretion and viability of T cells from BALB/c mice or conalbumin specific T helper cells clone D10 were studied. It was found that $\text{T}\beta_1$ has the ability to enhance mitogen-induced T cell proliferation, IL-2 secretion and their viability in culture.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ապրիկյան Վ.Ս., Գալոյան Կ.Ա.* Нейрохимия, 1992, 11, 2, с. 212.
2. *Ապրիկյան Վ.Ս., Գալոյան Կ.Ա.* Нейрохимия, 1992, 11, 3-4, с. 27.
3. *Ապրիկյան Վ.Ս., Գալոյան Կ.Ա., Գալոյան Ա.Ա.* Нейрохимия, 1992, 11, 3-4, с. 34.
4. *Ապրիկյան Վ.Ս., Գալոյան Կ.Ա.* Нейрохимия, 1995, 12, 2, с. 14.
5. *Ապրիկյան Վ.Ս.* Дис. докт. М., 1996.
6. *Ապրիկյան Վ.Ս., Գալոյան Կ.Ա., Գալոյան Ա.Ա.* Нейрохимия, 1998, 15, 2, с. 189.
7. *Գալոյան Ա.Ա., Չիֆլիկյան Մ.Ը., Չալիլյան Ս.Գ., Գրիգորյան Գ.Գ.* Нейрохимия, 1995, 12, 4, с. 23.
8. *Петров Р.В.* Успехи совр.биол., 1970, 69, 2, с. 261.
9. *Չալիլյան Ս.Գ.* Дис. канд. 1992.
10. *Aprikyuan V.S., Galoyan K.A., Galoyan A.A.* J.Neurochemistry, 1999, 77 Suppl. S68D.
11. *Carter L.L., Dutton R.W.* Curr.Opin.Immunol., 1996, 8, p. 336.
12. *Clements M.J.* (ed.) Cytokines. Bios.Sc.Publ., Oxford, England, 1991.
13. *Fallon P.G., Smith P., Duane D.W.* Eur.J.Immunol., 1998, 28, 4, p. 1408.
14. *Galoyan A.A., Abrahamian G.E., Chailian S.G. et al.* Neurochem.Res., 1994, 19, 4, p. 451.
15. *Galoyan A.A.* Biochemistry of novel cardioactive hormones and immunomodulators of the functional system neurosecretory hypothalamus-endocrine heart Moscow, 1997.
16. *Julius M.E., Simpson E.H., Herzenberg L.W.* Eur.J.Immunol., 1973, 3, p. 645.
17. *Kaye J., Porcelli S., Tite J. et al.* J.Exp.Med., 1983, 158, p. 836.
18. *Ohara J., Paul W.* Nature, 1985, 315, p. 323.
19. *Old L.J.* Nature, 1987, 326, p. 330.