

ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ АМН СССР

На правах рукописи

Кудаева Ольга Тимофеевна

УДК 612.017.1 - 0.19:599.323.4

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ В-ЛИМФОЦИТОВ НА УРОВНЕ АНТИТЕЛОПРОДУЦЕНТОВ

14.00.36 - Аллергология и иммунология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

г.Новосибирск

1988

Работа выполнена в Институте клинической иммунологии
Сибирского отделения АМН СССР

Научный руководитель - доктор медицинских наук,
профессор В. А. Козлов

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор Н. Г. Арцимович

кандидат биологических наук
А. И. Аутеншлюс


Ведущее учреждение - Институт иммунологии МЗ СССР

Защита состоится "___" _____ 1988 года в ___ час.
на заседании Специализированного совета К.001.01.01 Инсти-
тута клинической иммунологии СО АМН СССР по адресу
Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14 .

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Инсти-
тута клинической иммунологии СО АМН СССР.

Автореферат разослан "___" _____ 1988г

Учёный секретарь
Специализированного совета
К.001.01.01
кандидат медицинских наук

 - А. В. Шурлыгина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Регуляция гуморального иммунного ответа, играющего ведущую роль в защите организма от многих бактериальных инфекций и выделяемых при этом токсинов, участвующего в противоопухолевом иммунитете, реакции против вирусов, паразитарной инвазии, а также приводящего в некоторых случаях к патологическим ситуациям (аллергии, аутоиммунные расстройства, болезни иммунных комплексов), не возможна без знания основных механизмов биосинтеза антител на всех уровнях, включая клеточный и молекулярный. В настоящее время в изучении молекулярно-генетических основ биосинтеза иммуноглобулинов разных классов, их возможного переключения и механизма генерации разнообразия антител — центральной проблемы иммунологии — достигнут значительный прогресс (Сидорова Е.В., 1982), выделены и исследованы некоторые факторы, регулирующие пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов при антигенной стимуляции (Ono S. et al., 1986; Oppenheim J.J. et al., 1987; O'Garra A. et al., 1988).

Однако много вопросов, особенно касающихся клеточного уровня регуляции синтеза антител, остаются нерешёнными: на каком этапе дифференцировки В-клетки становятся прекоммитированы к продукции иммуноглобулинов определённого класса; в каких IgM-продуцентах осуществляется переключение синтеза иммуноглобулинов с IgM на другой класс; каковы структурные основы и механизм контроля Т-хелперами типа ответа; как регулируется рекомбинация "районов переключения" на разных стадиях дифференцировки клеток В-ряда и другие.

Вопрос осложняется наличием многочисленных типов В-лимфоцитов, отличающихся по функциональным свойствам и мембранным характеристикам и, возможно, представляющих не только разные стадии, но и линии дифференцировки (Azano Y. et al., 1981; Pure E. et al., 1981; Hardy R.R. et al., 1984).

Эффективность развивающегося гуморального ответа определяется не только количеством образующихся антител, но и их свойствами: специфичностью, аффинностью, комплемент-связывающей активностью, а также рядом биологических эффекторных функций, обусловленных принадлежностью антител к тому или иному классу и подклассу иммуноглобулинов (Стьюард М., 1983). Молекулы антител, синтезирующиеся в ходе иммунного ответа организма на ан-

тигенный стимул, отличаются исключительным разнообразием (Тернер М., 1983), что также может отражать значительную гетерогенность клеток-антителопродуцентов, субпопуляционная структура которых, а также функция, регуляция и роль в иммунитете отдельных, отличных друг от друга популяций изучены недостаточно.

В настоящее время для характеристики гуморального иммунного ответа широко используется метод локального гемолиза, предложенный в 1963 году N.K. Jerne и A. Nordin и в дальнейшем модифицированный другими авторами (Ingraham J.S., Bussard P.D., 1964; Cunningham A.J., 1965; Dresser D.W., Wortis H.H., 1965).

При использовании метода локального гемолиза определяется общее количество клеток, продуцирующих антитела, что не отражает их качественных характеристик. Существуют основания для предположения о различиях антителообразующих клеток, которые выявляются разными вариантами метода, что проверялось некоторыми авторами, однако результаты оказались противоречивыми и недостаточно определёнными (Merchant B., Petersen B., 1968; Kaplan A.M., Cinader B., 1973; Trufakin V.A. et al., 1976).

Изучение свойств антителообразующих клеток, определяемых двумя наиболее распространёнными модификациями метода локального гемолиза — в агаре по N.K. Jerne и A. Nordin и в жидкой среде по A.J. Cunningham и A. Szenberg — и предположительно представляющих разные популяции антителопродуцентов, имеет большое значение для получения более точной и подробной картины развития гуморального иммунного ответа, что особенно важно при исследовании воздействий, оказывающих регулирующее влияние на иммунитет.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования состояла в изучении функциональной структуры антителопродуцентов при антигенном воздействии.

В задачи исследования входило:

1. Установить количественные соотношения АОК, определяемых в агаре и в жидкой среде, у мышей высоко- и низкоотвечающих линий.
2. Охарактеризовать АОК, определяемые разными методами, по некоторым параметрам (относительная авидность и гемолизирующая активность синтезируемых антител, пролиферативный потенциал клеток).
3. Изучить соотношение АОК, определяемых в агаре и в жидкой среде, в динамике иммунного ответа.
4. Определить чувствительность АОК, выявляемых разными методами, к иммунорегулирующим воздействиям.

5. Исследовать возможную связь между количеством IgM-АОК, определяемых разными методами, и образованием IgG-продуцентов.

Научная новизна. Впервые получены определённые характеристики АОК, выявляемых двумя наиболее распространёнными вариантами метода локального гемолиза: в агаре и в жидкой среде. Выделено две популяции IgM-АОК: "основная", которая выявляется как методом в агаре, так и в жидкой среде, и "добавочная", которая не определяется в агаре и может быть выявлена только в жидкой среде; соответственно её подсчитывали как разницу между количеством АОК в жидкой среде и в агаре.

Показано, что "основные" АОК синтезируют менее avidные антитела, которые обладают большей гемолитической активностью. IgM-АОК, не делящиеся в продуктивную фазу ответа (дифференцирующиеся в АОК без деления или уже заканчивающие пролиферацию к этому сроку), относятся к "основной" популяции АОК. Относительное содержание "основной" популяции среди всех IgM-АОК максимально на начальных этапах, тогда как доля "добавочных" АОК возрастает в ходе ответа. Показана возможная связь развития "добавочной" популяции IgM-АОК с продукцией в дальнейшем IgG-антител. Выявлена разная чувствительность популяций к иммуно-регулирующим воздействиям. Количество "основных" АОК увеличивается под влиянием макрофагов и интерлейкина-1; величина "добавочной" популяции возрастает при острой кровопотере и снижается при введении гидрокортизона в продуктивную фазу ответа. Введение полиакриловой кислоты стимулирует обе популяции, при старении и введении специфических супрессорных клеток селезёнки наблюдается снижение обеих популяций, но подавление "добавочной" популяции более выражено.

Установлены межлинейные различия в развитии популяций при иммунном ответе: у мышей низкоотвечающей линии преобладает "основная" популяция, у мышей высокоотвечающих генотипов представлены обе популяции антителопродуцентов.

Таким образом, получены новые данные о формировании гуморального иммунного ответа двумя популяциями IgM-антителопродуцентов, различающимися по свойствам, регуляции и роли в иммунитете.

Практическая ценность. Изучение величины "основной" и "добавочной" популяций у мышей, генетически отличающихся по силе

ответа, в динамике иммунных процессов, под влиянием воздействий, стимулирующих или угнетающих иммунитет, показывает, что определение количества "основных" и "добавочных" АОК даёт более полную информацию о развивающемся иммунном ответе и его регуляции по сравнению с определением количества АОК каким-либо одним из методов. Более того, определение количества АОК в агаре может не фиксировать изменения ответа, если это затрагивает только "добавочную" популяцию, как в случае с острой кровопотерей или действием гидрокортизона в продуктивную фазу. Определение количества АОК в жидкой среде, характеризуя силу ответа, ничего не говорит о качественных параметрах и может относительно нивелировать стимуляцию или подавление ответа при неизменной "основной" популяции.

Таким образом, разработан простой и очень информативный метод (одновременное определение количества IgM-АОК в агаре и в жидкой среде) для характеристики гуморального иммунного ответа, особенно полезный при исследовании воздействий, оказывающих регулирующее влияние на иммунитет.

Данные, полученные в работе, использованы при составлении методического руководства для научно-исследовательских учреждений по применению метода локального гемолиза и оцениванию полученных результатов.

Проведённый статистический анализ данных позволяет рекомендовать непараметрические критерии как более предпочтительные для оценивания результатов, полученных методом локального гемолиза.

По теме работы сделано 3 рационализаторских предложения.

Апробация диссертации. Апробация диссертации состоялась на научном семинаре Института клинической иммунологии СО АМН СССР в г. Новосибирске в 1987 году.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 3 печатные работы.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, указатель литературы. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 рисунками, содержит 16 таблиц. Список цитируемой литературы представлен библиографическими сведениями о 39 отечественных и 219 иностранных публикациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Животные. В работе использовались инбредные мыши линий СВА, С57В1/6, ВА1В/с, самцы и самки, полученные из питомника "Столбовая" АМН СССР, и линии СС57ВВ, самцы, полученные из питомника "Рапполово" АМН СССР; беспородные кролики для получения антисыворотки и морские свинки в качестве источника компонента. В опытах использовались мыши в возрасте 2 - 4 месяцев, а также мыши линии СВА, самцы, в возрасте 20 - 28 месяцев. Все животные содержались в стандартных условиях вивария ИКИ СО АМН СССР.

Определение количества АОК. Мышей забивали дислокацией позвоночника, селезёнки забирали во флакончики со средой, расстригали ножницами, пропускали многократно через шприц с иглой, фильтровали через металлическую сеточку. Ядродержащие клетки подсчитывали в камере Горяева. Непосредственно перед помещением клеток в агар или камеры их разводили до необходимой концентрации. Все процедуры с клетками проводили на льду.

Для забуферивания инкубационных сред применяли буфер трис-НС1; 0,2 М; рН=7,4 при 37°С; конечная концентрация буфера 0,01 М.

Определение количества Igm-АОК проводили одновременно двумя модификациями метода локального гемолиза: в агаре по Jerne N.K., Nordin A., 1963 и в жидкой среде по Cunningham A.J., Szenberg A., 1968.

Для определения количества Igm-АОК в агаре смешивали на водяной бане при 45°С 300 мкл расплавленного агара (1,12%), 100 мкл ЭБ ($5 \cdot 10^8$ ЭБ/мл) и 100 мкл клеточной суспензии, перемешивали и выливали в чашку Петри (пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм, ЛЗМП, Ленинград). Чашки инкубировали 2 часа при 37°С, затем на поверхность слоя агара наливали 300 мкл растворённой в среде сухой сыворотки морской свинки, разведённой в 4 раза, и чашки инкубировали 45 мин при 37°С. После инкубации чашки помещали в холодильник на +4°С. Подсчёт зон гемолиза проводили на следующий день.

Для определения Igm-АОК в жидкой среде готовили инкубационную смесь: 300 мкл среды, 100 мкл ЭБ ($4 \cdot 10^9$ ЭБ/мл), 100 мкл

растворённой в среде сухой сыворотки морской свинки, разведённой в 1,5 раза, и 500 мкл клеточной суспензии; перемешивали и заливали в стеклянные камеры (Каледин В.Н. и соавт., 1975). Камеры помещали в термостат на 37°C и инкубировали 75 мин. После инкубации подсчитывали зоны гемолиза под бинокулярной лупой (увеличение $\cdot 42$).

Определение IgG-АОК проводили по методу Sterz I. J., Riha I., 1965. Антисыворотку против IgG мыши получали иммунизацией кроликов IgG мыши в ПАФ. В предварительных опытах устанавливали оптимальное разведение антисыворотки (разведение в 200 раз). Готовили инкубационную смесь: 200 мкл среды, 100 мкл ЭБ ($4 \cdot 10^9$ ЭБ/мл), 100 мкл свежей сыворотки морской свинки, предварительно истощённой ЭБ и разведённой в 2 раза, 100 мкл кроличьей антисыворотки, разведённой в 20 раз, и 500 мкл клеточной суспензии. Инкубационную смесь перемешивали, заливали в камеры и инкубировали 2 часа при 37°C. В контрольные параллельные пробы вместо антисыворотки добавляли 100 мкл среды. Зоны гемолиза подсчитывали под бинокулярной лупой (увеличение $\cdot 42$).

Определение авидности. Для определения относительной авидности секретируемых антител получали строму ЭБ по методу Dodge J. T., et al., 1963. Определение относительной авидности проводили по методу De Heer D. H., 1975. В инкубационную среду для определения количества IgM-АОК вносили строму ЭБ в разных концентрациях. В контрольные пробы вносили такой же объём раствора для разведения стромы. Далее проводили определение количества IgM-АОК обычным способом.

Получение супрессорных клеток. Для получения специфических супрессорных клеток селезёнки мышам вводили внутрибрюшинно 0,5 мл 50% суспензии ЭБ. Через 2 недели мышей забивали, извлекали селезёнки, готовили клеточную суспензию, трижды отмывали, подсчитывали клетки (Whisler R. L., Stobo J. D., 1976). В предварительных опытах определяли необходимое для переноса количество клеток селезёнки.

Получение макрофагов. Для получения перитонеальных макрофагов мышам внутрибрюшинно вводили 1 мл 4% крахмала. Через 3 суток мышей забивали декапитацией, брюшную полость промывали средой, клетки осаждали центрифугированием.

Статистическое оценивание результатов. Так как недостатком метода локального гемолиза является значительный разброс результатов (Зигль Э., Бем Э., 1979), для выбора адекватных критериев оценки величины иммунного ответа по количеству АОК представлялось необходимым проверить распределение признака в однородных выборках. Для этого использовали две группы мышей линий СВА и С57В1/6, самцов, 3 - 4-месячного возраста, одного привоза, после иммунизации оптимальной дозой ЭБ ($2 \cdot 10^8$), которая применялась в опытах. Количество АОК определяли на 4-ые сутки одновременно двумя вариантами метода. Суммарная выборка для каждой линии состояла из 4-ёх серий, выполненных в разные дни, каждая серия - из 10-15 животных. Возможность объединения данных серий в одну выборку проверяли с помощью непараметрического Н-критерия Краскела и Валлиса (Закс Л., 1976).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ статистического описания, анализа и моделирования случайных элементов ППП СОАМСЭ, разработанного на кафедре АОИ НЭТИ и реализованного на ЭВМ БЭСМ-6 (Губарев В.В. и соавт., 1983). Проведённый анализ показал, что распределение признака далеко от нормального закона распределения и не может быть удовлетворительно аппроксимировано выбранными законами распределений (логнормальное, экспоненциальное, хи-квадрат, кривые семейства Джонсона и другие).

В связи с этим для статистического оценивания результатов экспериментов применяли непараметрические критерии, не зависящие от типа распределения и требующие только независимости данных, что следовало из способа их получения (U-критерий Вилкоксона, Манна и Уитни; критерий Вилкоксона для разностей пар; критерий λ Колмогорова и Смирнова; коэффициент ранговой корреляции Спирмена) (Гублер Е.В., 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Характеристика I_{gM} -АОК, определяемых разными вариантами метода локального гемолиза.

Количество I_{gM} -АОК определяли одновременно двумя модификациями метода локального гемолиза у мышей линий СВА и С57В1/6, соответственно высоко- и низкоответвляющих на ЭБ (Петров Р.В. и

соавт., 1976). У обеих линий мышей методом в жидкой среде выявляется достоверно больше IgM-АОК, чем в агаре ($p < 0,01$), но если у мышей высокоотвечающей линии разница между количеством АОК в селезёнке, определяемым двумя методами, велика (29 410 в агаре и 65 200 в жидкой среде), то у мышей низкоотвечающей линии таких резких различий не обнаруживается (9 310 в агаре и 11 730 в жидкой среде).

IgM-АОК, которые могут быть определены обеими модификациями метода локального гемолиза, можно условно назвать "основными". Популяция антителопродуцентов, которая не выявляется в агаре и может быть определена только в жидкой среде, может быть условно обозначена как "добавочная". Она может быть посчитана как разница между количеством АОК в жидкой среде и в агаре.

Для определения различий в количестве IgM-АОК, определяемых разными методами, представлялось удобным ввести субпопуляционный индекс:

$$СИ = \frac{(\text{кол-во АОК в жидкой среде}) - (\text{кол-во АОК в агаре})}{(\text{кол-во АОК в жидкой среде})},$$

который определяет долю "добавочной" популяции по отношению к общему числу АОК.

Субпопуляционный индекс у мышей СВА (0,529) оказался достоверно выше, чем у мышей С57BL/6 (0,133) ($p < 0,01$). Таким образом, мыши высоко- и низкоотвечающих линий отличаются не только высотой ответа, но и соотношением популяций антителопродуцентов.

Разная чувствительность методов при определении АОК у мышей, отличающихся по силе иммунного ответа, позволяет предположить, что АОК, выявляемые этими методами, могут характеризоваться разными свойствами.

Аффинность антител имеет большое значение для реализации биологических эффектов иммунных реакций, зависит от многих параметров иммунной системы и изменяется в ходе иммунного ответа. При иммунизации таким комплексным антигеном, как ЭБ, может быть охарактеризована только относительная авидность синтезируемых антител (Стьюард М., 1983). Это может быть сделано и для АОК, определяемых методом локального гемолиза, в тесте конкурентного торможения по уменьшению зон гемолиза в присутствии растворённого антигена (Фазекас де Сент-Грот

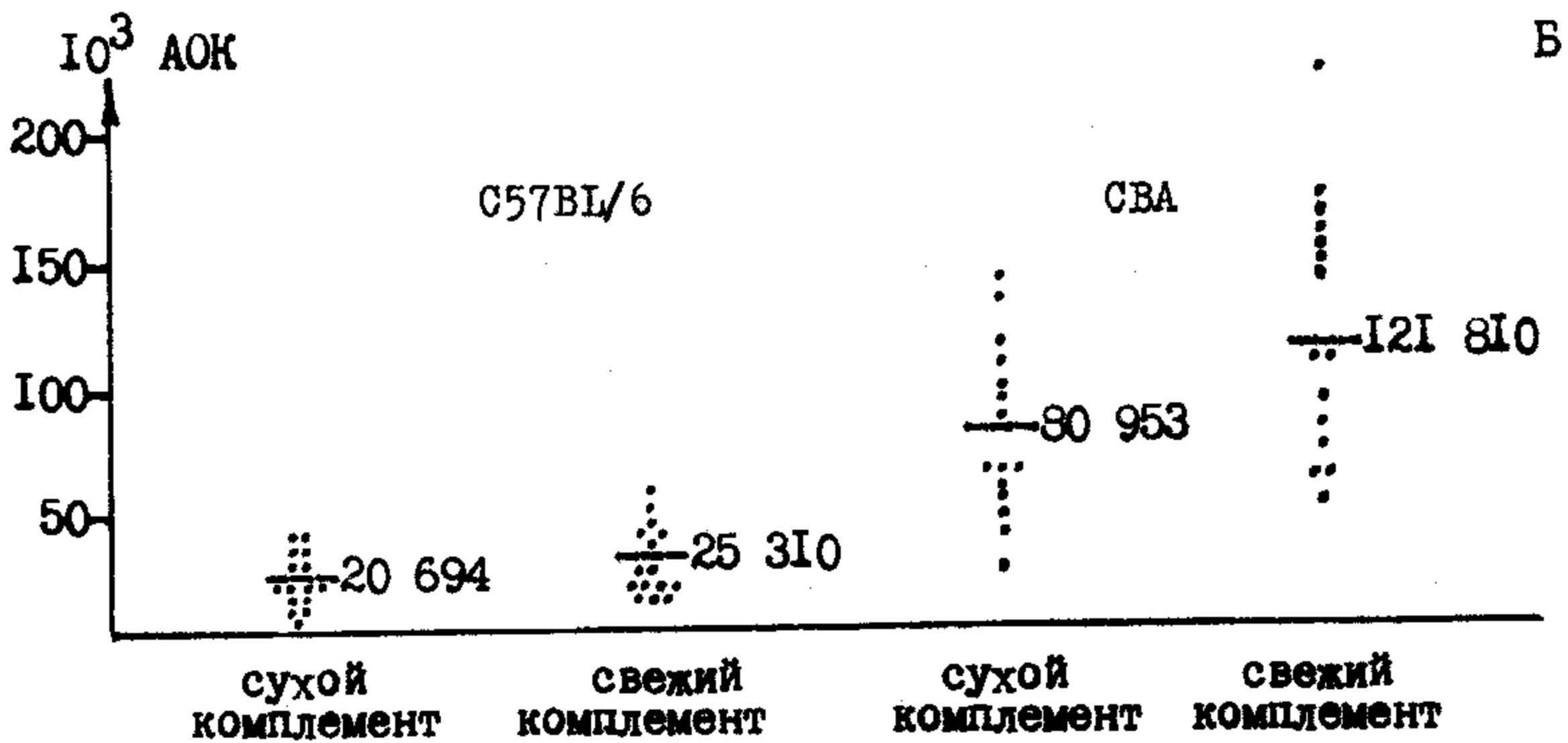
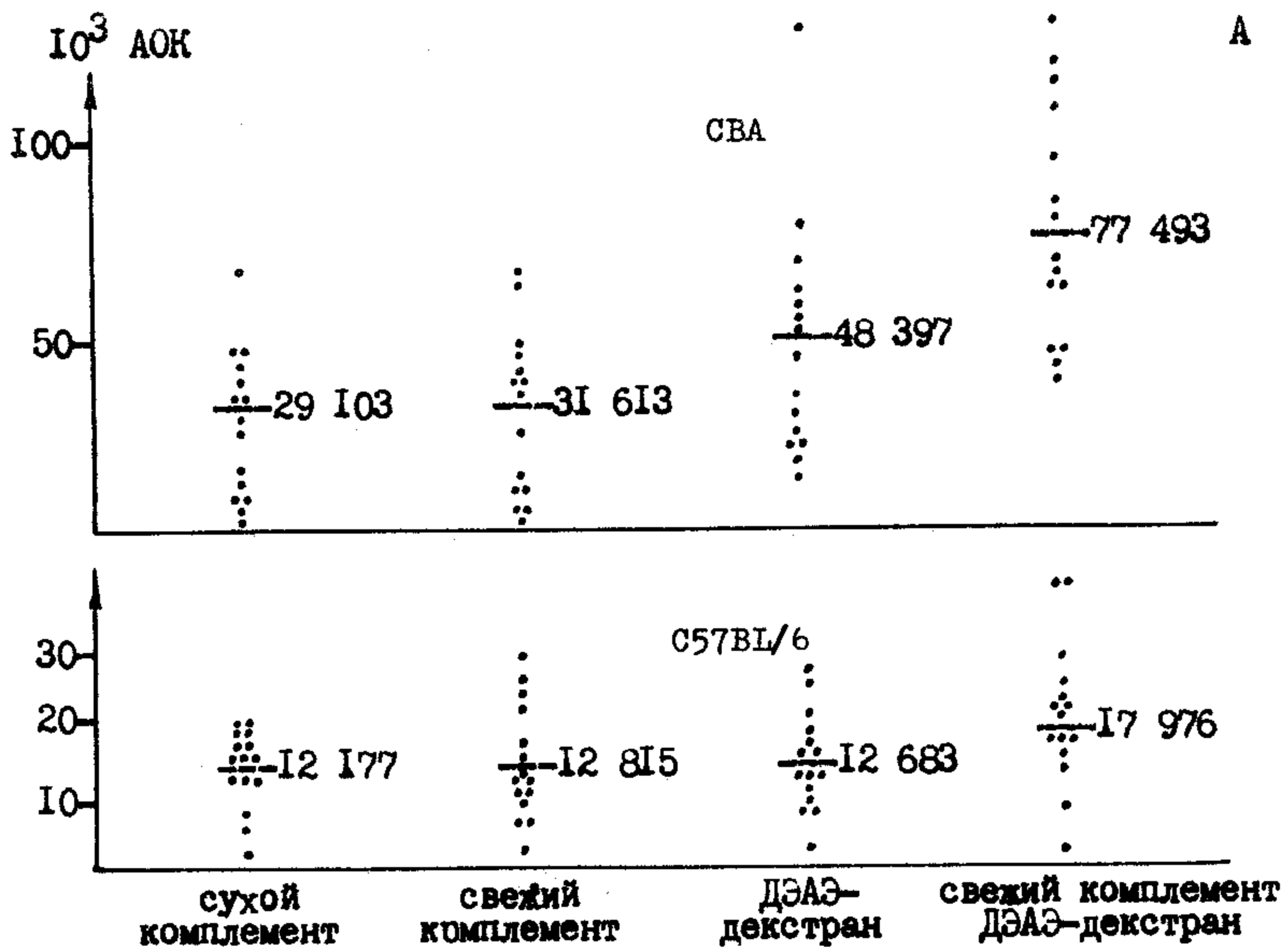


Рис. I. Количество IgM-AOK в селезёнке мышей линий CBA и C57BL/6 на 4-ые сутки после иммунизации в агаре (А) и в жидкой среде (Б) при использовании ДЭАЭ-декстрана и в качестве источника компонента сухой и свежей сыворотки морской свинки.

С., 1981).

У мышей высокоответающей линии СВА, у которых при ответе на ЭБ хорошо представлены обе популяции IgM-АОК — "основная" и "добавочная" —, изучали изменение количества АОК в агаре и в жидкой среде в присутствии стромы ЭБ. Наличие в тест-системе для выявления "бляшек" стромы ЭБ в разных концентрациях вызывает дозозависимое снижение количества АОК в жидкой среде (до 30% исходного уровня), количество АОК в агаре при тех же концентрациях стромы не меняется.

Полученные данные позволяют охарактеризовать "основные" АОК как синтезирующие менее avidные антитела, чем "добавочные".

Одной из основных причин, затрудняющих выявление АОК в агаре, является его антикомплемментарное действие, зависящее от высвобождения при его расплавлении сульфатированных полисахаридов, которые связывают ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , снижая активность комплемента (Зигль Э., Бем Э., 1979). Для устранения этого затруднения к агару добавляют раствор ДЭАЭ-декстрана, связывающего сульфатированные полисахариды, или используют вместо агара агарозу, лишённую этого недостатка. В случаях, когда процессы гемолиза в силу каких-либо причин идут не активно (непрямой и пассивный методы), в качестве источника комплемента используют свежую, а не высушенную сыворотку морской свинки, что также активирует гемолиз.

Для определения гемолизирующей способности синтезируемых антител изучали количество АОК в агаре у мышей обеих линий в условиях, стимулирующих процессы гемолиза (рис. I-A).

Использование свежей сыворотки морской свинки не меняет количества АОК в агаре у мышей обеих линий. Добавление ДЭАЭ-декстрана не влияет на количество АОК у мышей С57BL/6 и значительно (на 110%) увеличивает количество АОК у мышей СВА ($p < 0,01$). Максимальный эффект наблюдается при совместном действии этих двух факторов: количество АОК при добавлении в агар ДЭАЭ-декстрана и применении свежей сыворотки возрастает на 58% у мышей С57BL/6 и на 298% у мышей СВА (в обоих случаях $p < 0,01$).

Использование свежей сыворотки при определении АОК в жидкой среде достоверно повышает количество АОК у мышей СВА ($p < 0,01$), у мышей С57BL/6 повышение менее выражено и недостоверно ($p > 0,05$) (рис. I-B).

Таким образом, мыши низкоотвечающей линии продуцируют антитела, вызывающие гемолиз даже в затруднённых условиях, тогда как для максимального проявления гемолизирующей способности антител, образующихся при ответе мышей высокоотвечающей линии, необходима дополнительная активация системы комплемента. Применение ДЭАЭ-декстрана и свежей сыворотки приводит к тому, что исчезает межлинейная разница в чувствительности методов: субпопуляционный индекс у мышей СВА снижается от 0,770 до 0,318 и приближается к значению индекса мышей C57BL/6 - 0,196 ($p > 0,05$).

Из полученных данных по изучению авидности и гемолизирующей способности можно сделать вывод, что "основная" популяция IgM-АОК по сравнению с "добавочной" синтезирует антитела со сниженной авидностью, но более активные в отношении системы комплемента. Считается, что высокоаффинные антитела эффективнее в биологических реакциях, в частности, при активации системы комплемента, что было показано, в основном, для молекул IgG разной аффинности (Fauci A.S. et al., 1970). Однако существуют также предположения и факты, что низкоаффинные антитела обладают повышенной способностью активировать комплемент благодаря тому, что они вначале присоединяются к одному участку клеточной мембраны, где фиксируют комплемент, а затем вследствие низкой аффинности освобождаются из этого участка и присоединяются к другому, где опять активируют комплемент (Стьюард М., 1983; Salama A. et al., 1987).

Известно, что АОК представлены очень гетерогенной популяцией, включая активно пролиферирующие лимфоциты, неспособные к делению плазматические клетки и переходные формы (Harris T.N. et al., 1966). Показано, что наиболее интенсивный синтез ДНК наблюдается в лимфоидных органах на 3-4 сутки после иммунизации тимусзависимым антигеном, в то время как первые двое суток характеризуются низкой пролиферативной активностью и образующиеся в этот период антителопродуценты не включают ³H-тимидин (Tannenberг W.J.K., 1967; Nordin A.A. et al., 1970).

Для оценки пролиферативного потенциала "основной" и "добавочной" популяций мышам линии СВА, у которых при иммунном ответе представлены обе популяции, вводили ингибитор синтеза ДНК оксимочевину в дозе 1г/кг двукратно с интервалом в 7 часов в продуктивную фазу - на 3-и сутки после иммунизации (Morse B.S. et al., 1969).

Введение оксимочевина в этот период приводит к резкому угнетению ответа. Снижение количества АОК в жидкой среде более выражено (123 630 в контроле и 8 636 в опыте), чем в агаре (62 974 в контроле и 8 933 в опыте). Субпопуляционный индекс при этом также достоверно снижается ($p < 0,01$).

Таким образом, АОК, выявляемые на пике иммунного ответа обоими методами, в основном, представлены клетками, активно пролиферировавшими на 3-и сутки, в продуктивную фазу ответа. Не делящиеся в этот период антителопродуценты в дальнейшем (на 4-ые сутки) обладают равной возможностью быть выявленными обоими методами (8 933 в агаре и 8 636 в жидкой среде), то есть относятся к "основной" популяции АОК.

Можно предположить, что "основные" АОК представлены клетками, которые менее активно пролиферируют, либо раньше завершают процессы созревания, а также частично дифференцируются в АОК без предварительного деления.

Соотношение субпопуляций I_{gM} -АОК в процессе иммунного ответа.

Известно, что введение антигена после латентного периода приводит к быстрому увеличению количества АОК, которое, достигнув пика, резко снижается (Гурвич А. Е., 1978). Динамика антителообразования зависит от многих причин, в том числе и от генотипа отвечающего организма.

У мышей высоко- и низкоотвечающих линий определяли соотношение "основной" и "добавочной" популяций I_{gM} -АОК в динамике первичного и вторичного иммунного ответа.

У мышей СВА, С57BL/6и СС57BR изменения обеих популяций имеют похожий характер, но их соотношение меняется в динамике ответа. Самое низкое значение субпопуляционного индекса определяется на 3-и сутки ($p < 0,01$ по сравнению с 4-, 5-, 6-ми сутками у всех трёх линий).

Учитывая, что процессы созревания I_{gM} -ответа заканчиваются в первые 7-9 дней после иммунизации (Claflin L. et al., 1973) у мышей СВА также сравнивали соотношение субпопуляций на 4- и 9-ые сутки. Значение субпопуляционного индекса на 9-ые сутки достоверно возрастало ($p < 0,01$).

Результаты, полученные при изучении соотношения популяций АОК у мышей СВА в процессе вторичного ответа, аналогичны дан-

ным, полученным при первичном ответе, но в этом случае происходит сдвиг по времени и минимальное значение субпопуляционного индекса определяется на 2-ые сутки иммунного ответа.

Таким образом, в процессе ответа наблюдается увеличение доли "добавочных" АОК, охарактеризованных как более активно пролиферирующие клетки, синтезирующие антитела с повышенной авидностью, но слабо активирующие систему комплемента.

Полученные данные согласуются с представлением о низкой аффинности антител в начале ответа и об её нарастании в дальнейшем (Steiner L.A., Eisen H.N., 1967; Стьюард М., 1983).

Хотя молекулы IgM считаются хорошими активаторами системы комплемента, среди них есть значительные различия по этому свойству (Sell S. et al., 1970). Отношение негемолизирующих IgM к гемолизирующим возрастает со временем после иммунизации, что определяли от 4-ых до 10-ых суток (Plotz P. et al., 1968). Полученное в наших опытах снижение гемолитической активности в процессе ответа, охарактеризованное путём увеличения "добавочной" популяции АОК, согласуется с приведёнными выше данными литературы.

Соотношение популяций IgM-АОК при различных воздействиях.

Мыши линии C57BL/6 демонстрируют низкий ответ на ЭБ и преимущественное развитие "основной" популяции АОК, поэтому у них изучали соотношение популяций при стимуляции ответа. В качестве стимулирующих воздействий использовали введение интерлейкина-1 (ИЛ-1), полиакриловой кислоты (ПАК) и острую кровопотерю (рис. 3).

ИЛ-1, физиологический регулятор иммунного ответа, вызывает увеличение количества АОК, что фиксируется обоими методами. Сравнение популяций IgM-АОК показывает, что увеличение происходит за счёт "основных" АОК (8 056 в контроле и 16 403 в опыте, $p < 0,01$), количество "добавочных" АОК не меняется (1 692 в контроле и 2 150 в опыте, $p > 0,05$).

Введение ПАК - синтетического полиэлектролита, оказывающего выраженное иммуностимулирующее действие на многих этапах иммуногенеза, - вызывает резкую стимуляцию иммунного ответа, при этом увеличивается как "основная" (6 611 в контроле и 22 694 в опыте, $p < 0,01$), так и "добавочная" (1 597 в контроле и 5 616 в

в опыте, $p < 0,01$).

Острая кровопотеря за сутки до иммунизации также является мощным стимулятором иммунитета, что было показано на мышах высокоотвечающей линии (Козлов В.А. и соавт., 1977). У мышей низкоотвечающей линии острая кровопотеря не меняет количества "основных" ($9\ 973$ в контроле и $11\ 524$ в опыте, $p > 0,05$) и увеличивает содержание "добавочных" АОК ($2\ 264$ в контроле и $6\ 103$ в опыте, $p < 0,01$).

Мыши линии СВА демонстрируют высокий тип ответа на ЭБ, при этом у них представлены обе популяции АОК; соотношение популяций у них изучали при угнетении ответа: под действием специфических супрессорных клеток селезёнки, макрофагов, при введении больших доз гидрокортизона, а также при старении.

Специфические супрессорные клетки селезёнки вызывают сильное угнетение иммунного ответа, резко уменьшается количество как "основных", так и "добавочных" АОК, при этом ещё происходит небольшое, но достоверное снижение величины субпопуляционного индекса ($p < 0,01$). Такие изменения наблюдаются при всех дозах переносимых супрессорных клеток (10^4 , 20^4 , 50^4 клеток).

Макрофаги при разных соотношениях с клетками-мишенями могут оказывать как стимулирующий, так и ингибирующий эффект: с увеличением относительного количества макрофагов возрастание сменяется подавлением ответа лимфоидных клеток (Hoffman M., 1970). В наших опытах перенос перитонеальных макрофагов (10^7 клеток) не оказывает влияния на иммунный ответ при внутривенном введении и стимулирует "основные" АОК ($35\ 250$ в контроле и $50\ 183$ в опыте, $p < 0,01$), не меняя количества "добавочных" ($66\ 141$ в контроле и $65\ 983$ в опыте, $p > 0,05$) при внутрибрюшинном введении (в этом случае антиген также вводили внутрибрюшинно). Таким образом, наблюдается стимуляция ответа; вероятно, использованное количество макрофагов недостаточно для супрессии.

Гидрокортизон, кортикостерон и их синтетические аналоги вызывают у кортизон-чувствительных видов, к которым относится и мышь, ингибицию иммунных реакций (Корнева Е.А. и соавт., 1978). Мышам однократно вводили гидрокортизона ацетат в дозе 125мг/кг в продуктивную фазу ответа. Введение гормона в такой постановке опыта не меняет "основную" популяцию АОК ($26\ 400$ в контроле и $26\ 500$ в опыте, $p > 0,05$) и снижает "добавочную" ($60\ 552$ в контроле и $42\ 516$ в опыте, $p < 0,01$).

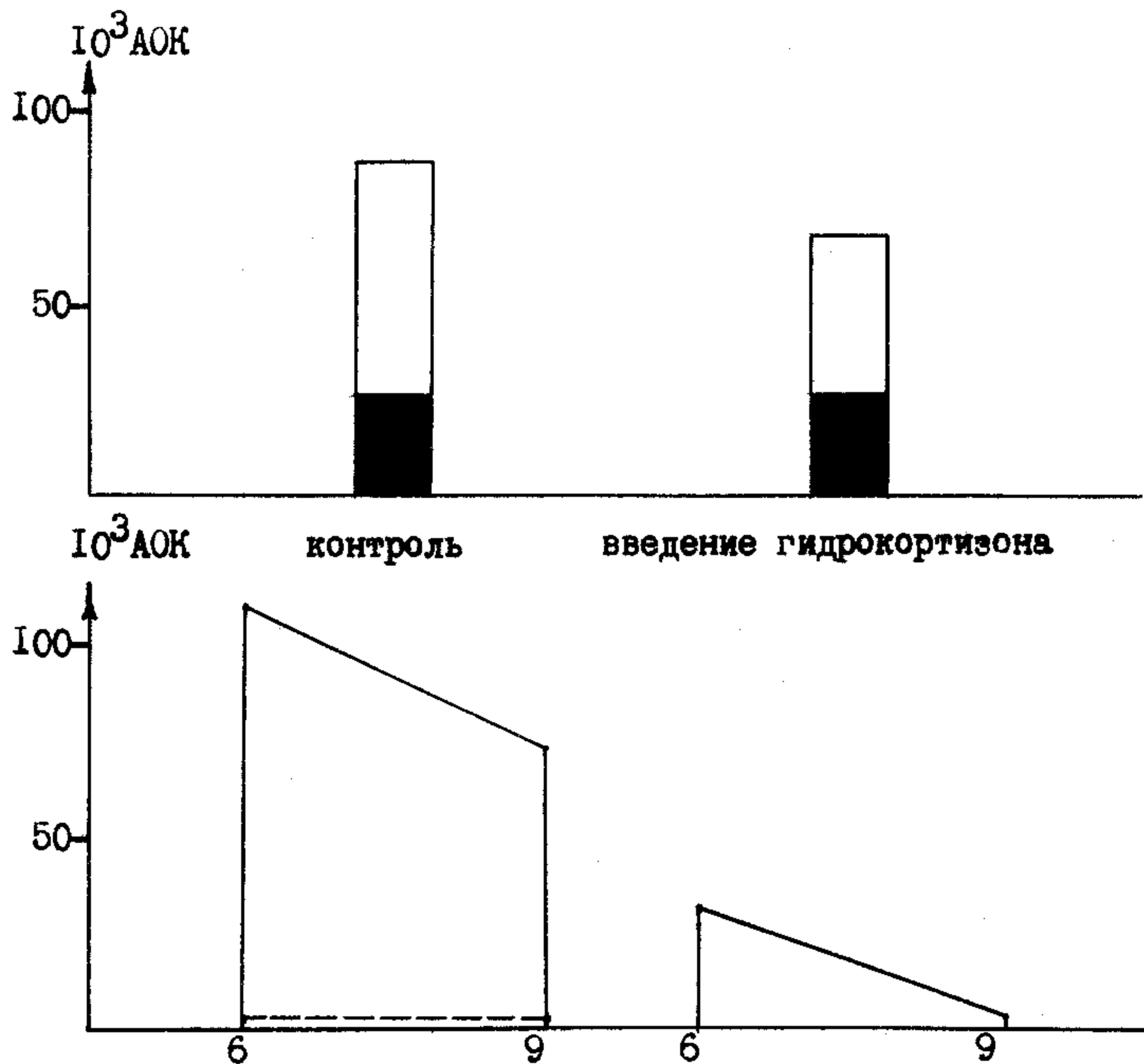


Рис. 2. Иммуный ответ (количество АОК в селезёнке) мышей линии СВА под влиянием экзогенного гидрокортизона. Вверху: количество "основных" (■) и "дополнительных" (□) IgM-AOK на 4-ые сутки после иммунизации. Внизу: количество IgM-AOK (---) и IgG-AOK (—) на 6-ые и 9-ые сутки после иммунизации.

При старении, в основном, страдают те функции В-лимфоцитов, которые зависят от Т-клеток: ответ на Т-зависимый антигены, IgG -ответ, продукция высокоаффинных антител (Макинодан Т., 1980; Бутенко Г.М., 1983). У старых мышей (возраст 24 месяца) наблюдается значительное снижение количества как "основных" (37 204 у молодых и 8 511 у старых), так и "дополнительных" АОК (55 795 у молодых и 4 072 у старых), а также уменьшение значения субпопуляционного индекса от 0,529 у молодых до 0,258, $p < 0,01$.

Таким образом, "основные" и "дополнительные" АОК обладают разной чувствительностью к различным иммунорегулирующим воздействиям, при этом определение "основной" и "дополнительной" популяций по сравнению с общим количеством АОК может служить дополни-

тельным источником информации и более детально характеризовать происходящие изменения.

Связь между образованием IgM -АОК и IgG -АОК.

Образование молекул IgM характеризует начальный этап ответа на антиген, в дальнейшем происходит преимущественная продукция антител класса IgG . IgG — эволюционно более позднее приобретение, иммуноглобулины этого класса считаются более эффективными в протективном отношении (Кихоу Д., 1981). До сих пор остаётся много вопросов относительно взаимосвязи синтеза IgM и IgG , их соотношения, переключения с синтеза IgM на продукцию IgG , характеристики В-клеток, в которых этот процесс имеет место.

Сравнение IgM - и IgG -ответа у мышей СВА и С57BL/6 показывает, что мыши со слабым типом IgM -ответа отличаются развитием преимущественно "основной" популяции IgM -АОК и низким IgG -ответом; мыши с сильным IgM -ответом характеризуются наличием значительной "добавочной" популяции и высоким IgG -ответом. Исходя из предположения о возможной связи "добавочной" популяции с последующим развитием IgG -продуцентов, образование IgG -АОК изучали в условиях, когда наблюдается различное изменение популяций IgM -АОК.

Воздействия, приводящие к снижению "основных" и "добавочных" АОК, вызывают ингибицию IgG -ответа (специфические супрессорные клетки селезёнки, старение). Значительное подавление количества IgG -АОК наблюдается также при введении гидрокортизона, хотя в этом случае происходит снижение только содержания "добавочных" АОК, количество "основных" не меняется (рис. 2).

Результаты изучения IgG -ответа при стимуляции ответа у мышей С57BL/6 частично подтверждают высказанное предположение (рис. 3).

Стимуляция ответа введением ПАК, увеличивающим обе популяции, приводит к усилению IgG -ответа ($p < 0,01$). Введение ИД-1, стимулирующего "основную" популяцию и не меняющего "добавочную", не влияет на количество IgG -АОК на пике ответа, но изменяет динамику антителогенеза. Однако острая кровопотеря, увеличивающая только "добавочную" популяцию, вызывает подавление IgG -ответа. Так как острая кровопотеря вызывает сложные сдвиги в организме, изменяющиеся со временем, возможно, что образование IgG -проду-

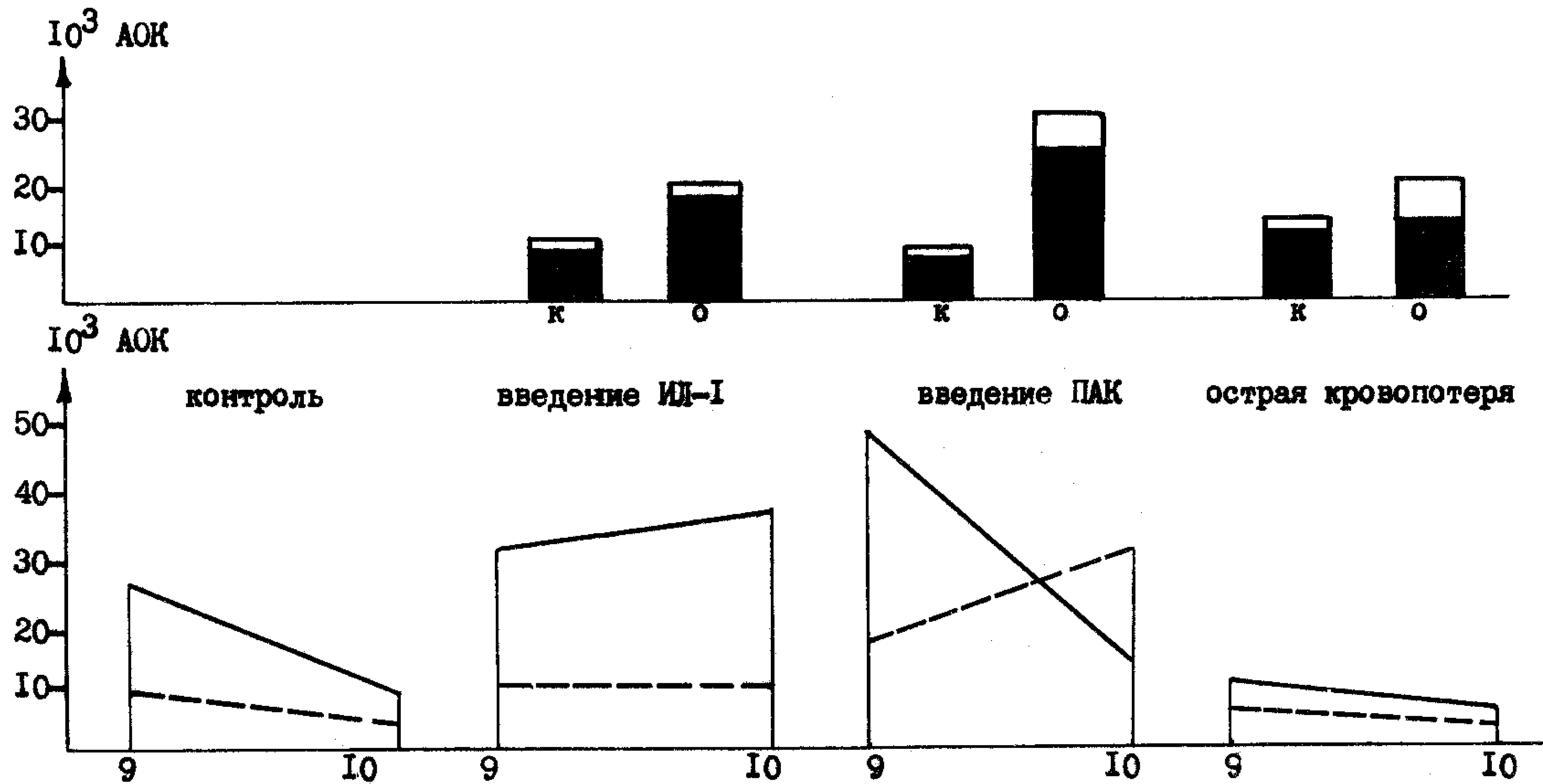


Рис. 3. Иммуный ответ (количество АОК в селезёнке) мышей линии С57ВL/6 под влиянием различных воздействий. Вверху: количество "основных" (■) и "дополнительных" (□) IgM-АОК на 4-ые сутки после иммунизации. Внизу: количество IgM-АОК (---) и IgG-АОК (—) на 9-ые и 10-ые сутки после иммунизации.

центров, которое совершается в более поздние сроки, попадает под влияние других условий, чем образование IgM-АОК. Так, показано, что через неделю происходит отмена стимуляции антителообразования (Козлов В.А. и соавт., 1982), наблюдается восстановление продукции супрессорного фактора клетками костного мозга (Ляхов В.В. и соавт., 1987). Возможно, после периода активной пролиферации всех ростков кроветворения, вызванной острой кровопотерей, усиливаются супрессорные воздействия для достижения прежнего равновесия и протекающие в этот период процессы образования IgG-АОК оказываются подавленными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Метод локального гемолиза в жидкой среде отличается большей чувствительностью, то есть позволяет выявить "добавочное" количество антителопродуцентов, по-видимому, в связи с более благоприятными условиями постановки метода, с отсутствием ряда причин, мешающих секреции антител и гемолизу. Эти "добавочные" АОК характеризуются по сравнению с "основными", которые могут быть выявлены обоими методами, продукцией более avidных антител с пониженной гемолизирующей способностью, а также более выраженным пролиферативным потенциалом. Относительное содержание "основной" популяции среди всех IgM-АОК максимально на начальных этапах, тогда как доля "добавочных" АОК возрастает в ходе ответа. Изучение силы IgG-ответа при изменении "основной" и "добавочной" популяций позволяет предположить наличие связи между величиной "добавочной" популяции и образованием в дальнейшем IgG-продуцентов.

Исследование чувствительности популяций к различным воздействиям показало, что они регулируются разными факторами. Макрофаги и продуцируемый ими ИЛ-1 оказывают влияние на величину "основной" популяции. В большинстве других случаев более лабильной оказывается "добавочная" популяция. Так, острая кровопотеря и введение гидрокортизона в продуктивную фазу изменяют количество только "добавочных" АОК; при старении и при переносе специфических супрессорных клеток селезенки угнетается образование обоих видов АОК, но подавление "добавочной" популяции выражено сильнее.

Антителопродуценты у мышей с низким типом ответа представлены преимущественно "основной" популяцией АОК, у высокоответствующих - обеими популяциями. Можно предположить, что иммунный от-

вет мышей низкорреагирующей линии протекает с преобладанием уже на начальных этапах процессов дифференцировки над пролиферативными в силу каких-либо причин, например, большей активности дифференцировочных факторов В-клеток по сравнению с ростовыми. Ведущую роль могут играть макрофаги и клетки-супрессоры, активность которых у мышей низкоотвечающих генотипов повышена и которые в наших опытах сдвигали соотношение популяций в сторону "основных" АОК.

Таким образом, в развитии гуморального иммунного ответа участвуют две популяции IgM-антителопродуцентов, отличающихся по свойствам, способам регуляции и роли в иммунитете. Значительное содержание "добавочной" популяции у высокоотвечающих линий мышей и низкое - у мышей со слабым типом ответа, увеличение доли "добавочных" АОК в ходе первичного и вторичного ответов, а также связь антителопродуцентов этого типа с количеством образующихся в дальнейшем IgG-АОК свидетельствуют об определяющей роли "добавочных" АОК в формировании полноценного иммунного ответа сильного типа.

ВЫВОДЫ.

1. Одновременное определение количества IgM-АОК двумя вариантами метода локального гемолиза - в агаре по N.K. Jerne и A. Nordin и в жидкой среде по A.J. Cunningham и A. Szenberg - позволяет выделить две популяции IgM-АОК: "основную", выявляемую обоими методами, и "добавочную", подсчитываемую как разница между количеством АОК в жидкой среде и в агаре.
2. Установлены межлинейные различия в соотношении "основной" и "добавочной" популяций: у мышей низкоотвечающей линии C57BL/6 при ответе на тимусзависимый антиген преобладающей является "основная" популяция АОК, тогда как у мышей высокоотвечающих генотипов представлены обе популяции.
3. Изучение относительной avidности и гемолизирующей активности продуцируемых антител показывает, что "добавочные" АОК отличаются от "основных" синтезом более avidных антител со сниженной способностью активировать систему комплемента.
4. Клетки, дифференцирующиеся в антителопродуценты без деления или заканчивающие пролиферацию в ранние сроки, относятся к "основной" популяции, так как ингибция синтеза ДНК в продуктивную фазу приводит к появлению на пике ответа только "основных" АОК.

5. Увеличение доли "добавочной" популяции в ходе первичного и вторичного ответов, а также её связь с количеством образующихся в дальнейшем IgG-АОК свидетельствуют об определяющей роли "добавочных" АОК в развитии полноценного гуморального ответа сильного типа.
6. Образование в процессе иммунного ответа "основных" и "добавочных" АОК регулируется разными факторами, что следует из разной чувствительности к ним популяций: макрофаги и интерлейкин-1 влияют на величину только "основной" популяции; изменение количества "добавочных" АОК более выражено при остальных изучавшихся воздействиях (введение гидрокортизона, перенос специфических супрессоров, острая кровопотеря, старение).
7. Гуморальный иммунный ответ на тимусзависимый антиген формируется генетически детерминированным развитием двух популяций IgM-антителопродуцентов, различающихся по свойствам синтезируемых антител, пролиферативному потенциалу, динамике появления, способам регуляции и роли в иммунитете.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Кудаева О.Т., Дозовой В.П., Козлов В.А. Гетерогенность антителообразующих клеток у высоко- и низкоотвечающих линий мышей. Иммунология, 1980, №5, с. 27-29.
2. Кудаева О.Т., Ноппе Т.П., Робинсон М.В., Труфакин В.А. Роль тимозина в развитии аутоиммунного процесса. В кн. "Регуляция иммунного гомеостаза" Материалы докладов III Всесоюзного симпозиума, Ленинград, 1982, с. 65-66.
3. Кудаева О.Т., Громыкина Н.Ю., Козлов В.А. Характеристика антителообразующих клеток, определяемых методом локального гемолиза. Бюллетень СО АМН СССР, 1987, №4, с. 90-92.
4. Кудаева О.Т., Наумова Е.Н., Козлов В.А. Статистическое оценивание данных, полученных методом локального гемолиза - в печати

Соискатель

Кудаева

Кудаева О.Т.

Подписано к печати 4 июля 1988г.
Зак.№ 405 Объём I п.л. Тираж 100 экз. МН 10159
Отпечатано роталпринтом СО АМН СССР