

Н. С. ФИЛЯКИНА, А. А. ИВАНОВ-СМОЛЕНСКИЙ, Х. С. САЯДЯН

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ,
ПРОДУЦИРУЕМЫХ СТРОМАЛЬНЫМИ
ФИБРОБЛАСТАМИ ТИМУСА

Изучено влияние субстрата, полученного путем культивирования тимических стромальных фибробластов, на ряд иммунологических показателей. Показано, что полученный субстрат вызывает редукцию РНА несущих тимоцитов и у тимэктомированных мышей СВА восстанавливает реакцию отторжения трансплантата, увеличивая количество Т-клеток в селезенке.

Известно, что стромальные механоциты лимфоидных и кроветворных органов влияют на дифференцировку кроветворных клеток. В связи с этим было сделано предположение, что линии этих клеток, в частности фибробласты тимуса, могут синтезировать субстрат дифференцировки Т-клеток. Для решения этой задачи необходимо получение чистых культур фибробластов тимуса без примеси эпителиальных клеток. Эта проблема решалась путем первичной эксплантации в культуру фильтрованной суспензии клеток тимуса без предварительной обработки трипсином [2]. Выяснилось, что такие культуры стромальных фибробластов тимуса синтезируют фактор с «тимозиновой» активностью. Функциональную активность выделенного субстрата проверяли по способности индуцировать экспрессию специфических предшественников. В этом тесте проверялись как частично очищенные, так и фракции, полученные путем препаративной хроматографии на колонках с ионообменниками и гель-фильтрации на сефадексах. В дальнейших экспериментах было показано, что очищенный субстрат индуцирует экспрессию θ -антигена не только у костномозговых предшественников, но и у ранних тимических клеток, несущих на своей поверхности рецептор к агглютинину арахиса (PNA—Rp). Действие фактора было изучено также на модели взрослых и неонатально тимэктомированных мышей.

Материал и методы

Тимэктомия проводилась на мышах линии СВА массой 18—20 г и новорожденных мышах этой же линии (не позднее 24 часов после рождения). Тимэктомию осуществляли по общепринятой методике [8]. Взрослые тимэктомированные мыши через 2 месяца после операции получали инъекции активного препарата тимозина на протяжении 9 недель (2 раза в неделю по 60 мкг). Восстановление Т-клеточности в селезенке тестировали с помощью специфических моноклональных антител к Thy-1,2 антигену. Репарацию Т-клеточного звена иммунитета у неонатально тимэктомированных мышей проверяли в реакции отторжения аллогенного кожного трансплантата [1].

Для разделения тимоцитов на PNA⁺ и PNA⁻-субпопуляции получали клеточную суспензию тимусов 6-недельных мышей линии СВА. При этом 4×10^8 клеток тимуса инкубировали с агглютинином ара-

хиса (1 мг/мл) в течение 5—10 минут при комнатной температуре и затем наслаивали поверх пробирки с 20% эмбриональной телячьей сыворотки. После получаса инкубации незрелые Т-лимфоциты агглютинируют и опускаются на дно центрифужной пробирки. Реагглютинацию наблюдали после добавления к осадку 0,2 М раствора галактозы [7]. После обработки фактором незрелых клеток (реагглютинировавшего осадка) процесс инкубации с PNA повторяли и фиксировали изменение соотношения зрелых и незрелых Т-лимфоцитов.

Результаты и обсуждение

При обработке исследуемым препаратом, полученным из супернатантов кондиционированных сред стромальных фибробластов тимуса морской свинки, ранних тимических предшественников, несущих на своей поверхности рецептор к агглютину арахиса (PNA—Rp), который является маркером малодифференцированных кортикальных тимоцитов [7], происходит превращение этих клеток в более зрелые. Было показано, что более 25—50% PNA⁺-клеток дифференцируется под действием фактора в зрелые тимические клетки, не несущие на клеточной поверхности рецептора к агглютину арахиса. Ни один из известных ранее тимозинов не индуцирует экспрессии PNA⁻ на клеточной поверхности ранних предшественников Т-лимфоцитов и действует только на более зрелые PNA⁻-клетки.

Таблица 1

Восстановление Т-клеток в селезенке АТх мышей после введения им фактора кондиционированной среды культур тимуса

Способ восстановления	% θ -клеток в селезенке*
N+199 среда	33,5
АТх+199 среда	6
АТх+фактор	31

Обозначения. *—2 месяца в/в и в/бр по 2 раза в неделю; АТх—мыши, тимэктомизированные во взрослом состоянии; N—нормальные мыши.

Таблица 2

Отторжение кожного лоскута у NTx мышей

Способ восстановления иммунной компетенции	Номер эксперим.					
	1	2	3	4	5	6
N Tx+кожа+1 фракция с КМ—G 50 из тимуса	+	+	+	+	+	+
N Tx+кожа+1 фракция с КМ—G 50 селезенки	—	—	—	—	—	—
N Tx+тимус в ДК	+	+	+	+	+	+

Обозначения. NTx—неонатально тимэктомизированные мыши; (+)—отторжение кожного лоскута; (—)—нет отторжения; ДК—диффузионная камера.

Действие фактора было проверено также на животных моделях *in vivo*—на модели взрослых и неонатально тимэктомизированных мы-

шей. Известно, что при тимэктомии взрослых мышей наблюдается снижение количества Т-клеток в селезенке (через 2 месяца примерно вдвое). После инъекции таким мышам препарата тимического фактора, ранее тестированного в тестах *in vitro*, мы наблюдали постепенное восстановление Т-клеточности в селезенке. К концу второго месяца регулярных инъекций препарата наблюдалось практически полное восстановление количества Т-клеток в селезенке тимэктомированных мышей, что подтверждается результатами цитотоксического теста с моноклональной анти- θ сывороткой (табл. 1). После курса инъекций препарата неонатально тимэктомированным мышам, которым на 5-й неделе жизни трансплантировали аллогенный лоскут, на 2-ом месяце у них происходило отторжение кожного лоскута, тогда как у контрольной группы лоскут приживался. У всех опытных животных, помимо восстановления способности к отторжению аллогенных трансплантатов кожи, не наблюдается также развития вастинг-синдрома (истощение, облысение и т. п.), характерного для иммунодефицитов (табл. 2).

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали, что выделяемые нами факторы не только обладают способностью стимулировать дифференцировку ранних предшественников Т-клеток, но и полностью восстанавливают Т-клеточность у иммунодефицитных животных.

В настоящее время существует большое количество тестов, с помощью которых можно определять биологическую активность субстратов, выделенных из тимуса либо из культур тимического эпителия [3—6]. В большинстве из этих тестов проверяется активность факторов, связанная с дифференцировкой уже достаточно зрелых клеток тимуса до состояния, когда они приобретают способность отвечать на чужеродные антигены. Многие из них не участвуют в ранней до- и внутритимической дифференцировке Т-клеток. Это, в частности, относится и к факторам, выделяемым из культуральных сред от тимического эпителия [5]. Нами получены длительные перевиваемые диплоидные штаммы стромальных фибробластов тимуса (без примеси эпителиальных клеток) и показано, что из культуральных сред от таких штаммов можно выделить и очистить до гомогенного состояния фактор, участвующий в ранних стадиях Т-клеточной дифференцировки, таких как экспрессия θ -антигена, PNA⁻—PNA⁺. Кроме того, важно отметить, что инъекции такого субстрата тимэктомированным мышам восстанавливают у них реакции клеточного иммунитета. Получение этих субстратов в больших количествах (что весьма реально ввиду сравнительно простой схемы очистки) позволяет надеяться в ближайшем будущем на использование их в практическом здравоохранении.

**ԹԻՄՈՒՄԻ ՍՏՐՈՄԱԼ ՖԻՐՐՈԲԼԱՍՏՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ ԱՐՏԱԴՐՎՈՂ
ՖԱԿՏՈՐՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ**

Մի շարք իմունոլոգիական տեստերում ուսումնասիրվել է թիմուսի ֆիբրոբլաստների կողմից արտադրվող ֆակտորի ազդեցությունը: Հայտնաբերվել է, որ ստացված ֆակտորը խթանում է կեղևի լիմֆոցիտների հասունացման պրոցեսը, պակասեցնելով PNA-R⁺ բջիջների քանակը:

Այդ ֆակտորի ներարկումը նեոնատալ թիմէկտոմիայի ենթարկված CBA մկներին բերում էր փայծաղի T-լիմֆոցիտների քանակի ավելացման և տրանսպլանտանտների փոխներարկման ռեակցիայի վերականգնմանը: Այն կենդանիների մոտ, որոնք ստանում էին ստրոմալ ֆիբրոբլաստների ֆակտորը, լիովին բացակայում էին վաստինգ-սինդրոմի նշանները, որոնք հայտնաբերվում էին կոնտրոլ խմբում:

N. S. FILYAKINA, A. A. IVANOV-SMOLENSKY, Kh. S. SAYADYAN

**STUDY OF IMMUNOSTIMULATOR FACTOR PRODUCED THYMIC
STROMAL FIBROBLASTS**

There was investigated the action of the factor, producing thymic stromal fibroblasts in some immunological tests. It was shown that this factor stimulated the maturity of cortical T-lymphocytes, reduced the number of PNA-Rp bearing cells.

The investigation of this factor at neonatal thymectomized mice CBA showed the increase of the number of T-lymphocytes in the spleen and restoration of the reaction of transplant rejection. The animals, received this factor, had no any symptoms of Vasting syndrome.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Детерман Г. В. кн.: Гельхроматография. М., 1970, с. 248.
2. Иванов-Смоленский А. А., Грошева А. Г. Бюл. эксп. биол. и мед., 1978, 4, с. 451.
3. Фриденштейн А. Я., Иванов-Смоленский А. А., Кулагина Н. Н., Лурия Е. А. Иммунол., 1980, 4, с. 68.
4. Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Ламыкина К. С. Цитология, 1970, 12, с. 1147.
5. Jordan R. K., Crouse D. A., Harper C. M. Exp. Hemat. Today, 1979, 2, 139.
6. Koyuro K., Boyse E. A. Lancet, 1973, 7806, 740.
7. Kruisbeek A. H., Zijlstra J. J., Krose-Zuorp J. Immunol., 1977, 7, 375.
8. Loor F. Immunology, 1979, 37, 157.