

ВЛИЯНИЕ Breg И IL-10 НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Гаврилова М.В., Снегирева Н.А., Сидорова Е.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Резюме. Breg угнетают патологические процессы при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Регуляторные функции Breg обусловлены в основном секрецией IL-10. Роль Breg в гуморальном иммунном ответе не изучалась. В данной работе было исследовано влияние IL-10 и Breg при иммунном ответе В1- и В2-клеток мыши на Т-зависимые и Т-независимые антигены в модельной системе *in vitro*. В качестве Т-зависимого антигена использовали водорастворимый антиген бараньих эритроцитов, Т-независимого антигена 1 типа – LPS, Т-независимых антигенов 2 типа поливинилпирролидон и $\alpha(1\rightarrow3)$ декстран. В1- и В2-лимфоциты были выделены из клеток перитонеальной полости и селезенки мышей линии СВА соответственно. Клетки культивировались в среде RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками с антигенами, IL-10 и без них. Число антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток определяли методом ELISPOT.

Под действием водорастворимого антигена бараньих эритроцитов число антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток в культурах В1- и В2-лимфоцитов возрастало. Добавление IL-10 приводило к снижению числа антителопродукторов в среднем на 27%. IL-10 снижал также число индуцированных LPS антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток в культуре В2-лимфоцитов на 75%. Под действием IL-10 в культуре В1-клеток, активированных Т-независимыми антигенами 2 типа, число антителопродукторов уменьшалось в среднем на 50%.

Для изучения функциональной активности Breg выделяли из клеток перитонеальной полости и селезенки мышей линии СВА. Количество Breg после активации В-клеток LPS, иономицином и форболовым эфиром возрастало в 20 раз (с 4 до 96%). Основным изотипом иммуноглобулинов, секретируемых Breg, являлся IgM. При чистоте Breg 96% иммуноглобулины секретируют ~12% этих клеток. Это означает, что некоторая часть Breg одновременно синтезирует иммуноглобулины и IL-10.

Получение высокоочищенных Breg и использование трансвеллов позволило исследовать бесконтактное влияние Breg на иммунный ответ в культуре спленоцитов хид-мышей линии СВА/Н. Было установлено, что как специфический, так и поликлональный ответ в культуре этих клеток на водорастворимый антиген бараньих эритроцитов Breg угнетали. Таким образом, Breg участвуют в гуморальном иммунном ответе, подавляя функциональную активность спленоцитов мышей линии СВА/Н на Т-зависимый антиген. Очевидно, что существенную роль в этом играет секретируемый Breg IL-10.

Ключевые слова: Breg, IL-10, индукция иммунного ответа *in vitro*, антителопродукторы, антигены, В1-лимфоциты

Адрес для переписки:

Гаврилова Марина Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
115533, Россия, Москва, Нагатинская наб., 18, кв. 90.
Тел.: 8 (499) 618-49-93; (495) 674-08-42.
E-mail: gavrilovamv@gmail.com

Address for correspondence:

Gavrilova Marina V.
I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
115533, Russian Federation, Moscow,
Nagatinskaya emb., 18, apt 90.
Phone: 7 (499) 618-49-93; (495) 674-08-42.
E-mail: gavrilovamv@gmail.com

Образец цитирования:

М.В. Гаврилова, Н.А. Снегирева, Е.В. Сидорова
«Влияние Breg и IL-10 на гуморальный иммунный ответ»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 331-338.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-331-338

© Гаврилова М.В. и соавт., 2016

For citation:

M.V. Gavrilova, N.A. Snegireva, E.V. Sidorova "Influence of Breg and IL-10 upon humoral immune response", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 331-338. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-331-338

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-331-338>

INFLUENCE OF Breg AND IL-10 UPON HUMORAL IMMUNE RESPONSE

Gavrilova M.V., Snegireva N.A., Sidorova E.V.

I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. B regulatory cells (Bregs) are shown to downregulate autoimmune and inflammation processes. Their modifying effects depend on IL-10 secretion. A role of Bregs in development of humoral immune response was not investigated. Influence of Bregs and IL-10 upon *in vitro* response of murine B1 and B2 cells to T-dependent and T-independent antigens was studied in a model system. A water-soluble sheep erythrocyte antigen was used as a T-dependent antigen, whereas LPS was applied as a type 1 T-independent antigen, and polyvinylpyrrolidone and alpha(1→3)dextran were added as type 2 T-independent antigens. B1 and B2 lymphocytes were isolated from, respectively, peritoneal cavity and spleen of CBA mice. The cells were cultured in RPMI1640 medium with 10% of FCS supplemented with appropriate antigens and IL-10. The numbers of antibody- and total Ig-forming cells were determined by ELISPOT method.

The erythrocyte antigen induced an increase of antibody- and total Ig-forming cell numbers in cultured B1 and B2 cell populations. IL-10 addition caused reduction of antibody- and total Ig-forming cells by 27%. Similarly, IL-10 caused a drop in antibody- and total Ig-forming cells in LPS-stimulated B2 cell cultures by 75%, as well as 50 per cent decrease in numbers of antibody-forming cells in B-1 cell cultures when induced by the type 2 T-independent antigens.

To assess functional activity of Bregs, the cells were isolated from peritoneal cavity and spleen of CBA mice. Total yields of Bregs were 20-fold increased upon activation of B cells with LPS, ionomycin and phorbol ester (from 4% to 96%). IgM was the main immunoglobulin isotype secreted by the Bregs. 96% of activated Bregs produced IL-10. About 12% of the cells were shown to produce immunoglobulins. This finding suggests that some of Bregs synthesize both IL-10 and immunoglobulins.

To study distant effect of Bregs upon immune response, the splenocyte culture of xid CBA/N mice were tested in Transwells with enriched Bregs. It was revealed that the Bregs caused inhibition of both specific and polyclonal immune response to the water-soluble sheep erythrocyte antigen. Hence, Bregs are shown to participate in humoral immune response, probably, by suppressing functional activity of splenocytes from CBA/N mice to T-dependent antigen. IL-10 secreted by Bregs may play a sufficient role in these regulatory effects.

Keywords: Bregs, IL-10, *in vitro* immune response induction, antibody producers, antigens, B1-lymphocytes

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-00512 А).

Введение

Основной функцией В-лимфоцитов является образование антител (АТ). Наряду с этим В-клетки участвуют в презентации антигенов (АГ), фагоцитозе, органогенезе лимфоидных органов и секреции цитокинов. В последние годы выяснилось, что В-клетки, как и Т-лимфоциты, обладают еще и регуляторными функциями.

Впервые регуляторные функции В-клеток были обнаружены Janeway С.А. et al. [12]. На модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у мышей было показано, что В-клетки участвуют в подавлении острого аутоиммунного процесса. Позднее было установлено, что выздоровление мышей обеспечивается продуцируемым регуляторными В-клетками (Breg) IL-10 [5].

Существует ряд обладающих регуляторными функциями популяций В-клеток: Breg, Br1 и Br3.

Эти субпопуляции появляются при разных формах воспалительных и аутоиммунных процессов и отличаются по фенотипу [9]. Классификация Breg проведена по аналогии с классификацией Treg. Следует подчеркнуть, что ясности в этом вопросе пока нет.

Как уже говорилось, регуляторные функции Breg обусловлены в основном IL-10. Главным источником IL-10 являются Breg селезенки и брюшной полости. Они обладают уникальным фенотипом – CD1d^{hi}CD5⁺CD19^{hi} и продуцируют исключительно IL-10. Эту субпопуляцию регуляторных В-клеток предложено обозначать B10 [4].

Иммунорегуляторные свойства IL-10 обусловлены его способностью угнетать презентацию АГ, продукцию провоспалительных цитокинов, пролиферацию Т-лимфоцитов и функции некоторых других клеток [2, 4]. Влияние IL-10 на гуморальный иммунный ответ изучено недостаточно.

Вместе с тем изучение свойств и функций Breg является одной из первоочередных задач современной иммунологии и медицины. Вопросы в этой области значительно больше, чем

ответов. Так до сих пор не установлено, есть ли Breg в норме или они возникают под влиянием патологических или антигенных стимулов. Каков механизм их возникновения? Каково их происхождение? Являются ли они новой субпопуляцией В-лимфоцитов или возникают из В1- или В2-клеток? Обладают ли Breg АГ специфичностью? Неизвестно, как влияет IL-10 на ответ разных субпопуляций В-клеток на Т-зависимые и Т-независимые АГ (Т3 и ТН АГ соответственно). Не разработаны и экспериментальные модели, позволяющие непосредственно изучать сами эти клетки.

Ранее нами была разработана модельная система, позволяющая использовать относительно небольшие количества В1-лимфоцитов для изучения их взаимодействий с другими клетками *in vitro* [3]. В настоящей работе такая модельная система использовалась для изучения влияния IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-клеток мыши на Т3 АГ и ТН АГ 1-го и 2-го типов (ТН-1 и ТН-2 АГ соответственно) и функциональной активности Breg, выделенных из брюшной полости и селезенки мышей СВА.

Материалы и методы

Животные и антигены

В опытах использовали самок мышей линии СВА весом 16–18 г, полученных из питомника «Андреевка», и хид-мышей линии СВА/Н, любезно предоставленных д-ром Т.К. Кондратьевой (ФГБНУ «ЦНИИТ», Москва) и поддерживаемых в виварии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова».

В качестве Т3 АГ использовали водорастворимый антиген бараньих эритроцитов (ВРА-БЭ) [11], ТН-1 АГ липополисахарид *Escherichia coli* серотип 0111: В4 (LPS) (Sigma), ТН-2 АГ — $\alpha(1\rightarrow3)$ декстран *L. mesenteroides* (Декс) и поливинилпирролидон 350 кДа (ПВП) (Sigma). Т3 АГ вносили в культуры клеток в дозе 25 мкг/мл, ТН-1 АГ — 1 нг/мл и ТН-2 АГ — 10 нг/мл.

Клеточные субпопуляции

Для выделения В-клеточных субпопуляций использовали мышей линии СВА. В1-лимфоциты выделяли из клеток перитонеальной полости [1], В2-лимфоциты — из селезенки с использованием магнитных бус Dynabeads Mouse CD43 (Dyna, Норвегия). Breg выделяли из селезенки и перитонеальной полости мышей линии СВА с использованием Regulatory B cell isolation kit, согласно инструкции фирмы-производителя (Miltenyi Biotec). Вкратце: из клеток селезенки или перитонеальной полости выделяли тотальные В-лимфоциты с помощью иммуномагнитной сепарации. В-клетки (2,5 млн/мл) активировали 10 мкг/мл LPS 18–20 часов *in vitro*

в CO₂ инкубаторе при 37 °С. Затем к клеткам добавляли форбол-12-миристин-13-ацетат (РМА) 50 нг/мл и иономицин 500 нг/мл и продолжали инкубацию еще 5 часов. Активированные клетки вначале обрабатывали В cell catch reagent, а затем анти-IL-10 АГ, меченными фикоэритрином (PE). На заключительном этапе Breg выделяли при помощи магнитных бус, покрытых анти-PE АГ. В качестве контроля использовали В-клетки селезенки и перитонеальной полости, прошедшие все стадии получения Breg, за исключением добавления активаторов.

Проточная цитометрия

Фенотип и чистоту выделяемых В1- и В2-клеточных субпопуляций определяли методом проточной цитометрии. Использовали АГ к CD23 (В3В4) и CD3 (17А2), меченные FITC, АГ к CD19 (1D3) и CD5 (53-7.3), меченные PE, и АГ к B220 (RA3-6B2), меченные PE-Cy5 (BD Pharmingen). Для блокировки Fc-рецепторов использовали АГ к CD16/CD32 (2.4G2) (BD Pharmingen).

Breg в культурах активированных и неактивированных перитонеальных клеток выявляли с помощью АГ к CD19 (1D3), меченных FITC (eBioscience) и АГ к IL-10, меченных PE (Miltenyi Biotec). Кроме того, Breg были окрашены АГ к CD5 (53-7.3), CD43 (S7), CD138 (281-2), CD1d (1B1), меченные PE (BD Pharmingen и eBioscience); АГ к CD11b (M1/70), CD23 (B3B4), меченные FITC (BD Pharmingen) и АГ к CD86 (RMMP-2), меченные PE (Caltag). Для определения мертвых клеток использовали пропидий йодид (Sigma). Проточную цитометрию проводили на Beckman Coulter EPICS XL; результаты анализировали с помощью SYSTEM II (Beckman COULTER, USA).

Культивирование клеток

Для создания необходимой плотности клеток в качестве «филлеров» использовали спленоциты мышей СВА/Н.

Для изучения влияния IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-клетки смешивали со спленоцитами мышей СВА/Н в соотношении 1:10 и культивировали в полной среде RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками в плоскодонных 96- и 24-луночных планшетах (Nunc, Дания) в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение 4-х дней в присутствии АГ, АГ и IL-10 (50 нг/мл) или без них.

Для отдельного культивирования Breg со спленоцитами мышей СВА/Н использовали 24-луночные плоскодонные планшеты (Nunc) с мембранными вставками Millicell (Millipore, США). В лунки вносили по 5×10^6 спленоцитов, а в мембранные вставки — по 1×10^6 Breg, после чего культивировали клетки в среде RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками.

Определение антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток

Функциональную активность В-лимфоцитов оценивали по числу АТ- и иммуноглобулин-образующих клеток (АОК и ИГОК соответственно) в культурах с ТЗ и ТН-1 АГ и без них с помощью клеточного иммуноферментного анализа (ELISPOT). Для определения АОК фильтры сенсибилизировали АГ и вносили по 100×10^3 клеток/лунку; для выявления ИГОК фильтры покрывали козьими АТ к иммуноглобулинам мыши (Invitrogen) и вносили в лунки по 10×10^3 клеток. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с 1% ЭТС в течение 12-18 часов в CO_2 -инкубаторе. После культивирования клетки из лунок удаляли и обрабатывали фильтры биотинилированными АТ к IgM мыши (Invitrogen) и стрептовидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Invitrogen). По окончании инкубации подсчитывали число АОК и ИГОК на фильтрах и пересчитывали их на 10^6 живых клеток [1].

Статистическая обработка результатов

Результаты экспериментов представлены в виде средних арифметических значений со стандартными отклонениями ($M \pm S$). Достоверность различий результатов между группами нормальных и иммунизированных животных исследовали при помощи дисперсионного анализа. Различия рассматривались как значимые при $p < 0,05$.

Результаты

Влияние IL-10 на иммунный ответ на ТЗ-АГ

IL-10 продуцируется Breg с фенотипическими характеристиками как В1-, так и В2-лимфоцитов [8]. Изучение его действия на сами эти клетки не проводилось. На первом этапе было исследовано влияние IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-клеток на ТЗ АГ – ВРАБЭ. Как и ожи-

далось, внесение ВРАБЭ в культуру клеток селезенки мышей линии СВА/N, а также в культуры, содержащие смеси этих клеток с В1- или В2-лимфоцитами мышей линии СВА, индуцировало иммунный ответ. В культурах спленоцитов число АОК и ИГОК возрастало (рис. 1А, Б). Одновременное внесение в культуры клеток ВРАБЭ и IL-10 (50 нг/мл) в большинстве случаев приводило к снижению количества АОК и ИГОК. Так, в культуре спленоцитов мышей линии СВА/N число АОК уменьшалось на 80%, а число ИГОК – на 50%. В смешанных культурах, содержащих В1- или В2-лимфоциты, количество АОК снижалось на 25 и 28%; а число ИГОК – на 33 и 23% соответственно. Таким образом, при ответе В1- и В2-клеток на ТЗ АГ IL-10 оказывал угнетающее действие. На жизнеспособность клеток в культурах добавление IL-10 практически не влияло.

Влияние IL-10 на иммунный ответ на ТН-1 АГ

На следующем этапе исследовали иммунный ответ В-лимфоцитов на ТН-1 АГ – LPS. Поскольку В1-клетки конститутивно синтезируют IL-10, количество которого под действием LPS увеличивается [2], и разграничить действие вносимого и эндогенного IL-10 сложно, в опытах использовали только В2-клетки. Как видно из рисунка 2, внесение LPS в культуры клеток приводило к образованию АОК и увеличению числа ИГОК. Добавление IL-10, как и при ответе на ТЗ АГ, снижало количество АОК и ИГОК. В культуре спленоцитов хид-мышей число АОК и ИГОК, индуцированных LPS, снижалось на 65 и 86%, а в смешанной культуре, содержащей В2-клетки мышей линии СВА, – на 73 и 76% соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что на иммунный ответ В2-лимфоцитов на LPS IL-10 оказывал угнетающее действие.

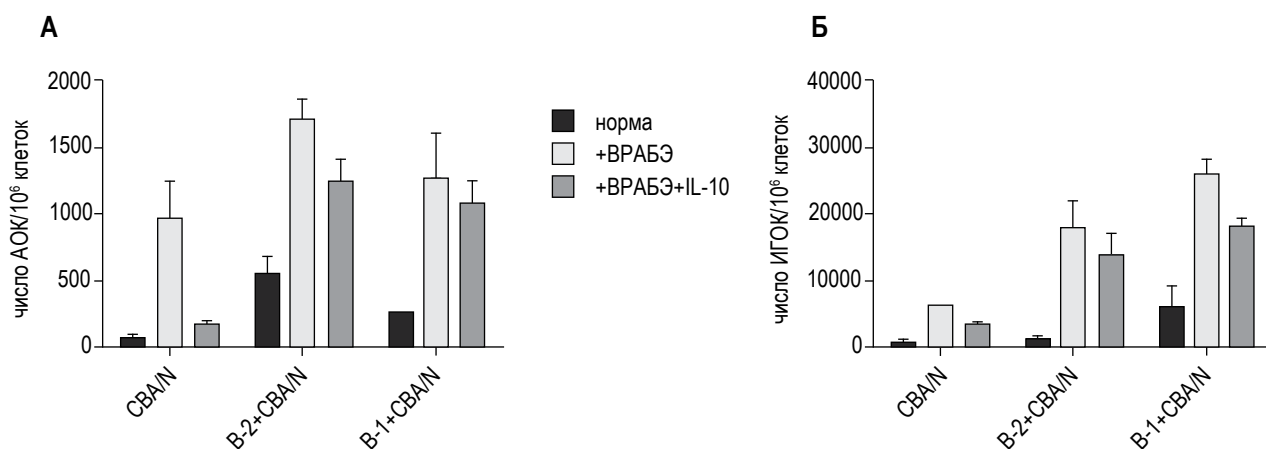


Рисунок 1. Влияние IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-лимфоцитов на ВРАБЭ в модельной системе *in vitro*: число АОК (А), число ИГОК (Б)

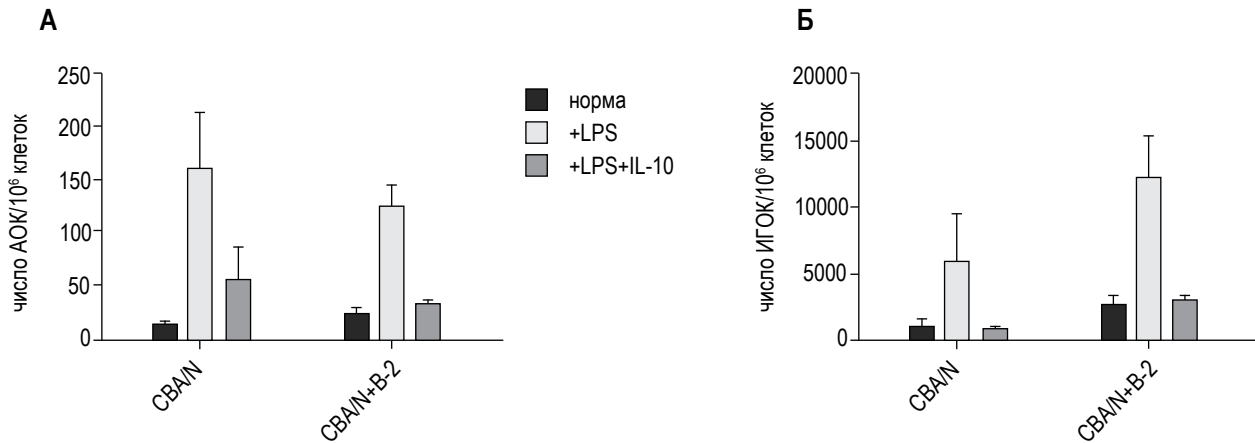


Рисунок 2. Влияние IL-10 на иммунный ответ на LPS в модельной системе *in vitro*: число АОК (А), число ИГОК (Б)

Влияние IL-10 на иммунный ответ на ТН-2 АГ

Иммунный ответ на ТН-2 АГ и влияние на него IL-10 исследовали в модельной системе, содержащей В1-лимфоциты мышей линии СВА.

Внесение ПВП (10 нг/мл) в культуру с В1-лимфоцитами индуцировало специфический и поликлональный иммунный ответ: число АОК возрастало примерно на 47%, а число ИГОК на 45%. Добавление IL-10 в культуры с ПВП снижало количества АОК и ИГОК ~ на 46 и 70% соответственно. Таким образом, IL-10 угнетал как специфический, так и поликлональный иммунный ответ В1-лимфоцитов на ПВП.

Внесение Декс (10 нг/мл) в культуру с В1-лимфоцитами также индуцировало специфический иммунный ответ: число АОК возрастало с $118 \pm 10/10^6$ до $251 \pm 30/10^6$ клеток. Число ИГОК под действием Декс возрастало не более чем на 20%. Внесение IL-10 снижало число АОК к Декс на 61%. На количество ИГОК добавление IL-10 в культуру практически не влияло.

Фенотип и функциональная активность Breg

Для изучения функциональной активности Breg и взаимодействия их с другими клетками необходимо выделять Breg в чистом виде. Для вы-

деления Breg использовали Regulatory B cell isolation kit (Miltenyi Biotec). К Breg при этом относили все В-клетки, продуцирующие IL-10. В В-лимфоцитах, выделенных из активированных клеток перитонеальной полости и селезенки мышей линии СВА, содержалось около 96% и 70% В-клеток, синтезирующих IL-10 соответственно; для неактивированных клеток этот показатель равнялся ~ 4% (рис. 3).

Для более детальной характеристики Breg определяли некоторые поверхностные маркеры активированных и контрольных (неактивированных) перитонеальных Breg. Breg, выделенные после активации, несли на своей поверхности CD5 – $42 \pm 1,4\%$; CD43 – $75 \pm 9\%$; CD11b – $59 \pm 1,4\%$; CD80 – $7 \pm 6\%$; CD86 – $66 \pm 14\%$; CD138 – $9,4 \pm 0,3\%$; CD1d – $86 \pm 11\%$; CD23 – $30 \pm 2\%$. Контрольные (неактивированные) Breg несли те же маркеры, однако количество клеток, экспрессирующих маркер CD86, не превышало $10 \pm 7\%$.

Принципиальный интерес представляет вопрос о том, продуцируют ли Breg одновременно АТ/ИГ (иммуноглобулины) и IL-10. Для решения этого вопроса мы исследовали образование ИГ выделенными Breg. В культурах контрольных

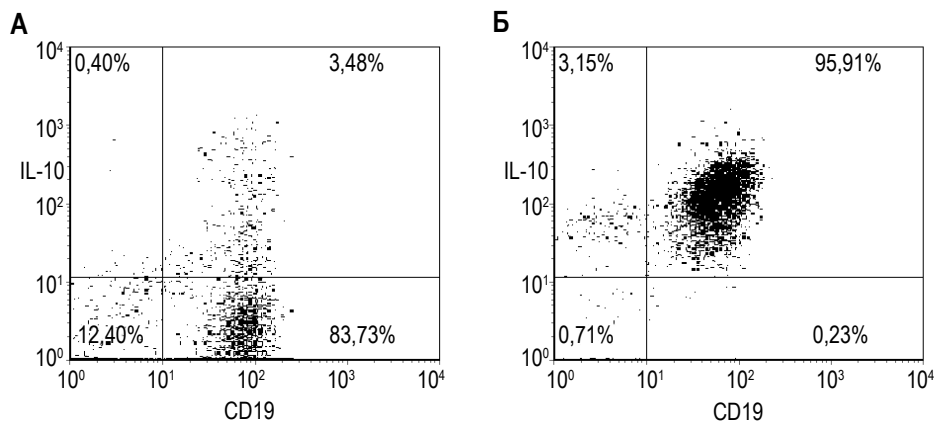


Рисунок 3. Breg, выделенные из культуры неактивированных (А) и активированных (Б) перитонеальных В-лимфоцитов мышей линии СВА

Врег содержалось 13359 ± 2295 IgM-продуцентов на млн клеток. В культурах активированных Врег выявлялось 125687 ± 23279 IgM-продуцентов на млн клеток, что составляло 12%, т.е. наблюдалось их увеличение в 9 раз. Наряду с этим возрастали количества IgG и IgA продуцентов (не менее чем в 2 раза). Чистота субпопуляции активированных Врег при этом равнялась 96%. Это позволяет заключить, что не менее 8% Врег одновременно синтезируют и ИГ и IL-10.

Влияние Врег на иммунный ответ на ВРАБЭ

Выделение Врег высокой чистоты позволило перейти к изучению влияния на гуморальный иммунный ответ самих этих клеток. В качестве модели был выбран ответ спленоцитов мышей линии СВА/N, содержащих фактически только В2-клетки. Поскольку Врег сами синтезируют большое количество ИГ, использовали раздельное культивирование Врег и спленоцитов мышей линии СВА/N (в трансвеллах). Спленоциты мышей СВА/N помещали в нижнюю, а Врег в верхнюю камеру. Клетки культивировали в течение 4-х суток в присутствии и в отсутствие ВРАБЭ и определяли содержание АОК и ИГОК в культурах. В качестве контроля использовали перитонеальные В-клетки мышей СВА, помещенные в верхнюю камеру, прошедшие все стадии получения Врег, за исключением добавления активаторов (контрольные В-клетки, Вконтр).

Полученные данные представлены на рисунке 4. Как видно из рисунка, внесение в верхнюю камеру контрольных В-лимфоцитов приводило к увеличению прироста числа АОК к ВРАБЭ в суспензии спленоцитов мышей линии СВА/N в 2 раза. На число ИГОК контрольные В-лимфоциты влияли незначительно. Напротив, культивирова-

ние Врег (верхняя камера) со спленоцитами мышей линии СВА/N приводило к снижению прироста числа АОК к ВРАБЭ ~ в 2,5 раза и ИГОК ~ в 5,6 раз. Таким образом, Врег угнетали специфический и поликлональный иммунный ответ на ВРАБЭ.

Обсуждение

В-клетки, обладающие регуляторными функциями, обнаруживаются при ряде воспалительных и аутоиммунных заболеваний [8], где их роль сводится в основном (хотя и не всегда) к угнетению патологических процессов. Роль Врег в гуморальном иммунитете практически не исследована. Строго говоря, вообще неизвестно, играют ли они в нем какую-либо роль.

Поскольку Врег экспрессируют маркер В-1а лимфоцитов CD5, можно предположить, что они представляют особую субпопуляцию В1-клеток, участвующих во врожденном иммунитете и регулирующих ответы на Т-независимые (ТН) бактериальные АГ. Косвенным указанием на это служит резкое увеличение количества Врег под влиянием LPS [7]. Исходя из этого, мы предположили, что наиболее удобной моделью для выявления роли Врег в гуморальном ответе является модель ответа на ТН АГ 1-го и 2-го типов. Поскольку регуляторная роль Врег в основном обусловлена выделяемым ими IL-10, в первую очередь следовало выяснить, влияет ли IL-10 на функциональную активность В1- и В2-клеток при ответе на ТН АГ и ТЗ АГ. Очевидно, что такого рода исследования удобно проводить в опытах *in vitro*.

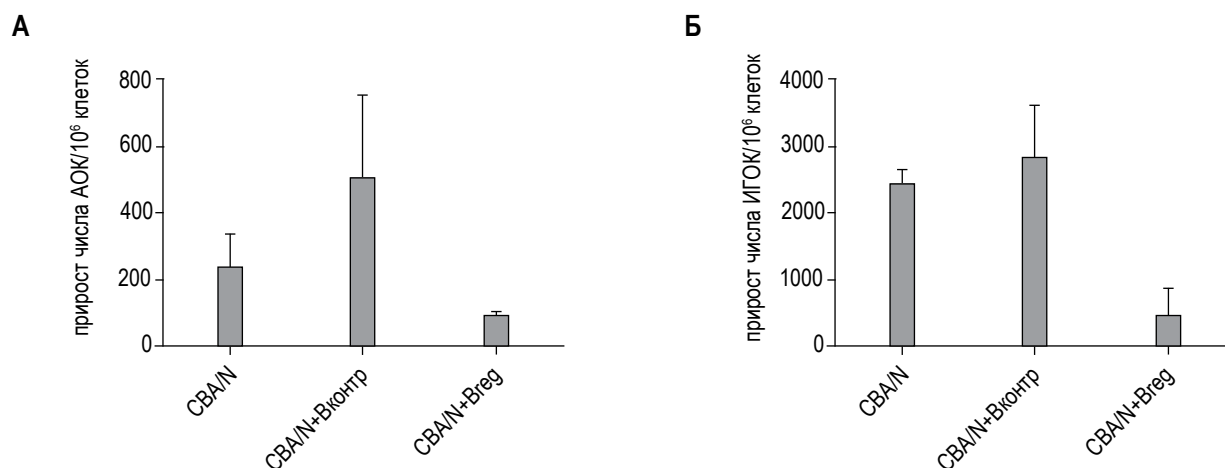


Рисунок 4. Влияние Врег на иммунный ответ на ВРАБЭ в культуре спленоцитов мышей линии СВА/N: прирост числа АОК (А), прирост числа ИГОК (Б)

Примечание. Прирост количеств АОК и ИГОК, индуцированный при внесении ВРАБЭ, рассчитывали как разность между их значениями в иммунных и нормальных культурах спленоцитов.

Ранее нами была разработана модельная система, в которой для создания оптимальной клеточной плотности в культурах используются спленоциты *xid*-мышей линии СВА/Н, не имеющих В1-клеток [3]. Это позволяет исследовать функциональную активность В1- и В2-лимфоцитов мышей конгенной линии СВА, определяя количество АОК и ИГОК, образуемых внесенными в культуры В1- и В2-клетками. Эта модельная система была использована в настоящих опытах.

Полученные в опытах с IL-10 данные свидетельствуют о том, что IL-10 угнетает образование АОК и ИГОК на Т3 АГ, как в культурах спленоцитов мышей линии СВА/Н, так и в смешанных культурах, содержащих В1- и В2-клетки мышей линии СВА. Жизнеспособность клеток под действием IL-10 не снижалась. Это говорит о том, что угнетение ответа не обусловлено гибелью клеток. Сильнее всего снижалось образование АОК и ИГОК в культурах спленоцитов мышей линии СВА/Н: на 80% и 50% для АОК и ИГОК соответственно. Поскольку в таких культурах присутствуют только В2-клетки, очевидно, что снижение числа АОК и ИГОК, индуцированных Т3 АГ, связано с действием IL-10 на В2-лимфоциты.

Эти результаты противоречат данным, полученным группой Mond J.J. [10], не выявившим угнетения Т3-ответа под влиянием IL-10. Различие скорее всего обусловлено тем, что группой Mond J.J. использовались тотальные В-клетки селезенки, а не В1- и В2-лимфоциты; кроме того, существенно различались и условия постановки опытов (авторы использовали сложную систему иммунного ответа *in vitro*, включающую наличие IL-5). В то же время данные опытов с субпопуляциями В-клеток подтвердили полученные ранее на тотальных В-спленоцитах результаты о влиянии IL-10 на иммунный ответ на ТН АГ [10].

Выявление влияния IL-10 на гуморальный ответ поставило вопрос о свойствах и функциональной активности самих Breg. В первую очередь следует понять, как возникают Breg. Можно ли любую В клетку «превратить» в Breg (продукт IL-10), активируя ее тем или иным способом, или в Breg превращаются только клетки, принадлежащие к особой субпопуляции В-лимфоцитов? В наших опытах число В-клеток, экспрессирующих маркер CD86, после активации повышалось примерно в 7 раз (с 10 до 66%); количества В-клеток, секретирующих IL-10, после активации возрастало более чем в 20 раз (с 4 до 96%). Эти данные могут свидетельствовать в пользу возможности превращения любой В-клетки в Breg. Однако, используемый способ активации не физиологичен, а применяемые нами для идентификации Breg критерии, безусловно, недостаточны для того, чтобы счи-

тать все активированные или секретирующие IL-10 клетки Breg. Более вероятно, что истинные Breg представляют лишь незначительную часть субпопуляции В-лимфоцитов, возникающую или активирующуюся под влиянием различных стимулов. Принципиально важен при этом вопрос о роли и специфичности ВСР. Вопрос нуждается в дальнейшем исследовании.

В связи с этим возникает следующий вопрос: синтезируют ли ИГ сами Breg и, если синтезируют, как это сочетается со способностью IL-10 угнетать их синтез? Наиболее простым являлось предположение о том, что ИГ и IL-10 секретируются разными клетками. Разработка способа выделения Breg позволила определить в них число ИГ-продуцентов. Оказалось, что при чистоте Breg 96% ИГ синтезируют не менее 12% этих клеток. Основным изотипом секретируемых ИГ является IgM. Если даже появление ИГОК обусловлено примесью остальных клеток (~ 4%), все равно остаются 8% Breg, одновременно продуцирующих ИГ и IL-10. Этот вывод, однако, не бесспорен, т.к. не показано, что ИГ-продуценты, отобранные по способности секретировать IL-10, продолжали его секретировать в момент определения синтеза ИГ. Не исключено, что эти процессы разделены во времени. Действительно, было показано, что регуляторные функции и синтез АГ Breg наблюдаются «со сдвигом по фазе» [6].

Изучая влияние IL-10 на гуморальный иммунный ответ, мы использовали дозу цитокина, существенно превышающую физиологическую. Очевидно, что значительно интереснее исследовать реальное взаимодействие Breg с ИГ-образующими клетками. Получение высокоочищенных Breg и использование трансвеллов позволило исследовать бесконтактное влияние Breg на специфический и поликлональный ответ на ВРАБЭ спленоцитов мышей линии СВА/Н, содержащих фактически только В2-популяцию лимфоцитов. В этих опытах выявились явные различия в действии Вконтр и Breg, помещаемых в верхнюю камеру, на ответ спленоцитов мышей линии СВА/Н, вносимых вместе с АГ в нижнюю камеру. Вконтр повышали специфический (~ в 2 раза), мало влияя на поликлональный ответ на ВРАБЭ. Напротив, Breg угнетали как специфический, так и поликлональный ответ спленоцитов мышей линии СВА/Н на ВРАБЭ.

Необходимо отметить, что не только «верхние» клетки влияют на «нижние», но и клетки, помещенные в верхнюю камеру, также могут отвечать и на АГ и на факторы, выделяемые клетками нижней камеры. Вопрос нуждается в отдельном исследовании.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что Breg участвуют в гуморальном

иммунном ответе, подавляя функциональную активность спленоцитов мышей линии СВА/Н на ВРАБЭ. Очевидно, что существенную роль в этом играет секретируемый Breg IL-10.

Выводы

1. IL-10 угнетает специфический и поликлональный ответ В1- и В2-клеток мыши на Т-зависимый и Т-независимые антигены в системе *in vitro*.

2. Breg, секретирующие IL-10, могут одновременно продуцировать иммуноглобулины, основная часть которых относится к изотипу IgM.

3. Breg при отдельном культивировании подавляют иммунный ответ на ВРАБЭ спленоцитов мышей линии СВА/Н *in vitro*.

Благодарности

С прискорбием сообщаем, что доктор биологических наук Екатерина Владимировна Сидорова скончалась 31 марта 2016 г. Она была бессменной заведующей лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов и данная работа была выполнена под ее непосредственным руководством.

Авторы благодарят И.Н. Чернышову за обсуждение и помощь при написании статьи.

Список литературы / References

1. Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Хоченков Д.А., Сидорова Е.В. Клеточные взаимодействия при ответе на Т-независимые антигены 2-го типа *in vitro* // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 4. С. 325-334. [Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Khochenkov D.A., Sidorova E.V. *In vitro* cellular interactions during immune response to T cellindependent type 2 antigens. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, Vol. 5, no. 4, pp. 325-334. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2013-4-325-334>
2. Bouaziz J.D., Yanaba K., Tedder T.F. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.*, 2008, Vol. 224, pp. 201-214.
3. Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Sidorova E.V. Model System for Studies of Cell Interactions and Mechanisms of Immune Response to T-Independent Antigens of Type 2 *in vitro*. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2010, Vol. 4, no. 4, pp. 321-326.
4. DiLillo D.J., Horikawa M., Tedder T.F. B-lymphocyte effector functions in health and disease. *Immunol. Res.*, 2011, Vol. 49, no. 1-3, pp. 281-292.
5. Fillatreau S., Sweeney C.H., McGeachy M.J., Gray D., Anderton S.M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 10, pp. 944-950.
6. Maseda D., Smith S.H., DiLillo D.J., Bryant J.M., Candando K.M., Weaver C.T., Tedder T.F. Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production *in vivo*. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 8, pp. 1036-1048.
7. Matsushita T., Tedder T.F. Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods Mol. Biol.*, 2011, Vol. 677, pp. 99-111.
8. Mauri C., Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012, Vol. 30, pp. 221-241.
9. Noh G., Lee J.H. Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2011, Vol. 3, no. 3, pp. 168-177.
10. Pecanha L.M.T., Snapper C.M., Lees A., Yamaguchi H., Mond J.J. IL-10 inhibits T cell-independent but not T cell-dependent responses *in vitro*. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 8, pp. 3215-3223.
11. Seman M., Mazie J.C., Bussard A.E. Antigen properties of water soluble fraction of sheep erythrocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1972, Vol. 2, no. 4, pp. 387-388.
12. Wolf S.D., Dittel B.N., Hardardottir F., Janeway C.A. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 184, no. 6, pp. 2271-2278.

Авторы:

Гаврилова М.В. — научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Снегирева Н.А. — научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Сидорова Е.В. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Gavrilova M.V., Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Snegireva N.A., Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Sidorova E.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.06.2016
Принята к печати 20.06.2016

Received 02.06.2016
Accepted 20.06.2016