

Список литературы

1. Алексеева И. Н. Противопеченочные антитела и функции печени.— Киев: Наук. думка, 1980.—182 с.
2. Алексеева И. Н., Безпрозванный Б. К., Ильчев Н. В., Брызгина Т. М. Влияние антигепатотоксической сыворотки на структуру и регенерацию печени при ее повреждении четыреххлористым углеродом.— Арх. патологии, 1980, № 9, с. 93.
3. Галенко Т. И. Исследование действия антигепатотоксической сыворотки на активность ферментов в печени и сыворотке крови: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1977.—24 с.
4. Григорьева М. П., Копелян И. И. Разработка микрометода культивирования клеток крови человека.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1972, № 8, с. 119—122.
5. Логинов А. С., Осокина Л. И., Ярцева А. М. Функциональная активность лимфоцитов при хроническом гепатите и циррозе печени.— В кн.: Иммунореактивность организма.— Таллин, 1973, с. 249—251.
6. Макаревич Я. А., Захлякова Л. В. Перспективы применения новых иммунологических тестов в клинике циррозов печени.— Актуал. вопр. гастроэнтерологии, 1972, вып. 5, с. 321—326.
7. Петров В. В., Чередеев А. Н. Т- и В-лимфоциты.— Успехи соврем. биологии, 1974, 77, № 1, с. 99—108.
8. Тареев Е. М., Канторович Р. А., Троянова Т. Г. Торможение миграции лейкоцитов в ответ на австралийский антиген у больных хроническим гепатитом и циррозом печени.— Актуал. вопр. гастроэнтерологии, 1973, вып. 6, с. 204—207.
9. Чернушенко Е. Ф., Когосова Л. С. Иммунологические исследования в клинике.— Киев: Здоров'я.—159 с.
10. Allison A. C. Interactions of T- and B-lymphocytes and macrophages in recovery from virus infections.— Proc. Roy. Soc. Med., 1973, 66, Dec., p. 1151—1154.
11. Bacon P. A., Berry H., Bown R. Cell-mediated immune reactivity in liver disease.— Gut, 1972, 13, N 6, p. 427—429.
12. Chandra R. K., Scrimshaw N. S. Immunocompetence in nutritional assessment.— Amer. J. Clin. Nutr., 1980, 33, N 12, p. 2694—2699.
13. Chisari F. V. Regulation of human lymphocyte by a soluble extract from normal human liver.— J. Immunol., 1978, 121, N 4, p. 1279—1286.
14. Florentin I., Kiger N. Mise en evidence de deux sous-populations de lymphocytes thymodependants selon une reactivite à la phytohemagglutinine (PHA).— Ann. Inst. Pasteur, 1972, 123, N 7, p. 135—141.
15. Kay H. E. Lymphocyte function.— Brit. J. Haematol., 1972, 20, N 1, p. 139—143.
16. Osborne W. R. Inherited absences of purine recycling enzymes associated with defects of immunity.— Trends Biochem. Sci., 1981, 6, N 13, p. 80—85.
17. Potter M., Moore M. PHA stimulation of separated human lymphocyte populations.— Clin. Exp. Immunol., 1975, 21, N 2, p. 456—467.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила 14.02.84

УДК 612.112.94.017.1+612.438.014.2:612.112.94

И. А. Безвершенко, Д. С. Сидоренко

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ОТДЕЛЯЕМОЙ ПРИ НАГРЕВАНИИ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ТИМОЦИТОВ И РЕЦЕПТОРОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С АУТОЛОГИЧНЫМИ ЭРИТРОЦИТАМИ

Лимфоциты периферической крови человека при нагревании в изотонической среде в течение 1 ч при 45 °С отделяют рецепторы, ответственные за взаимодействие с эритроцитами барана [6]. При этом теряется способность лимфоцитов взаимодействовать с эритроцитами барана в реакции розеткообразования, но сохраняется жизнеспособность (по данным реакции исключения красителя). По-видимому, при нагревании лимфоцитов в изотонической среде происходит сливание определенных компонентов их плазматической мембраны.

Тимоциты крысы также теряют некоторые компоненты поверхности при нагревании в изотонической среде, в результате чего снижается их способность формировать розетки с аутологичными эритроцитами,

однако их жизнеспособность сохраняется. Утраченная в результате прогревания способность формировать розетки с аутологичными эритроцитами может быть восстановлена посредством инкубации прогретых и отмытых тимоцитов с надосадочной жидкостью, полученной после прогревания тимоцитов в изотонической среде [1]. Отделяемые тимоцитами при нагревании компоненты, способные восстанавливать формирование розеток с аутологичными эритроцитами, адсорбируются на иммобилизованном IgG кролика, что свидетельствует о пространственной связи между рецепторами к аутологичным эритроцитам и рецепторами к IgG (возможно, к Fc фрагменту IgG). В тех же условиях прогревания тимоциты крыс выделяют 5'-нуклеотидазу (маркерный фермент плазматической мембраны многих клеток) [3].

По-видимому, при нагревании с поверхности тимоцитов могут слущиваться отдельные блоки связанных между собой рецепторов и ферментов плазматической мембраны. Изучение этих блоков может дать информацию о пространственных взаимоотношениях мембранных структур, ответственных за распознавание сингенных и аллогенных клеток, активацию лимфоцитов лектинами, различными медиаторами или другими факторами.

Цель работы состояла в том, чтобы выяснить, отделяется ли 5'-нуклеотидаза при нагревании тимоцитов в одном блоке с рецепторами к аутологичным эритроцитам.

Методика. Работа выполнена на тимоцитах крыс линии Вистар. Клетки выделяли с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера—Эльвейса в 0,14 М NaCl, забуференном 0,01 М бикарбонатным буфером, pH 7,2, дважды отмывали тем же буфером с помощью центрифугирования при 1500 g. Рецепторы к аутологичным эритроцитам отделяли нагреванием в изотоническом растворе NaCl, забуференном 0,01 М бикарбонатным буфером, pH 7,2 в течение 1 ч при 45°C, как описано Мендес и соавт. [6], которые использовали нагревание лимфоцитов периферической крови человека в изотонической среде для отделения рецепторов, ответственных за формирование E-розеток. Тимоциты, полученные от трех тимусов (примерно 1×10^8), суспендировали в 15 мл 0,14 М NaCl, забуференного 0,01 М NaHCO₃, и выдерживали в течение 1 ч при 45°C в ультратермостате. Надосадочную жидкость отделяли центрифугированием и определяли способность тимоцитов формировать розетки с сингенными и аутологичными эритроцитами до и после прогревания и отмывания. Формирование розеток исследовали по [4]. Надосадочную жидкость хроматографировали на колонке 0,6×60 см фирмы Farmacia (Швеция), с биогелем P-200 или на колонке 2,5×100 см с акрилексом P-200. На колонку 0,6×60 см наносили 1 мл надосадочной жидкости. Скорость элюции 7—8 мл/ч. Объем фракций 2 мл. На колонку 2,5×100 мл наносили 5 мл надосадочной жидкости.

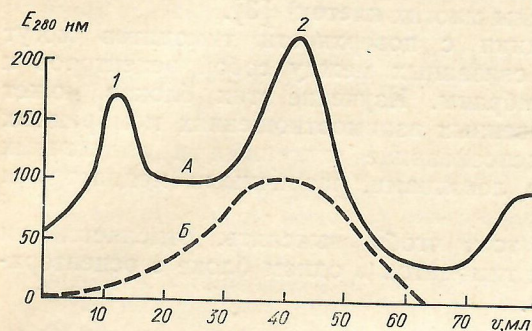
Экстинкцию каждой фракции измеряли на СФ-4А при длине волны 280 нм. Колонку 0,9×60 см откалибровывали по α_2 -макроглобулину человека, IgG кролика и альбумину быка. Хроматографические фракции, элюированные с колонки, диализовали против дистиллированной воды, лиофилизировали и использовали для дальнейшей работы. Активность 5'-нуклеотидазы в хроматографических фракциях определяли по [7]. Прогретые при 45°C и отмытые тимоциты инкубировали с каждой из полученных хроматографических фракций (1 мг на 10^6 клеток в 1 мл) при 4°C в течение 1 ч. После инкубации клетки дважды отмывали 0,14 М NaCl и определяли количество розеток, которые способны сформировать тимоциты с аутологичными или сингенными эритроцитами [4]. Контрольные тимоциты (прогретые при 45°C и отмытые) инкубировали в среде, не содержащей изучаемых фракций, в течение того же времени, что и тимоциты, инкубированные в присутствии этих фракций.

По увеличению процента розеткообразующих клеток судили о способности рецепторов, отделяемых при нагревании, восстанавливать сродство тимоцитов к сингенным или аутологичным эритроцитам. Цифровые данные подвергали статистической обработке методом прямых разностей [3].

Аналогичные хроматографические фракции получали из тимоцитов крыс, которым в течение двух дней вводили по 2,5 мг гидрокортизона (Гедеон Рихтер, Венгрия) и испытывали их так же, как и фракции, полученные из тимоцитов intactных животных.

Результаты. Прогревание тимоцитов крысы в изотонической среде в течение 1 ч приводит к снижению процента тимоцитов, формирующих розетки с аутологичными эритроцитами. Инкубация $6 \cdot 10^6$ прогретых и отмытых тимоцитов с надосадочной жидкостью, полученной от 10^9 тимоцитов с последующим отмыванием от не связавшегося с ними материала, приводит к частичному восстановлению розеткообразования [1].

В результате хроматографического разделения отделяемых тимоцитами при нагревании компонентов получаем две фракции (см. рисунок). Первая (по порядку элюции) содержит 5'-нуклеотидазу. Ее активность составляет 75,0 мкг свободного фосфата в 1 ч на 1 мг бел-



Профиль элюции фрагментов плазматической мембраны тимоцитов на биогеле Р-200:

А — полученные нагреванием, Б — нагреванием и адсорбцией на иммобилизованном Ig G. 1 — фракция фрагментов, содержащая 5'-нуклеотидазу, 2 — фракция, содержащая рецепторы к аутологичным эритроцитам.

ка. При добавлении этой фракции к прогретым и отмытым тимоцитам и последующем двухкратном отмывании клеток от не связавшегося материала происходит некоторое восстановление способности формировать розетки с аутологичными или сингенными эритроцитами. Эта фракция элюируется с колонки (биогель Р-200) в том же объеме, что и α_2 -макроглобулин человека. На этом основании можно заключить, что молекулярная масса входящих в нее компонентов более 200 000. Вторая хроматографическая фракция обладает более выраженной способностью восстанавливать возможность прогретых и отмытых тимоцитов формировать розетки с аутологичными эритроцитами

Восстановление розеткообразования фрагментами плазматической мембраны тимоцитов крыс (интактных и получавших гидрокортизон), полученными с помощью гельхроматографии на биогеле Р-200 ($M \pm m$, %)

Контрольные	Прогретые	Прогретые + I фракция	Прогретые + II фракция
1	2	3	4
Интактные			
$n=6$ $18,20 \pm 2,24$	$n=6$ $4,90 \pm 1,23$ $p < 0,001$	$n=6$ $8,43 \pm 0,71$ $p < 0,01$	$n=6$ $13,90 \pm 1,38$ $p < 0,001$
Получавшие гидрокортизон			
$n=11$ $20,30 \pm 1,46$	$n=11$ $5,60 \pm 0,96$ $p < 0,001$	$n=11$ $7,99 \pm 1,29$ $p < 0,01$	$n=11$ $15,30 \pm 1,79$ $p < 0,001$

Примечание. Сравнивали группы: 1 с 2; 2 с 3; 2 с 4.

(см. таблицу), чем первая. Эта фракция элюируется с колонки в том же объеме, что и сывороточный альбумин, однако молекулярная масса компонентов, входящих в эту фракцию, не может быть оценена на основании данных гельхроматографии на биогеле Р-200, так как материал второй фракции может обратно адсорбироваться биогелем, что приводит к задержке элюции. Это предположение подтверждается тем, что фракция, способная восстанавливать розеткообразование прогретых

и отмытых тимоцитов, выделенная из такой же надосадочной жидкости с помощью адсорбции на иммобилизованном IgG кролика [1], при хроматографии на биогеле Р-200 элюируется в том же объеме, что и вторая хроматографическая фракция (см. рисунок). Однако по результатам электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия молекулярная масса компонентов, входящих в состав этой фракции, в сумме много больше молекулярной массы альбумина быка.

Тимоциты крыс, которым вводили гидрокортизон, при нагревании также отделяют компоненты, восстанавливающие розеткообразование у прогретых и отмытых тимоцитов. При хроматографическом разделении компонентов надосадочной жидкости, полученной от тимоцитов крыс, которым вводили гидрокортизон, на биогеле Р-200 наблюдается тот же профиль элюции, что и в случае интактных тимоцитов, с тем отличием, что в надосадочной жидкости из интактных тимоцитов выделена третья фракция, которая элюируется в объеме, заметно большем, чем объем колонки (см. рисунок). Активность 5'-нуклеотидазы наблюдается в первой (по порядку элюции) фракции так же, как и в случае интактных тимоцитов; вторая фракция обладает способностью восстанавливать розеткообразование у прогретых и отмытых тимоцитов в большей степени, чем первая (см. таблицу).

Обсуждение результатов. При нагревании в изотонической среде при 45 °С в течение 1 ч тимоциты крысы теряют способность формировать розетки с аутологичными эритроцитами, точно так же, как Т-лимфоциты периферической крови человека теряют способность формировать розетки с эритроцитами барана при тех же условиях [6]. Потеря, по крайней мере частичная, сродства к эритроцитам обусловлена отделением определенных компонентов плазматической мембраны тимоцитов при 45 °С, так как инкубация прогретых и отмытых тимоцитов при +4 °С с надосадочной жидкостью, полученной от прогретых тимоцитов, восстанавливает способность к розеткообразованию, чего не происходит при инкубации прогретых и отмытых тимоцитов в тех же условиях без надосадочной жидкости.

По-видимому, отделяемые при нагревании компоненты мембраны тимоцитов содержат рецепторы к аутологичным эритроцитам. Наряду с рецепторами к аутологичным эритроцитам тимоциты отделяют также и 5'-нуклеотидазу. Как следует из результатов хроматографического разделения отделяемого тимоцитами при нагревании материала, 5'-нуклеотидаза и рецепторы к аутологичным эритроцитам попадают в различные хроматографические фракции.

Поскольку материал первой хроматографической фракции в значительно меньшей степени способен восстанавливать розеткообразование прогретых и отмытых тимоцитов с сингенными эритроцитами, чем второй (по порядку элюции) фракции, можно предполагать, что восстановление розеткообразования первой фракцией обусловлено примесью в ее составе второй фракции, что является результатом неполного разделения на колонке. Это предположение подтверждается тем, что 5'-нуклеотидазная активность не обнаруживается в препаратах рецепторов к аутологичным эритроцитам, полученных другим способом (аффинной хроматографией на иммобилизованных IgG). Профиль элюции таких препаратов на биогеле Р-200 показывает, что часть материала элюируется в объеме, близком к объему элюции первой фракции (см. рисунок).

Таким образом, отделяемые при нагревании рецепторы к аутологичным эритроцитам и 5'-нуклеотидаза, отделяемая при тех же условиях, не связаны друг с другом, по крайней мере, в составе отделяемых при нагревании фрагментов плазматической мембраны тимоцитов. Естественно, что на поверхности нативных тимоцитов 5'-нуклеотидаза и рецепторы к аутологичным эритроцитам могут соседствовать, однако то обстоятельство, что отделение материала происходит в мягких условиях, не повреждающих клетки (по данным реакции исключения

красителя), свидетельствует о том, что между ними в нативном состоянии могут существовать лишь крайне непрочные связи. В то же время рецепторы тимоцитов к аутологичным эритроцитам связаны с рецепторами к IgG, так как отделяемый при нагревании и адсорбируемый на иммобилизованном IgG материал восстанавливает розеткообразование с аутологичными эритроцитами у прогретых и отмытых тимоцитов [1]. Как видно из таблицы, такие же взаимоотношения между отделяемой при нагревании 5'-нуклеотидазой и рецепторами к аутологичным эритроцитам сохраняются у тимоцитов крыс, обработанных гидрокортизоном. По-видимому, такие взаимоотношения характерны как для медуллярных (кортизонрезистентных), так и для кортикальных тимоцитов.

Взаимоотношения рецепторов и маркерных антигенов поверхности лимфоцитов изучались в ряде работ [5, 8, 9]. Наиболее распространенным приемом для достижения этой цели является блокирование присоединения антител против одного антигена поверхности клетки антителами против другого антигена [5], что, по мнению авторов, свидетельствует о связи или близком соседстве поверхностных антигенов. Этот подход дает сравнительно мало информации о связи между компонентами поверхности лимфоцитов. Другие подходы связаны с применением детергентов и использованием лизатов клеток [8], что существенно искажает взаимоотношения между компонентами поверхности лимфоцитов. Разрабатываемый нами подход, по-видимому, менее травматичен, его преимущество состоит также в том, что он позволяет получить фрагменты плазматической мембраны тимоцитов в виде пригодных для изучения химическими методами препаратов.

I. A. Bezvershenko, D. S. Sidorenko

RELATIONSHIP BETWEEN HEATING-SEPARATED THYMOCYTE 5'-NUCLEOTIDASE AND RECEPTORS RESPONSIBLE FOR INTERACTION WITH AUTOLOGOUS ERYTHROCYTES

Rat thymocytes subjected to heating at 45°C in the isotonic medium for 1 hr lose their ability to interact with autologous erythrocytes in the rosette formation. Receptors responsible for interaction with autologous erythrocytes as well as 5'-nucleotidase are separated from thymocytes and pass into the supernatant. The incubation of heated thymocytes with supernatant at +4°C can restore the rosette formation with autologous erythrocytes. As to the data of biogel P-200 chromatography 5'-nucleotidase and receptors responsible for interaction with autologous erythrocytes are not connected between themselves.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health, Kiev

Список литературы

1. Безвершенко И. А., Быкова Л. М., Бойко М. Г. Некоторые рецепторы тимоцитов крысы.— Иммунология, 1980, 1, № 4, с. 19—21.
2. Безвершенко И. А., Быкова Л. М., Олейник Б. В., Синельникова А. Л. Изучение рецепторов тимоцитов, ответственных за розеткообразование.— Докл. АН УССР. Сер. Б, 1979, № 6, с. 456—460.
3. Кокунин В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов.— Укр. біохім. журн., 1975, 47, № 6, с. 776—781.
4. Charreire J., Carnaud C., Bach J. F. Studies on mouse autoreactive cells. Role of H-2 antigen in mouse autologous rosette formation.— Cell. Immunol., 1980, 49, p. 372—378.
5. Lynes M. A., Karl M., Dibiase K., Flaherty L. Supramolecular relationships of membrane antigens on the murine thymocyte.— J. Immunogenet., 1982, 9, N 6, p. 475—484.
6. Mendes N. F., Saraiva P. J., Santos O. B. Restorative effect of normal human serum transfer factor and thymosin on the ability of heated human lymphocytes to form rosettes with sheep erythrocytes.— Cell. Immunol., 1975, 15, p. 560—566.
7. Michell R. H., Hawthorne J. N. The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, 21, N 4, p. 333—338.