
УДК 612.112.94.017.1:612.6.051-083

Ключевые слова: смешанная культура лимфоцитов, пролиферативный ответ, тимозин, преинкубация клеток *in vitro*.

Г. З. Шубинский, О. Т. Кудаева, член-корр.
АМН СССР В. П. Лозовой

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ОТ РАЗНЫХ ПАР ДОНОРОВ В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

НИИ клинической иммунологии (дир. — член-корр. АМН СССР В. П. Лозовой) СО АМН СССР, г. Новосибирск

Смешанная культура лимфоцитов (СКЛ) является широко используемым методом изучения функциональных свойств иммунокомпетентных клеток человека. Известно, что уровень пролиферативного ответа в СКЛ характеризуется выраженной индивидуальной вариабельностью [9]—явлением малоизученным и связываемым обычно со степенью различия клеток-партнеров по HLA-антигенам. Однако весьма вероятным является участие в детерминации интенсивности пролиферативного ответа в СКЛ спонтанных клеток-регуляторов [4].

В настоящей работе предпринята попытка проанализировать причины различий в интенсивности пролиферативного ответа клеток в СКЛ. Для этого исследован прежде всего пролиферативный ответ лимфоцитов в двунаправленной СКЛ (дСКЛ) при разных соотношениях клеток-партнеров. Изучены также попарно в сравнении СКЛ, в которых клетки-партнеры от двух доноров являются по очереди респондерами и стимуляторами. Кроме того, в данной работе проанализировано влияние на пролиферативный ответ в СКЛ факторов, модулирующих функциональные свойства лимфоцитов человека (преинкубация лимфоцитов *in vitro*; добавление тимозина).

Методика исследования. Выделение моноклеарных клеток (МК) осуществляли центрифугированием гепаринизированной ве-

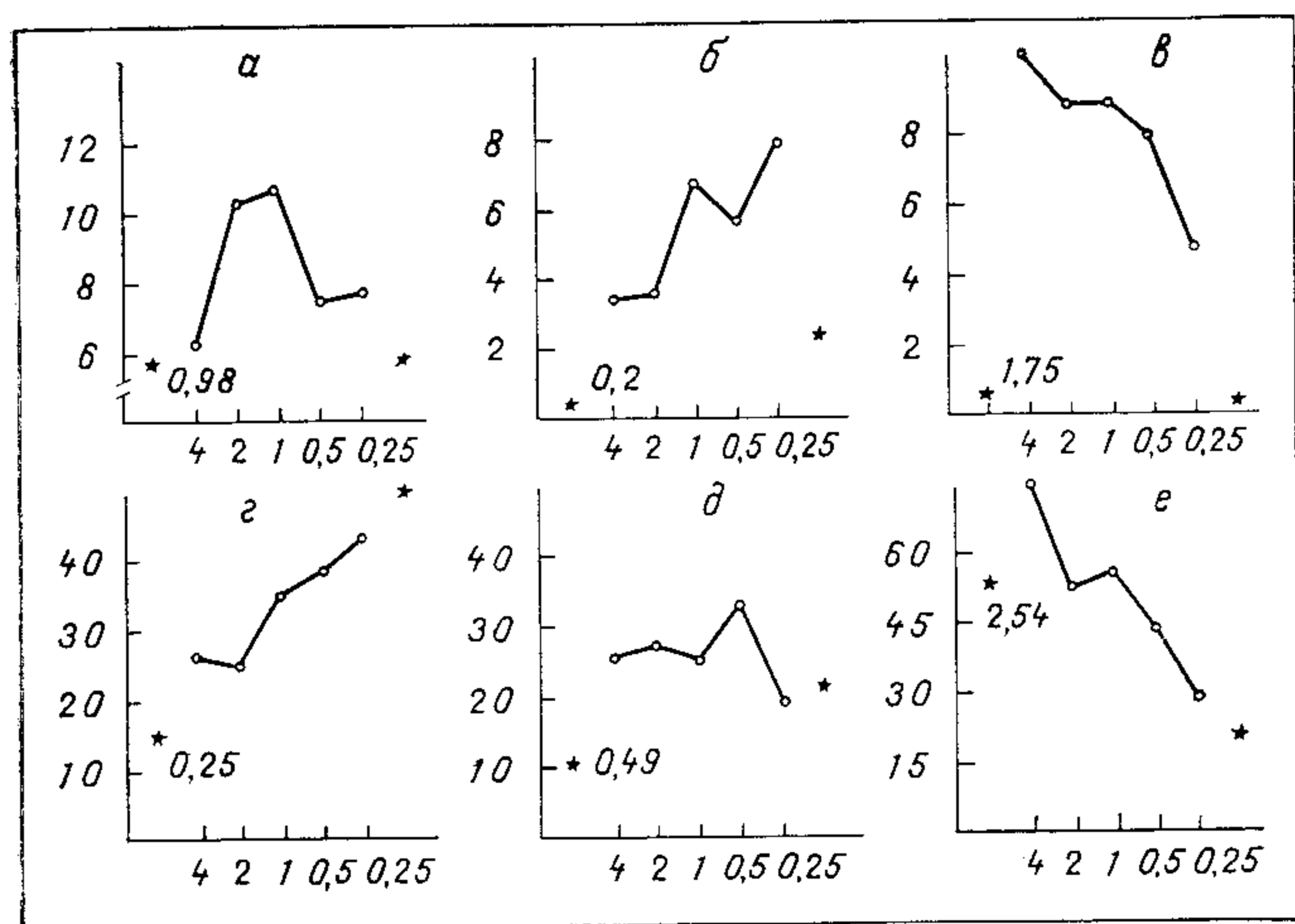


Рис. 1. Проллиферативный ответ лимфоцитов в СКЛ.

На рисунке представлены результаты 6 экспериментов (6 пар доноров).

По оси абсцисс — отношения количества клеток одного донора (А) к количеству клеток второго донора (Б) в дСКЛ; по оси ординат — интенсивность пролиферативного ответа в СКЛ (в имп/мин $\times 10^{-3}$). Звездочками отмечены значения пролиферативного ответа в оСКЛ: слева — ответ клеток донора А (респондеры) против обработанных митомицином С клеток донора Б (стимуляторы), справа — ответ клеток донора Б против клеток донора А. Отношение ответа в оСКЛ (А против Б) к ответу в оСКЛ (Б против А) отмечено численно слева.

а) А — донор 1, Б — донор 2; б) соответственно доноры 1 и 3; в) доноры 2 и 3); г) доноры 4 и 5; д) доноры 4 и 6; е) доноры 5 и 6.

нозной крови здоровых людей (доноров) в градиенте плотности фикола-верографина [1].

В работе использовали макро- и микромодификации метода дСКЛ. В первом случае сепарированные МК от двух разных доноров культивировали так, как описано ранее [4]. При использовании микромодификации метода СКЛ мононуклеары культивировали в лунках планшетов для иммунологических исследований (производство Ленинградского завода медполимеров) в культуральной среде, состоящей из 80% среды RPMI-1640 («Serva

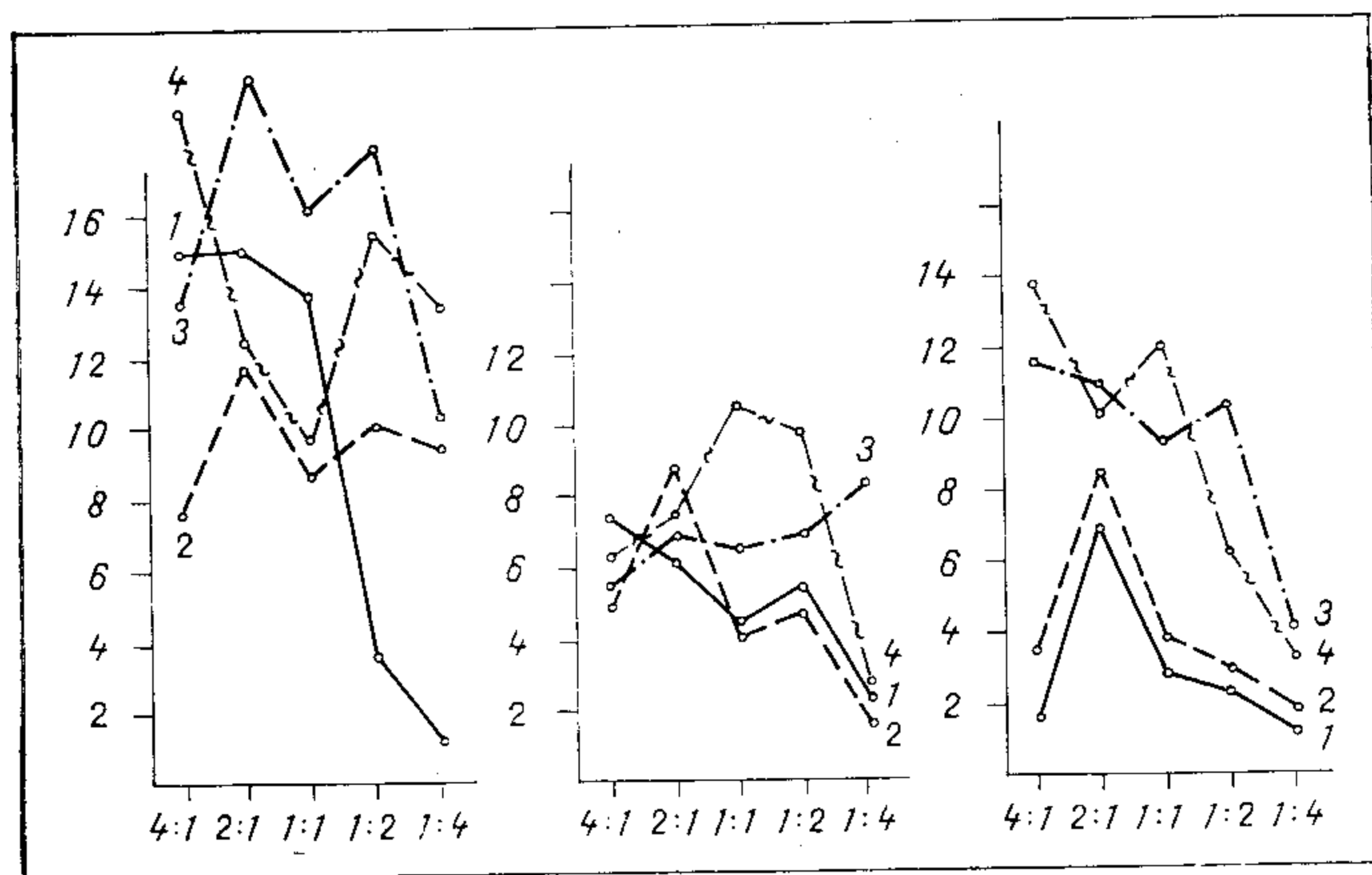


Рис. 2. Влияние тимозина на пролиферативный ответ лимфоцитов в дСКЛ (макро-модификация).

Представлены результаты трех экспериментов. По оси абсцисс — соотношения клеток доноров-партнеров в СКЛ; по оси ординат — интенсивность пролиферативного ответа (в имп/мин $\cdot 10^{-3}$). 1—4 — концентрация тимозина 0 (контроль) 0,1, 0,3 и 1 мг/мл соответственно. Общее количество клеток $1 \cdot 10^6$ в 1 мл в каждом культуральном флаконе.

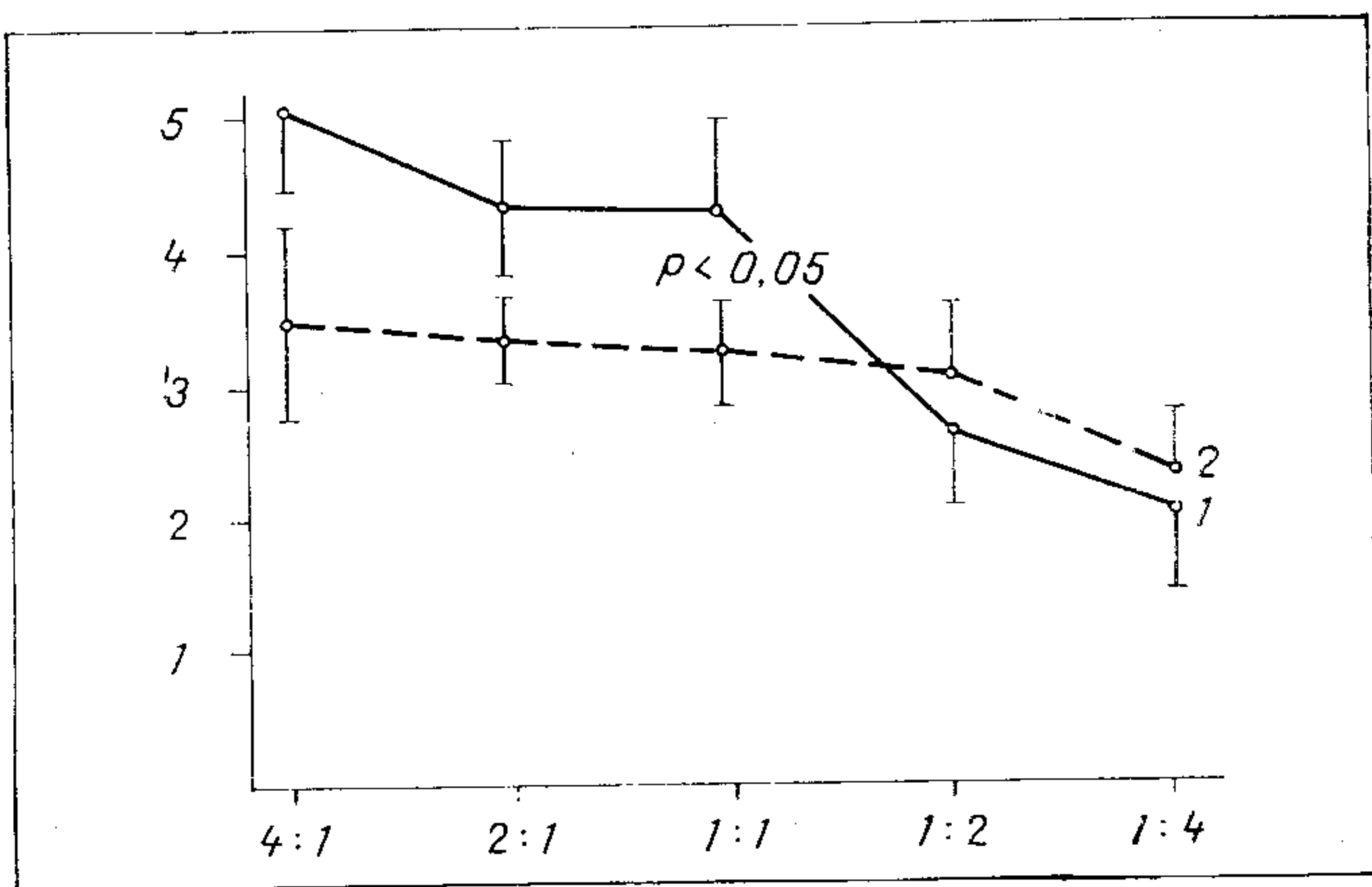


Рис. 3. Влияние преинкубации лимфоцитов на интенсивность пролиферативного ответа в дСКЛ (макро-модификация).

По оси абсцисс — соотношения клеток от доноров-партнеров в СКЛ. Общее количество клеток — $1 \cdot 10^6$ в 1 мл в каждом культуральном флаконе. По оси ординат — интенсивность пролиферативного ответа (в имп/мин $\cdot 10^{-3}$) 1 и 2 — соответственно пролиферативный ответ свежесыведенных и преинкубированных клеток; P — достоверность различий между ответами свежесыведенных и преинкубированных клеток (T -парный критерий Вилкоксона).

Feinbiochemica GmbH», ФРГ), 20% сыворотки человека группы IV(AB), инактивированной прогреванием, и антибиотиков (пенициллина — 100 ЕД/мл, стрептомицина — 100 мкг/мл), и в углекисло-воздушной атмосфере (5% CO_2). Общее количество клеток в дСКЛ составляло $0,2 \cdot 10^6$ МК в 0,15 мл культуральной среды в каждой лунке. Количество отвечающих и стимулирующих клеток в однонаправленной СКЛ (оСКЛ) составляло по $0,1 \cdot 10^6$ МК в каждой лунке. Стимулирующие клетки предварительно обрабатывали митомицином С в дозе 30 мкг/мл в течение 40 мин («Serva Feinbiochemica GmbH», ФРГ). Интенсивность пролиферации в СКЛ оценивали на 5-е сутки культивирования радиометрически по включению ^3H -тимидина в нуклеопротеидные фракции клеток. Преинкубацию клеток осуществляли так, как описано ранее [4]. Тимозин (IV или фракция экстракта тимуса теленка), полученный по методу [6], добавляли в СКЛ в начале культивирования в дозах 0,1, 0,3 и 1 мг/мл.

Результаты исследования. При анализе пролиферативного ответа клеток в дСКЛ установлено, что наибольшая интенсивность пролиферации достигается, как правило, в культурах, содержащих неравные количества МК доноров-партнеров (рис. 1, б—е; рис. 2). Разные показатели пролиферативного ответа получены в оСКЛ, содержащих лимфоциты от одной пары доноров, но выполняющих попеременно функции респондеров и стимуляторов (см. рис. 1). При сравнении пролиферативной активности клеток от одной пары доноров установлено, что пик пролиферации в дСКЛ наблюдается исключительно в культурах, содержащих в избытке те лимфоциты, использование которых в оСКЛ в качестве респондеров обеспечивает более выраженный ответ (чем в случае

отвечающих клеток, представленных их лимфоцитами—партнерами по СКЛ). Таким образом, лимфоциты разных доноров обладают различной пролиферативной активностью в СКЛ, причем как в одно-, так и в двунаправленной СКЛ, как правило, выявляется преобладание функциональной активности клеток одного из двух доноров-партнеров.

Известно, что экстракт тимуса в культуре *in vitro* изменяет функциональные свойства лимфоцитов [8]. Нами было исследовано влияние тимозина на пролиферативный ответ в дСКЛ при разных соотношениях клеток-партнеров. Установлено, что тимусный экстракт в концентрациях 0,3 и 1 мг/мл усиливает пролиферацию клеток, причем главным образом в культурах с низким уровнем исходного (контрольного) ответа. Вследствие этого происходит выравнивание первоначально асимметричной кривой зависимости интенсивности пролиферации от соотношения клеток-партнеров в СКЛ. Иными словами, тимозин усиливает активность клеток, обладающих низким исходным пролиферативным потенциалом.

Ранее выполненными исследованиями было показано, что преинкубация лимфоцитов человека в течение 18 ч в культуре *in vitro* сопровождается изменениями в активности клеток-регуляторов пролиферации. Одним из наиболее вероятных механизмов эффекта преинкубации является дифференцировка молодых посттимических прекурсорных Т-клеток в зрелые лимфоциты с иными функциональными свойствами [3, 7]. Преинкубация МК перед испытанием их в дСКЛ сопровождается (так же как и при добавлении тимозина) выравниванием кривой зависимости интенсивности пролиферации от соотношения клеток-партнеров (рис. 3). Однако выравнивание достигается (в отличие от действия тимозина) путем снижения интенсивности исходной пролиферации в культурах с наиболее выраженным начальным ответом.

Полученные факты свидетельствуют о том, что интенсивность пролиферативного ответа в СКЛ определяется не только различиями между клетками по HLA-антигенам, но и функциональными свойствами лимфоцитов каждого из доноров-партнеров. При этом клетки одного из них более активны в качестве отвечающих лимфоцитов. Отметим, что описанные различия в интенсивности ответа не могут, вероятно, объясняться только индивидуальными колебаниями в количестве стимулирующих (В-лимфоциты, моноциты) и отвечающих (Т-лимфоциты) клеток, поскольку даже при выраженном изменении в соотношении клеток-партнеров в дСКЛ (от 1 : 1 до 19 : 1) пролиферативный ответ, как было показано ранее, сравним по интенсивности [5]. Несомненно, что изменения в количественном содержании и соотношении респондеров и стимуляторов в данной экспериментальной системе значительно превышает максимально возможную вариабельность в соотношении Т- и В-клеток в периферической крови человека. Про-

веденными исследованиями также показано, что экспериментальные воздействия, влияющие на активность клеток-регуляторов (преинкубация, тимозин), изменяют интенсивность пролиферации и выравнивают активность лимфоцитов-партнеров в СКЛ. Можно, следовательно, предположить, что в детерминации интенсивности пролиферативного ответа участвуют спонтанные (т. е. неиндуцированные) хелперные и (или) супрессорные клетки. Необходимо отметить, что тимозин и преинкубация оказывают противоположное действие на интенсивность пролиферативного ответа в дСКЛ. Этот факт подтверждает ранее выявленное антагонистическое влияние указанных экспериментальных воздействий на активность неспецифических спонтанных супрессорных клеток [2, 10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Хейфец Б. Б., Абалакин В. А. — Лаб. дело, 1973, № 10, с. 579.
2. Шергин С. М., Шубинский Г. З., Лозовой В. П. — Иммунология, 1980, № 2, с. 34.
3. Шубинский Г. З. Функциональные свойства Т-лимфоцитов человека в норме и у больных хроническим лимфолейкозом. Автореф. дис. канд. Новосибирск, 1982.
4. Шубинский Г. З., Лозовой В. П. — Докл. АН СССР, 1980, т. 253, с. 753.
5. Шубинский Г. З., Шергин С. М., Кудяева О. Т. — В кн.: Современные аспекты физиологии, адаптации и патологии. Новосибирск, 1979, с. 54.
6. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. B. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 249, p. 125.
7. Palacios R., Alarcon-Segovia D., Llorente L. et al. — Immunology, 1981, v. 42, p. 127.
8. Rotter V., Fink A., Trainin N. — Cell. Immunol., 1978, v. 36, p. 242.
9. Schafer L. A., Goldstein A. L., Gutterman J. U. et al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1976, v. 274, p. 609.
10. Wolf R. E. — J. clin. Invest., 1979, v. 63, p. 677.

Поступила 21.03.83

COMPARATIVE STUDY OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF HUMAN LYMPHOCYTES OBTAINED FROM DIFFERENT PAIRS OF DONORS IN MIXED LYMPHOCYTE CULTURE IN VITRO

G. Z. Shubinsky, O. T. Kudaeva, V. P. Lozovoy

Research Institute of Immunology, Ministry of Health of the USSR, Moscow

The proliferative response of human lymphocytes was studied in one-way and two-way mixed lymphocyte cultures (MLC). The maximal proliferation was shown to be attained in a two-way MLC containing unequal quantities of the cells from two paired donors. It was also demonstrated in a one-way MLC that the cells of one of the two paired donors are more effective responders. The most powerful proliferation in the MLC of these donors was observed in the cultures containing the excess of more effective cells. Thymosine increased the response of human lymphocytes in the two-way MLC. *In vitro* cell preincubation reduced the response in the cultures with a high proliferative response in the control. It has been thus demonstrated that lymphocytes from paired donors possess different functional activity in the MLC.