

616:612.017.1+611.018.1

**Н. А. ИЛЬИНА
В. С. КОЖЕВНИКОВ
Е. В. ГОЙМАН
О. Т. КУДАЕВА
О. П. КОЛЕСНИКОВА**

Институт клинической иммунологии СО РАМН,
Новосибирск

РАЗВИТИЕ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ АКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Введение

В настоящее время много внимания уделяется изучению иммунорегуляторных механизмов защиты от аутоиммунной патологии. В формировании регуляторной сети, ограничивающей экспансию аутореактивных Т-лимфоцитов, участвуют антиидиотипические Т-клетки, распознающие идиотип, ассоциированный с Т-клеточным рецептором, и антиэрготипические клетки, которые супрессируют Т-лимфоциты путем, не связанным с распознаванием идиотипических детерминант. Антиэрготипические клетки менее изучены; но известно, что они взаимодействуют с аутологичными активированными клетками (непокоящимися) вне зависимости от их антигенной специфичности и реагируют на экспрессию на поверхности активированных Т-клеток маркера активации, названного эрготопом [2]. В качестве эрготопа рассмат-

риваются молекулы CD25 (альфа-цепь рецептора IL-2), CD122 (бета цепь рецептора IL-2), HSP60.

В экспериментальных работах показано, что при аутоиммунных заболеваниях происходит депрессия антиэрготипического ответа; но он может быть повышен путем вакцинации активированными Т-клетками или описанными эрготопами [1]. В работах по изучению антиэрготипического ответа показано существование антиэрготипических клеток *in vitro*. В доступной литературе не описано способов оценки антиэрготипического ответа *in vivo*, за исключением клинического ответа в моделях аутоиммунных заболеваний [2]. В связи с этим целью исследования было изучение возможности индукции антиэрготипического ответа у мышей *in vivo* на введение аутологичных активированных *in vitro* спленоцитов и оценка иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Материал и методы исследования

В работе использовали мышей линии DBA/2, самцов в возрасте 2–8 месяцев из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Мышей забивали дислокацией позвоночника, обрабатывали 70%-м этаноловым спиртом и помещали на стерильный анатомический столик. Селезенку помещали во флакончики со средой, расстригали ножницами, многократно пропускали через шприц с иглой, фильтровали через металлическую сеточку и 2–3 раза отмывали центрифугированием при 1 000 об/мин в течение 10 минут со сменой среды.

Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл полной среды RPMI 1640 (ФГУП ГНЦ ВВ Вектор) с добавлением 2 мг тиенама, 125 мкл гентамицина, 30 мг L-глутамин (ФГУП ГНЦ ВВ Вектор), 40 мкл меркаптоэтанола (Ferak Berlin, Германия) и 1 мл хепеса (Gerbu, Германия) на 100 мл среды, затем подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Далее клетки помещали в культуральные матрасы (NUNC, Италия) из расчета 2 млн клеток на 1 мл полной среды с 10% FBS и активатором конканавалином А (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) из расчета 5 мкг на 1 мл среды. На 3-й день заменяли 70% среды на новую с таким же составом. На 6-й день клетки собирали, осаждали при 1,2 тыс. об/мин в течение 10 минут, ресуспендировали в 10 мл FBS и подсчитывали количество клеток. Затем добавляли FBS и DMSO (Riedel-deHaën, Германия) с таким расчетом, чтобы в результате получить 30 млн клеток на 1 мл FBS с 10% DMSO, и фасовали в криобирки по 1 мл. Хранили клетки в морозильной камере при -80 °С. Интактные спленоциты выделяли подобным образом и криоконсервировали непосредственно после получения (без этапа культивирования). Перед введением к клеткам добавляли 10 мл физиологического раствора и осаждали в течение 5 минут при 1 тыс. об/мин в медицинской лабораторной центрифуге. Осадок ресуспендировали в 0,2 мл физиологического раствора и в таком виде вводили мышам подкожно и объеме 0,05 мл под апоневроз.

Клеточный иммунитет оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ): измеряли величину отека лапки после введения 2×10^7 аутологичных активированных спленоцитов под подошвенный апоневроз задней лапки. Контроль – контрлатеральная лапка, в которую вводили среду в том же объеме. Учет реакции проводили через 24, 48 и 72 часа по величине местного отека; результаты выражали в процентах относительно контрольной лапки [4]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы Statistica, version 5 с применением критерия Wilcoxon и методов описательной статистики.

Результаты и их обсуждение

Для изучения иммунного ответа на аутологичные активированные спленоциты мышей разделили на 3 группы в зависимости от способа иммунизации и способа индукции реакции ГЗТ.

Таблица

Средний уровень реакции ГЗТ на введение аутологичных активированных клеток (M ± m)

Сроки исследования	Группа 1 (опытные) ГЗТ на активир. спленоциты	Группа 2 (контрольные) ГЗТ на интактные спленоциты	Группа 3 (интактные) ГЗТ на активир. спленоциты	Группа 1 (опытные) ГЗТ на интактные спленоциты	Группа 2 (контрольные) ГЗТ на активир. спленоциты
Уровень реакции ГЗТ, % 24 часа	38,3 ± 3,58 * #	8,6 ± 3,58	19,6 ± 3,32	5,8 ± 2,42	9,6 ± 1,26
Уровень реакции ГЗТ, % 48 часов	30,7 ± 8,41 * #	5,6 ± 3,56	11,4 ± 4,12	2,6 ± 1,44	1,4 ± 0,74
Уровень реакции ГЗТ, % 72 часа	9,3 ± 3,73	0,9 ± 0,63	4,4 ± 1,98	1,5 ± 0,99	1,5 ± 0,99

Примечание. * – p < 0,05 между опытной группой (n = 14) и контрольной группой (n = 14); # – p < 0,05 между опытной группой и интактной группой (n = 10).

Группа 1 (опытные) была иммунизирована подкожно аутологичными активированными спленоцитами 1 раз в неделю 2×10^7 клеток в течение 4 недель, затем под апоневроз задней лапы животным вводили 2×10^7 активированных спленоцитов. Группа 2 (контрольные) была иммунизирована подкожно интактными спленоцитами 1 раз в неделю 2×10^7 клеток в течение 4 недель, затем под апоневроз задней лапы мышам вводили 2×10^7 интактных спленоцитов. Группа 3 (интактные) не была иммунизирована, но одновременно с первыми двумя группами животным вводили под апоневроз задней лапы 2×10^7 активированных спленоцитов. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) оценивали по методике локальной ГЗТ через 24, 48 и 72 часа.

Было отмечено, что средний уровень реакции ГЗТ у мышей в опытной группе, иммунизированной активированными спленоцитами, достоверно выше ($p < 0,05$) через 24 и 48 часов по сравнению с контрольной и интактной группами, что свидетельствует о существовании иммунного ответа, направленного против активированных клеток. Через 72 часа достоверных различий не получено (табл.).

После угасания реакции ГЗТ, для того чтобы исключить наличие иммунного ответа против активированных клеток при иммунизации интактными спленоцитами (они могут содержать некоторое количество активированных клеток), мышам, иммунизированным активированными спленоцитами (группа 1), под апоневроз были введены интактные спленоциты, а группе мышей, иммунизированных интактными спленоцитами (группа 2), — активированные клетки. Учет реакции ГЗТ производили через 24, 48 и 72 часа.

При введении активированных спленоцитов 2-й группе мышей и интактных спленоцитов 1-й группе отмечался минимальный уровень ре-

акции ГЗТ без достоверных различий между группами.

Заключение

Таким образом, эти эксперименты показали отсутствие иммунного ответа на введение активированных клеток при иммунизации интактными клетками, а также на введение интактных клеток при иммунизации активированными клетками (табл.).

Выводы

1. Развитие реакции ГЗТ в ответ на введение аутологичных активированных *in vitro* спленоцитов свидетельствует о существовании иммунного ответа, направленного против аутологичных клеток, активированных митогеном.
2. Полученные результаты указывают на возможность оценки антиэрготипического ответа на введение аутологичных активированных клеток с помощью реакции ГЗТ.

Библиографический список

1. Cohen I.R., Francisco J., Mimran A. Treg in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 1227–1232.
2. Lohse A., Mor F. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells // *Science.* — 1989. — Vol. 244. — P. 820–822.
3. Mimran A., Mor F., Cohen I.R. et al. DNA vaccination with CD 25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an anti-ergotypic response // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 113. — P. 924–932.
4. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T. et al. Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice // *Immunology.* — 1979. — Vol. 38(3). — P. 577–583.