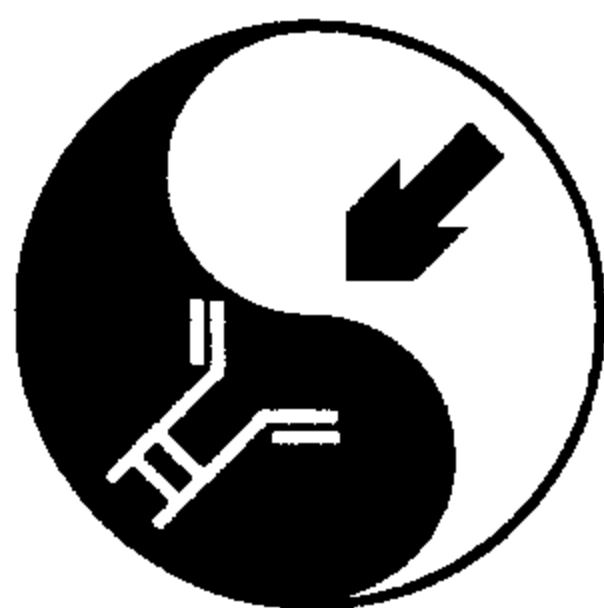


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

# КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ



## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

Под редакцией  
академика РАМН *В.А. Козлова*,  
доктора медицинских наук, профессора *С.В. Сенникова*,  
доктора медицинских наук, профессора *Е.Р. Черных*,  
доктора медицинских наук, профессора *А.А. Останина*



НОВОСИБИРСК  
«НАУКА»  
2009

**Н.А. Ильина, Е.В. Гойман, О.Т. Кудаева,  
О.П. Колесникова, В.С. Кожевников**

*НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск*

## **ИНДУКЦИЯ И ОЦЕНКА АНТИЭРГОТИПИЧЕСКОГО ОТВЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Резюме.** В исследованиях идиотип-антиидиотипических взаимодействий, индуцируемых Т-клеточной вакцинацией, выявлен еще один тип регуляторной активности, имеющей важное значение в контроле аутоиммунных реакций, — антиэрготипический ответ. Классически такой вид ответа индуцируется антиген-активированными клетками и направлен против активационных маркеров Т-лимфоцитов независимо от их антигенной специфичности. В данной работе исследована возможность индукции антиэрготипического ответа у мышей путем иммунизации поликлонально активированными клетками с помощью конканавалина А. Показано, что в ответ на такую иммунизацию развивается клеточный иммунный ответ — гиперчувствительность замедленного типа только у мышей, иммунизированных активированными клетками. У интактных мышей, а также у мышей, иммунизированных интактными клетками, ГЗТ<sup>6</sup> на активированные клетки не развивалась.

### **Введение**

В известном многообразии регуляторных функций иммунной системы особое место занимают сетевые взаимодействия, включающие распознавание CDR и F<sub>g</sub> последовательностей рецептора

---

<sup>6</sup> Принятые сокращения: АОК — антителообразующие клетки, ГЗТ — гиперчувствительность замедленного типа, РТПХ — реакция трансплантат против хозяина, ФГА — фитогемагглютинин, ЭБ — эритроциты барана, ConA — конканавалин А, IFN- $\gamma$  — интерферон-гамма, IL-4 (10) — интерлейкин 4 (10), TCR $\gamma/\delta^+$  — Т-клеточный рецептор, TNF- $\alpha(\alpha/\beta)$  — фактор некроза опухоли-альфа (альфа/бета).

Адрес для корреспонденции: e-mail: kvsiki@ngs.ru, В.С. Кожевников

антиген-реактивных Т-клеток (идиотипа)  $CD4^+$  антиидиотипическими клетками с формированием, в результате иммунного ответа,  $CD8^+$  цитотоксических антиидиотипических клеток [5]. Исследование идиотип-антиидиотипических Т-Т-клеточных взаимодействий в модели Т-клеточной вакцинации, защищающей животных от индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, выявило проявления еще одного типа регуляции, направленного против детерминант активированных антигеном Т-клеток («эрготопов») — антиэрготипического ответа [7, 8]. Антиэрготипический ответ проявлялся в том, что Т-клеточная вакцинация активированными Т-клетками, независимо от их антигенной специфичности так же, как и «классическая» Т-клеточная вакцинация облученными антиген-реактивными клетками — эффекторами заболевания, могла защищать животных от последующей индукции заболевания живыми антиген-реактивными Т-клетками. Детерминанты, вызывающие данный ответ («эрготопы»), включают молекулы, экспрессирующиеся активированными Т-клетками:  $CD25$ ,  $HSP60$  и др., а клетки, отвечающие на детерминанты активированных клеток, обозначают как антиэрготипические клетки [1, 11].

Клетки, пролиферирующие в ответ на активированные антигеном Т-клетки, фенотипически представляют собой как  $CD8^+$  и  $CD4^+$ , так и  $CD3^+CD4^-CD8^-$ -клетки главным образом  $TCR\gamma/\delta^+$ , продуцирующие  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , а также, на уровне клонов,  $TNF-\alpha/\beta$ ,  $TGF-\beta$  и, в редких случаях,  $IL-4$  и  $IL-10$  [2, 9, 10]. Большая часть клонов антиэрготипических клеток обладала цитотоксичностью против активированных Т-клеток [2]. После иммунизации крыс Т-клетками, активированными как антигеном, так и  $ConA$ , развивалась ГЗТ в ответ на активированные Т-клетки независимо от их антигенной специфичности, однако ГЗТ на  $ConA$ -активированные клетки не исследовалась. Показано также, что антиэрготипические клетки, индуцированные Т-клетками, активированными антигеном, не отвечают на Т-клетки, активированные ФГА [2]. Эти данные позволяют предполагать некоторую «неполноценность» митоген-активированных клеток в индукции антиэрготипического ответа.

Антиэрготипическому ответу придается большое значение в регуляции аутореактивных клеток и, таким образом, в контроле аутоиммунных заболеваний [1, 11], однако вопрос о роли антиэрготипических клеток в регуляции нормального иммунного ответа пока остается открытым.

Целью настоящего исследования являлось уточнение возможности запуска антиэрготипического ответа ConA-активированными клетками, его оценки с помощью реакции ГЗТ именно на ConA-активированные клетки и изучение влияния антиэрготипического ответа на стандартный клеточный и гуморальный иммунный ответ против эритроцитов барана.

### Материалы и методы

В работе использовали мышей-самцов линии DBA/2 в возрасте 2–8 мес и гибридов первого поколения (C57BL/6 × DBA/2)F1 (H-2b/d), самок в возрасте 2–3 мес 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).

*Активация и наращивание активированных спленоцитов.* Спленоциты, полученные стандартным методом [3, 12], ресуспендировали в 10 мл полной среды RPMI 1640 (ФГУП ГНЦ ВБ Вектор) (с добавлением 2 мг тиенама, 125 мкл гентамицина, 30 мг L-глутамина (ФГУП ГНЦ ВБ Вектор), 40 мкл меркаптоэтанола (Ferak Berlin, Германия) и 1 мл хепеса (Gerbu, Германия) на 100 мл среды) и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Затем клетки помещали в культуральные матрасы (NUNC, Италия) из расчета 2 млн клеток на 1 мл полной среды с 10 % FBS и активатором — конканавалин А (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) из расчета 5 мкг/мл. 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 мин, ресуспендировали в 10 мл FBS и подсчитывали их количество. 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 криопробирки по 1 мл. Далее клетки замораживали и хранили в морозильной камере при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Интактные спленоциты выделяли подобным образом и криоконсервировали непосредственно после получения (без этапа культивирования). Для введения их с целью иммунизации клетки размораживали добавлением 10 мл физиологического раствора и осаждали в течение 5 мин при 1 тыс. об/мин в медицинской лабораторной центрифуге. Осадок ресуспендировали в 0,2 мл физио-

логического раствора и в таком виде вводили мышам подкожно в холку. Для индукции реакции ГЗТ клетки вводили под апоневроз задней лапы 0,05 мл физиологического раствора.

*Оценка иммунного ответа на активированные спленоциты.* Клеточный иммунитет оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) после введения  $2 \times 10^7$  сингенных активированных спленоцитов под подошвенный апоневроз задней лапки, в качестве контроля измеряли отек контрлатеральной лапки, в которую вводили среду в том же объеме; учет реакции проводили через 24, 48 и 72 ч по величине местного отека; результаты выражали в процентах относительно контрольной лапки [12].

*Определение уровня гуморального ответа на эритроциты барана (ЭБ).* Гуморальный иммунный ответ на ЭБ (число IgM — АОК в селезенке) оценивали на пике ответа, свойственного данному генотипу, по количеству локальных зон гемолиза после внутривенного введения  $2 \times 10^8$  ЭБ [3].

*Оценка клеточного ответа на эритроциты барана.* Клеточный иммунитет оценивали по степени выраженности реакции ГЗТ: измеряли величину отека лапки после введения разрешающей дозы ЭБ сенсibilизированным животным по стандартной методике [12].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы Statistica, version 5, с применением критерия Wilcoxon и методов описательной статистики.

## Результаты и обсуждение

Для оценки иммунного ответа на сингенные активированные спленоциты мышей разделили на три группы.

Группа 1 (опыт) — мыши, иммунизированные подкожно сингенными активированными спленоцитами ( $2 \times 10^7$ ) 1 раз в неделю в течение 4 нед; для индукции реакции ГЗТ под апоневроз задней лапы было введено  $2 \times 10^7$  активированных спленоцитов.

Группа 2 (контроль) — мыши, иммунизированные подкожно интактными спленоцитами ( $2 \times 10^7$ ) 1 раз в неделю в течение 4 нед; под апоневроз задней лапы введено  $2 \times 10^7$  интактных спленоцитов.

Группа 3 (интактные) — не были иммунизированы, затем под апоневроз задней лапы вводили  $2 \times 10^7$  активированных спленоцитов.

В контрлатеральную лапу вводили среду в том же объеме. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа оценивали по методике локальной ГЗТ через 24, 48 и 72 ч.

Было отмечено, что средний уровень реакции ГЗТ у мышей в опытной группе, иммунизированной активированными спленоцитами, достоверно выше через 24 и 48 ч по сравнению с контрольной и интактной группами, что свидетельствует о существовании иммунного ответа, направленного против активированных сингенных клеток. Через 72 ч достоверных различий не было получено (см. рисунок).

Для того чтобы исключить наличие иммунного ответа против активированных клеток при иммунизации интактными спленоцитами (которые могут содержать некоторое количество активированных клеток), через 7 сут мышам, иммунизированным активированными спленоцитами (группа 1) под апоневроз, были введены интактные спленоциты, а группе мышей, иммунизированных интактными спленоцитами (группа 2), введены активированные клетки. Учет реакции ГЗТ проводили через 24, 48 и 72 ч.

При введении активированных спленоцитов мышам группы 2 и интактных спленоцитов мышам группы 1 отмечался минимальный уровень реакции ГЗТ (менее 10 % в обеих группах). 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. 1).

Опыт по измерению выраженности реакции ГЗТ на активированные клетки повторили на мышах (C57BL/6 × DBA/2)F1. Были

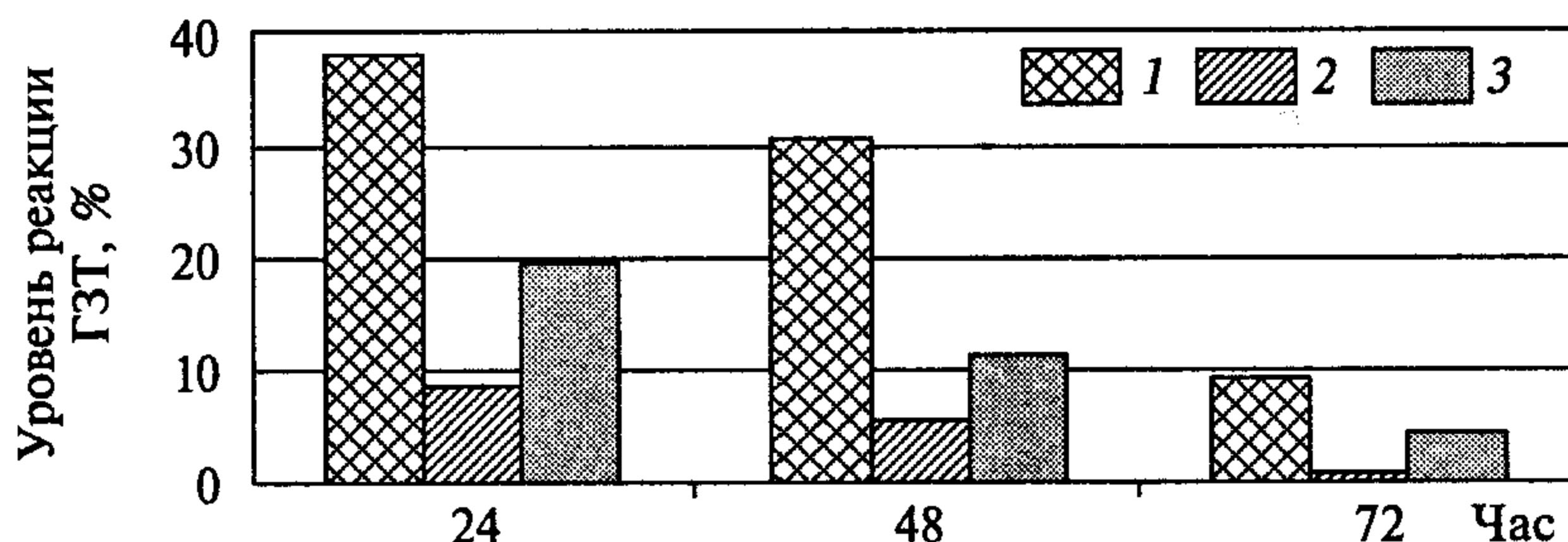
получены аналогичные результаты: средний уровень реакции ГЗТ в опытной группе был достоверно выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной и интактной (в опытной группе 26,3 %, в контрольной — 3,6 %, в интактной — 13,2 %).

В следующей серии опытов мы изучали влияние введения активированных клеток на течение нормального иммунного ответа. Для этого были взяты аналогичные группы: опытная, контрольная и интактная (см. рисунок). После иммунизации у

Таблица 1. Средний уровень реакции ГЗТ на интактные спленоциты в опытной группе (1) и на активированные спленоциты в контрольной группе (2) (перекрестное введение) ( $M \pm m$ ), %

Время тестирования, ч	Группа 1 ( $n = 14$ )	Группа 2 ( $n = 10$ )
24	$5,8 \pm 2,42$	$9,6 \pm 1,26$
48	$2,6 \pm 1,44$	$1,4 \pm 0,74$
72	$1,5 \pm 0,99$	$1,5 \pm 0,99$

Примечание. Здесь и в табл. 2  $M \pm m$  — средняя и ошибка средней.



Средний уровень реакции ГЗТ на введение активированных спленоцитов.

1–3 — группы: 1 — опытные, 2 — контрольные, 3 — интактные.

данных групп был исследован клеточный иммунный ответ на Т-зависимый антиген — эритроциты барана.

Уровень реакции ГЗТ в опытной группе достоверно не отличался от такового в контрольной и интактной группах. Таким образом, нами не выявлено достоверного изменения клеточного иммунного ответа на стандартный антиген при условии, что на введение самих активированных клеток иммунный ответ развивался (табл. 2).

Известно, что в результате вакцинации антиген-специфическими клетками при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите происходит увеличение продукции IgG к исследуемому антигену [4, 6]. Поскольку в литературе нет данных об изменении гуморального иммунного ответа при введении сингенных активированных клеток, далее исследовали гуморальный иммунный ответ на эритроциты барана у аналогичных групп мышей. В первой серии опытов не было выявлено достоверного изменения числа

Таблица 2. Уровень реакции ГЗТ на эритроциты барана и число АОК ( $\times 10^6$ ) в селезенке ( $M \pm m$ )

Исследуемый параметр	n	Группа 1	Группа 2	Группа 3
ГЗТ, %	25	$44,5 \pm 2,7$	$39,3 \pm 3,5$	$47,3 \pm 3,3$
АОК				
опыт 1	10	$37\,563 \pm 4761,35$	$37\,515,1 \pm 8366,77$	$16\,008 \pm 5122,1$
опыт 2	5	$13\,737 \pm 3146,12^*$	$5742,8 \pm 1296,24$	$2908,8 \pm 542,65$
опыт 3	10	$14\,308,7 \pm 2535,73^{*#}$	$6193,4 \pm 1234,95$	$6797,2 \pm 1334,85$

\*  $p < 0,05$  между опытной и контрольной группами.

#  $p < 0,05$  между опытной и интактной группами.

АОК у мышей опытной группы по сравнению с контрольной и интактной группами. В следующей серии опытов полученные результаты свидетельствовали о достоверном увеличении числа АОК у мышей в опытной группе по сравнению с интактной, т. е. о стимуляции гуморального иммунного ответа (см. табл. 2). Возможно, результаты второй серии опытов связаны с низким ответом в интактной группе. Важно отметить, что эксперименты проводили в разные сезоны (весна, осень). Таким образом, пока нельзя сделать однозначного заключения об изменении гуморального иммунного ответа при введении активированных клеток, это требует дальнейшего изучения.

Таким образом, существование иммунного ответа, направленного против сингенных клеток, активированных митогеном, было показано для мышей линии DBA/2 и гибридов первого поколения (C57BL/6 × DBA/2)F1. Не исключено существование такой закономерности и у других линий мышей, что требует дальнейшего изучения.

Поскольку введение активированных клеток не изменяет течение нормального клеточного иммунного ответа, существует возможность применения активированных клеток для коррекции аутоиммунной патологии как в экспериментальной модели, так и в клинике.

Интерес для дальнейшего исследования представляет изучение действия активированных клеток на модели хронической РТПХ, приводящей к развитию Th1 и Th2 патологии, как модели аутоиммунного состояния.

### **Заключение**

Иммунизация мышей сингенными селезеночными клетками, стимулированными ConA, приводит к развитию реакции ГЗТ на введение только ConA-активированных клеток. Эти результаты можно рассматривать как проявление антиэрготипического ответа. Поскольку антиэрготипический ответ может контролировать аутоиммунитет не только как компонент антиидиотипического ответа, вероятно эффективность применения вакцинации поликлонально активированными клетками для лечения иммунопатологических состояний. С точки зрения создания клеточных технологий лечения болезней на основе иммунизации активированными Т-клетками важно, что такая иммунизация, видимо, не нарушает ответа на чужеродные антигены.



**Библиографический список**

1. Cohen I.R., Francisco J., Mimran A. // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 1227–1232.
2. Correale J., Rojany M., Weiner L.P. // *J. Neuroimmunol.* — 1997. — Vol. 80. — P. 47–64.
3. Cunningham A.J. // *Nature.* — 1965. — Vol. 207. — P. 1106–1107.
4. Herkel J., Brunner S., Meyer zum Buschenfelde K.H., Lohse A. // *J. Autoimmunity.* — 1997. — Vol. 10. — P. 137–146.
5. Kumar V. // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114. — P. 1222–1226.
6. Li X., Wang Y., Wang Y. et al. // *Immunology.* — 2004. — Vol. 113. — P. 44–56.
7. Lohse A., Mor F., Karin N., Cohen I.R. // *Science.* — 1989. — Vol. 244. — P. 820–822.
8. Lohse A., Spahn T., Wolfel T. et al. // *Int. Immunol.* — 1993. — Vol. 5, N 5. — P. 533–539.
9. Mimran A., Mor F., Carmi P. et al. // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 113. — P. 924–932.
10. Mimran A., Mor F., Quintana F.J., Cohen I.R. // *J. Autoimmunity.* — 2005. — Vol. 24. — P. 191–201.
11. Quintana F.J., Cohen I.R. // *Scand. J. Immunol.* — 2006. — Vol. 64. — P. 205–210.
12. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T. et al. // *Immunology.* — 1979. — Vol. 38, N 3. — P. 577–583.