

# РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-КЛЕТОК В ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА Т-НЕЗАВИСИМЫЕ АНТИГЕНЫ 2-ГО ТИПА

Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Сидорова Е.В.

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

**Резюме.** Исследована роль субпопуляций В-клеток в поликлональной активации В-лимфоцитов, индуцированной Т-независимыми антигенами 2-го типа (ТН-2 антигены). Из суспензий спленоцитов мышей, иммунизированных поливинилпирролидоном или  $\alpha(1\rightarrow3)$  декстраном, выделяли  $CD5^+B/B-1$ -клетки. Числа антитело- (АТ) и Ig-продуцентов определяли методом ELISPOT. Количество продуцентов неспецифических Ig рассчитывали по разности между количествами Ig- и АТ-продуцентов; число неспецифических Ig-продуцентов, индуцированных ТН-2 антигенами, вычисляли по разности между числами неспецифических Ig-продуцентов в опыте и контроле. В опытах с  $CD5^+$  и  $CD5^-$  субпопуляциями спленоцитов появление продуцентов АТ и увеличение числа клеток, синтезирующих неспецифические Ig, зависело от  $CD5^+$  В-клеток. Эти данные подтверждены определением количеств АТ и Ig-продуцентов в субпопуляциях, содержащих В-2- и В-1-лимфоциты (получены с помощью набора Dynal). Несмотря на значительное преобладание числа В-клеток в В-2 фракции (91% против ~13% в В-1 фракции) количества продуцентов АТ и индуцированных ТН-2 антигенами неспецифических Ig в обеих фракциях были примерно одинаковы. При расчете на  $10^6$  В-клеток фракция В-1 содержала в 6-7 раз больше клеток, синтезирующих АТ, и поликлонально активированных Ig-продуцентов, чем фракция В-2. Таким образом, как специфический, так и поликлональный иммунный ответ на поливинилпирролидон и декстран зависит, главным образом, от В-1-клеток. Одновременное введение двух ТН-2 антигенов не приводило к суммации числа клеток, продуцирующих индуцированные неспецифические Ig, несмотря на то, что введение каждого из этих антигенов порознь вызывало отчетливое увеличение количества этих клеток в В-1 фракции. Заключается, что поликлональная активация В-1-клеток ТН-2 антигенами рестриктирована. Рестрикция зависит либо от размера способного к активации пула В-1-клеток, либо от количества неспецифических стимулирующих факторов.

**Ключевые слова:** В-клетки, антитела, ТН-2 антигены, иммуноглобулины

Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Sidorova E.V.

## ROLE OF DIFFERENT B CELL SUBPOPULATIONS IN IMMUNE RESPONSE TO T-INDEPENDENT TYPE 2 ANTIGENS

**Abstract.** The role of different B-cell subpopulations in polyclonal B-cell activation induced by T-independent antigens type 2 (TI-2) was under studies.  $CD5^+B/B-1$  cells were isolated from the spleens of mice immunized with polyvinyl pyrrolidone, or  $\alpha(1\rightarrow3)$  dextran. The numbers of antibody (Ab) and Ig-producers in  $CD5^+B/B-1$  splenocytes were determined by ELISPOT. The number of cells producing unspecific Ig was calculated as a difference between the numbers of Ig- and Ab-producers; the numbers of nonspecific Ig-producing splenocytes induced by TI-2 immunization were determined as differences between their contents in immunized and control animals. In experiments with  $CD5^+$  and  $CD5^-$  splenocytic populations, the development of Ab-producers and increased numbers of cells producing unspecific Ig was dependent on the  $CD5^+$  B-cells. These data were confirmed in experiments with subpopulations of B-1 and B-2 lymphocytes obtained with Dynal separation kit. In spite of sufficient predominance of B-cells in B-2 fraction (91% vs ~13% in B-1 fraction), the numbers of Ab and TI-2-induced nonspecific Ig-producers were

### Адрес для переписки:

Гаврилова Марина Викторовна  
ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова  
115088, Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15  
Тел.: (495) 674-08-42  
Факс: (495) 674-57-10  
E-mail: Sidorova@bio.ru

nearly similar for the both cell fractions. Taking into account relative contents of B-cells, the numbers of Ab- and unspecific Ig- producers in B-1 fraction were 6- to 7-fold higher than in B-2 fraction. Thus, dependence on the B-1 cells exists both for polyclonal immune reactions to polyvinylpyrrolidone and dextran, and specific response. Simultaneous injection of two TI-2 antigens did not induce additive effects upon the numbers of unspecific Ig-producers in B-1 fraction, in spite of marked increase in amounts of these cells after separate immunization with either of these antigens. It is concluded that polyclonal activation of B-1 cells by TI-2 antigens is subject to restriction which may depend either on the size of B-cell pool available for activation, or on insufficiency of appropriate stimulating factors. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 1, pp 39-46)

## Введение

Введение антигена индуцирует не только появление антителообразующих клеток (АОК), но и увеличение числа клеток, образующих так называемые неспецифические иммуноглобулины (НИГОК). Увеличение числа НИГОК при введении Т-зависимых антигенов (ТЗ антигены) в основном обусловлено действием неспецифических стимулирующих Т-факторов; увеличение числа НИГОК под действием Т-независимых антигенов 1-го типа (ТН-1) зависит от внутренне присущей им митогенной активности; увеличение числа НИГОК под влиянием ТН-2 антигенов до сих пор не нашло объяснения. Не изучено влияние на этот процесс разных ТН-2 антигенов, не выяснена роль в нем различных клеточных популяций, не установлены механизмы, ответственные за наблюдаемую поликлональную активацию.

В настоящее время В-лимфоциты подразделяют на 4 субпопуляции: В-1a(CD5<sup>+</sup>), В-1b (CD5<sup>-</sup>), МZ-В и В-2 [3]. Известно, что в специфическом иммунном ответе на ТН-2 антигены в основном участвуют две субпопуляции В-лимфоцитов: В-1-клетки и В-лимфоциты маргинальной зоны селезенки (МZ-В клетки) [3, 9]. Следовало выяснить, каким субпопуляциям В-клеток принадлежит основная роль в поликлональной активации под действием ТН-2 антигенов: тем же самым, что и отвечающим за специфический иммунный ответ, т.е. В-1 и МZ-В клеткам, или В-2 лимфоцитам. С этой целью мышам BALB/c вводили различные ТН-2 антигены, порознь или в различных сочетаниях, и исследовали образование АОК и НИГОК в суспензиях тотальных и разделенных на субпопуляции В-клеток селезенки.

## Материалы и методы

### Животные, антигены, иммунизация

В опытах использовали мышей BALB/c, самок, 16-18 г весом, полученных из питомника «Столбовая» (Москва, Россия). В качестве ТН-2 антигенов использовали поливинилпирролидон с мол. массой 350 кДа (ПВП), альфа (1→3) декстран (Декс), полисахарид пневмококка (СПП) и фикоил (Фик); в качестве ТЗ антигена использовали водорастворимый антиген бараньих эритроцитов (ВРАБЭ), полученный по методу [13].

Мышей иммунизировали 2 мкг ТН-2 антигенов, вводимых внутривенно, порознь или совместно, или введением 50 мкг ВРАБЭ вместе с 2 мкг ПВП. Селезенку извлекали на 4 сутки после иммунизации и в моноклеточной суспензии спленоцитов методом ELISPOT определяли количества АОК и клеток, образующих иммуноглобулины (ИГОК). Число НИГОК на 10<sup>6</sup> спленоцитов рассчитывали по разности между количествами ИГОК и АОК; число индуцированных антигеном НИГОК (инНИГОК) определяли по разности между количествами НИГОК в иммунных и нормальных суспензиях спленоцитов.

Для определения числа АОК нитроцеллюлозные плашки (MAHAN4510, Millipore, USA) сенсибилизировали ТН-2 антигенами (10-50 мкг/лунку); для определения числа ИГОК плашки сенсибилизировали козьими антителами к иммуноглобулинам мыши (ICN, USA; 5 мкг/мл). Свободные места связывания блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Спленоциты интактных и иммунизированных мышей наносили на подготовленные таким образом фильтры (по 100×10<sup>3</sup> клеток/лунку для выявления АОК и по 10×10<sup>3</sup> клеток/лунку для выявления ИГОК) и культивировали в среде RPMI 1640 с 1% фетальной сыворотки и другими необходимыми добавками в течение 16 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. По окончании культивирования клетки из лунок удаляли и обрабатывали фильтры последовательно кроличьей антисывороткой к  $\mu$ -цепям мышинного IgM и пероксидазным конъюгатом бараньих антител к иммуноглобулинам кролика (усиливающая сыворотка и конъюгат получены в лаборатории). В качестве субстратного буфера использовали Трис-буфер pH 7.8, содержащий 1,4-хлорнафтол и перекись водорода. Реакция развивалась в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин и останавливалась добавлением воды. Единичные клетки, продуцирующие антитела и иммуноглобулины, выявлялись в виде синих пятен, подсчет которых проводили под микроскопом.

### Разделение спленоцитов на CD5<sup>+</sup> и CD5<sup>-</sup> В-клеточные фракции

Для разделения В-спленоцитов на субпопуляции использовали два подхода. В первом из них получали суспензии, обедненные и обога-

щенные  $CD5^+$  В-лимфоцитами, а во втором – фракцию, содержащую В-2 клетки, и фракцию, обогащенную В-1-клетками («В-1»). В первом случае суспензии клеток селезенки интактных и иммунных мышей после лизиса эритроцитов инкубировали с магнитными бусами panT (Thy1.2) (DynaL, Norway) на ротаторе при  $+4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин при соотношении бусы/клетки 4:1 и образующиеся розетки, содержащие Т-клетки, удаляли с помощью магнита. Не связавшиеся с бусами спленоциты обрабатывали 30 мин при  $+4^\circ\text{C}$  моноклональными крысиными антителами к  $CD5$  мыши (53-7.3, Pharmingen) и инкубировали 30 мин при  $+4^\circ\text{C}$  на ротаторе с магнитными бусами, содержащими антитела к крысиным IgG (DynaL). Образовавшиеся розетки отделяли на магните.

Разделение суспензии клеток селезенки на В-2 и «В-1» субпопуляции проводили при помощи набора (DynaL, Mouse B Cell Negative Isolation Kit) согласно инструкции фирмы. Суспензии клеток селезенки интактных и иммунных мышей обрабатывали 20 мин при  $+4^\circ\text{C}$  коктейлем крысиных антител к  $CD43$ ,  $CD4$  и Ter-119 мыши. Затем клетки отмывали и инкубировали с магнитными бусами, содержащими антитела к крысиным IgG, 15 мин при комнатной температуре на ротаторе. В результате получали свободную от магнитных бус В-2 клеточную популяцию и «В-1» клетки в виде розеток с магнитными бусами, содержащими также Т-клетки, макрофаги и другие лейкоциты.

Для высвобождения клеток из розеток последние инкубировали 7 мин при  $37^\circ\text{C}$  при постоянном помешивании с 0,2% трипсином (Gibco) и отмывали средой RPMI 1640 при центрифугировании.

Функциональную активность В-лимфоцитов, не связавшихся с бусами ( $CD5^-$ /В-2 клетки) и выделенных из розеток с помощью трипсина ( $CD5^+$ /«В-1» клетки), исследовали методом ELISPOT.

#### Фенотипическая характеристика клеток

Для фенотипического анализа выделенных клеток использовали бараны антитела к IgG, IgM мыши (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany), меченные FITC, и крысиные антитела к  $CD5$  мыши, меченные фикоэритрином (PE) (Pharmingen).

Клетки инкубировали с антителами 30 мин при  $+4^\circ\text{C}$  в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с добавлением 1% БСА и 0,02%  $\text{NaN}_3$ , дважды отмывали и фиксировали 1% параформальдегидом в ФСБ. Цитофлуориметрический анализ проводили на COULTER EPICS XL, данные были проанализированы в программе EPICS XL SYSTEM II.

## Результаты

В 1-й серии опытов исследовали влияние иммунизации ТН-2 антигенами на специфический и поликлональный иммунный ответ. Введение ТН-2 антигенов индуцировало как появление АОК, так и нарастание общего числа иммуногобулин-образующих клеток (ИГОК) и, соответственно, появление инНИГОК (рис. 1). Количества АОК, индуцированных разными ТН-2 антигенами, колебались от 70/млн спленоцитов (для Фик) до 364/млн спленоцитов (для ПВП), а количества инНИГОК – от 810/млн (для Фик) до 1874/млн (для Декс).

Ранее было показано, что одновременное введение мышам ВРАБЭ (ТЗ антиген) и Vi-антигена (ТН-2 антиген) приводит к суммации числа инНИГОК, индуцированных этими антигенами. Тогда же было высказано предположение о том, что в неспецифическую активацию В-клеток ТЗ и ТН-2 антигенами вовлекаются разные субпопуляции В-лимфоцитов [1]. Было интересно определить, что происходит со специфическим и поликлональным ответами при совместном введении двух ТН-2 антигенов. Данные, полученные при совместном введении двух ТН-2 антигенов в разных комбинациях, представлены на рис. 2. Для сравнения приведены результаты опыта с одновременным введением ТЗ (ВРАБЭ) и ТН-2 антигена (ПВП).

Как видно из рисунка, совместное введение ВРАБЭ и ПВП приводило к появлению АОК на тот и другой антигены и увеличению числа инНИГОК. Последнее при этом практически равнялось сумме чисел инНИГОК, индуцируемых каждым из этих антигенов в отдельности. Так, количества АОК и ИГОК при иммунизации ВРАБЭ составляли 3808 и 14300 на  $10^6$  спленоцитов, а при иммунизации ПВП – 820 и 5870 на  $10^6$  спленоцитов. Соответствующие количества ИГОК равнялись 10492 и 5050 на  $10^6$  клеток. В норме выявлялось в среднем 245 АОК и 3000 ИГОК на  $10^6$  спленоцитов, т.е. 2755 ИГОК на  $10^6$  спленоцитов. Таким образом, число инНИГОК, индуцированных ВРАБЭ, составило 7692 на  $10^6$  клеток, а число инНИГОК, индуцированных ПВП, – 2295 на  $10^6$  спленоцитов. Теоретически суммарное количество инНИГОК должно было бы составить 9987 на  $10^6$  спленоцитов. Обнаруженное при совместном введении ВРАБЭ и ПВП число инНИГОК равнялось 10536 на  $10^6$  клеток, т.е. практически соответствовало теоретическому значению.

Принципиально иная картина наблюдалась при совместной иммунизации двумя ТН-2 антигенами. Ни в одном случае суммации числа инНИГОК обнаружить не удалось (рис. 2). Обычно количество появляющихся инНИГОК не превышало их числа, индуцированного более имму-

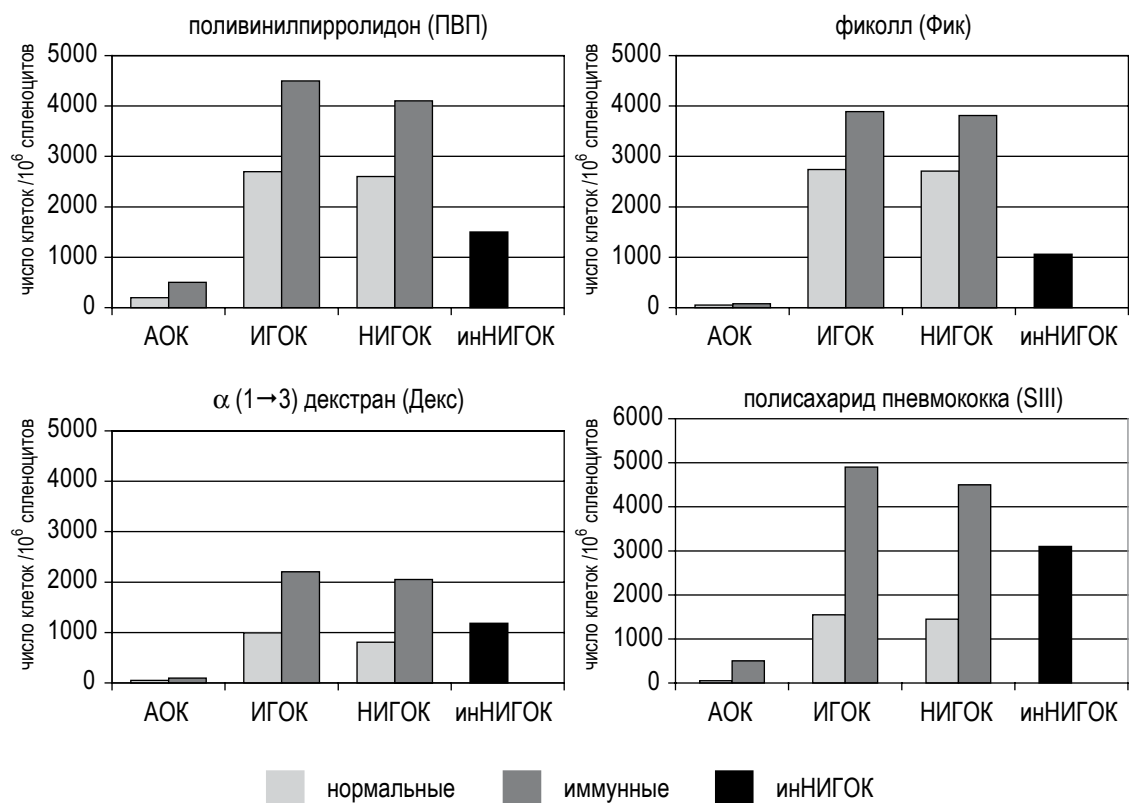


Рисунок 1. Иммунный ответ на ТН-2 антигены

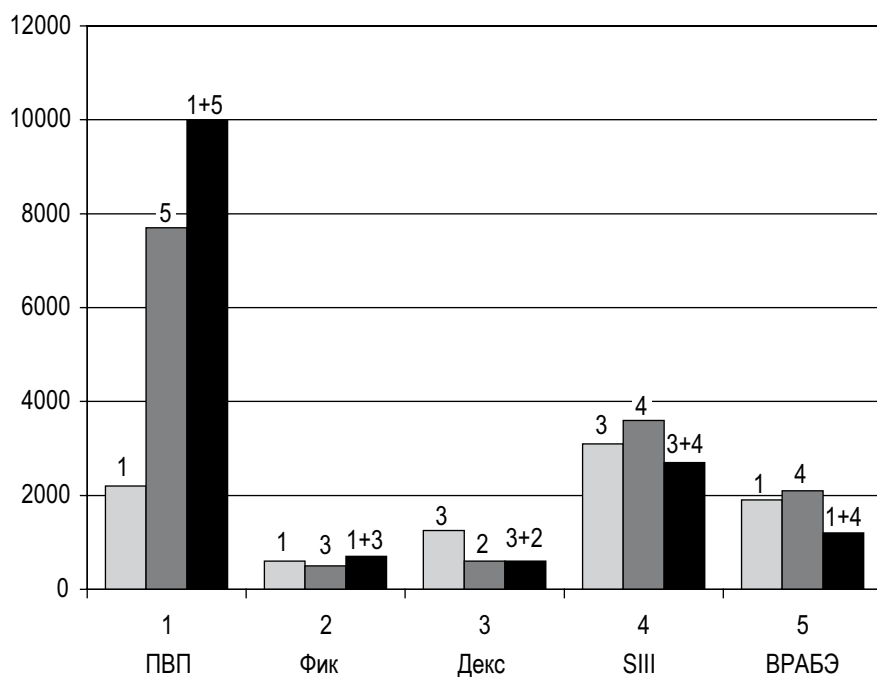


Рисунок 2. Число индуцированных НИГОК при введении ТЗ и ТН-2 совместно и порознь (1-5)

Примечание: 1 – ПВП, 2 – Фик, 3 – Декс, 4 – SIII, 5 – ВРАБЭ.

ногенным из 2-х использованных в паре ТН-2 антигенов.

Необходимо подчеркнуть, что совместное введение ТН-2 антигенов не влияло на образование специфических АОК: их количества оставались практически такими же, как при введении этих антигенов порознь, а иногда даже слегка увеличивались.

Полученные данные еще раз показали, что в поликлональную активацию В-лимфоцитов ТЗ и ТН-2 антигенами вовлекаются разные пулы В-лимфоцитов. При этом было очевидно, что под действием ТН-2 антигенов в такой ответ вовлекается ограниченная в размерах субпопуляция клеток. Для выяснения роли различных В-клеточных субпопуляций в индуцируемой ТН-2 антигенами поликлональной активации В-клеток были проведены опыты по разделению В-спленоцитов на фракции  $CD5^-$  и  $CD5^+$  клеток и определению иммунного ответа в каждой из фракций.

Ранее в опытах с разделением спленоцитов на  $CD5^+$  В-1 и  $CD5^-$  В-2 клетки на клеточном сортере было показано, что в иммунном ответе на ПВП за появление и АОК и инНИГОК ответственны в основном  $CD5^+$  В-клетки [15]. В настоящей работе роль  $CD5^+$  и  $CD5^-$  В, а также — В-2 и «В-1» клеток, полученных с помощью иммуномагнитной сепарации, исследовали при ответе на ПВП и Декс.

При иммунизации ПВП число АОК во фракциях  $CD5^-$  и  $CD5^+$  спленоцитов (клетки, не связанные с бусами, и клетки, выделенные из розеток, соответственно), составило 563 и 2420 на  $10^6$  спленоцитов, а число инНИГОК — 1778 и 4008 на  $10^6$  спленоцитов соответственно. Таким образом, за появление как АОК, так и НИГОК отвечали в основном  $CD5^+$  В-клетки, что согла-

суется с данными, полученными ранее другим способом.

При иммунизации Декс удаление из суспензии  $CD5^+$  В-клеток понижало число АОК ~ на 25%. Количество АОК в  $CD5^+$  В-клеточной популяции и при этом превышало число АОК в  $CD5^-$  популяции ~ в 2-3 раза, что свидетельствовало об обогащении  $CD5^+$  фракции продуцентами антител. Однако, в отличие от опытов с ПВП, значительного увеличения числа инНИГОК в этой фракции обнаружить не удалось.

На следующем этапе количества АОК и инНИГОК определяли непосредственно в субпопуляциях «В-1» и В-2. При иммунизации ПВП во фракции «В-1», содержались большие их количества ( $1066/10^6$  и  $2792/10^6$ ), чем во фракции В-2 ( $754/10^6$  и  $1251/10^6$  соответственно), а при иммунизации Декс числа АОК во фракциях «В-1» и В-2 оказались близкими по значению ( $537/10^6$  и  $468/10^6$  соответственно).

Поскольку числа АОК и ИГОК рассчитывались на  $10^6$  клеток, а количества В-лимфоцитов в субпопуляциях В-2 и «В-1» могли сильно различаться, для оценки реального содержания В-клеток во фракциях В-2 и «В-1» использовали метод проточной цитофлуориметрии. Было установлено, что в В-2 фракции содержится ~ в 6 раз больше В-клеток, чем во фракции «В-1».  $CD5^+$  В-клеток в В-2 фракции было выявлено 1-2%, а в «В-1» фракции — 47% (последняя включает Т-лимфоциты, макрофаги и др.) (рис. 3). Это означает, что количества АОК и ИГОК, а следовательно, и инНИГОК в субпопуляциях «В-1» В-лимфоцитов примерно в 6-7 раз превышают таковые в В-2 субпопуляции.

Наличие в В-2 субпопуляции значительных количеств АОК и ИГОК, особенно выраженное

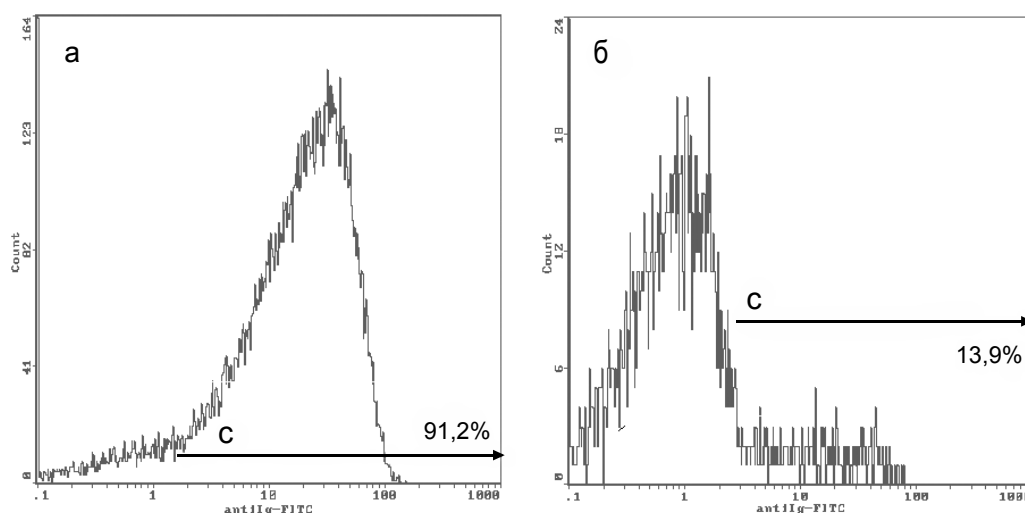


Рисунок 3. Содержание В-лимфоцитов во фракциях В-2 (а) и В-1 (б)

Примечание: область С – В-лимфоциты, экспрессирующие Ig (окрашивание ФИТЦ-Ат к Ig мыши).

при иммунизации Декс, привело к предположению о том, что за это ответственны МЗ-В лимфоциты, которые при использовании для разделения клеток коммерческого набора попадают в В-2 фракцию. С целью проверки этого предположения из В-2 лимфоцитов методом иммуномагнитной сепарации (на бусах, сенсibilизированных анти-CD23 антителами) удаляли В-2 клетки и определяли количества АОК и инНИГОК в исходной и обедненной CD23<sup>+</sup> В-клетками (В-2 и МЗ-В клетки, соответственно) фракциях. Согласно предварительным данным, при введении Декс основная масса АОК и инНИГОК принадлежала CD23<sup>-</sup> В-клеткам: в В-2 субпопуляции число АОК составило  $595/10^6$  и инНИГОК  $3538/10^6$ , а для МЗ —  $1480/10^6$  и  $8000/10^6$ , соответственно.

Разработка метода высвобождения клеток из розеток и установление роли «В-1» клеток в поликлональной активации при ответе на ТН-2 антигены позволили прямо определить количества инНИГОК, во фракциях «В-1» и В-2 клеток при одновременной иммунизации двумя ТН-2 антигенами. Полученные данные приведены на рис. 4. Видно, что несмотря на четкое увеличение числа инНИГОК в «В-1» фракциях при раздельном введении ТН-2, их совместное введение ни к какой суммации количества инНИГОК не приводит. Таким образом, данные, полученные на тотальной суспензии спленоцитов, получили полное подтверждение.

## Обсуждение

Много лет назад Бойд и Бернارد обнаружили, что при иммунизации белковыми антигенами помимо образования антител наблюдается увеличение содержания иммуноглобулинов, не реагирующих с введенным антигеном и названных ими неспецифическими иммуноглобулинами (НИГ) [6]. Позднее было показано, что индукцию образования НИГ вызывают самые разные растворимые и корпускулярные ТЗ антигены (белки, эритроциты, вирусы), а также некоторые Т-независимые антигены (ЛПС, Vi-антиген) [1, 4, 10, 14].

Появление НИГ под действием ТЗ антигенов в основном обусловлено действием неспецифических стимулирующих факторов, образуемых стимулированными антигеном Т-лимфоцитами. Увеличение синтеза НИГ под действием ТН-2 антигенов, не реагирующих с Т-клетками и не обладающих митогенной активностью, до сих пор не объяснено.

Ранее появление индуцированных антигеном НИГ было выявлено при введении животным Vi-антигена сальмонеллы и ПВП [1]. В настоящей работе круг ТН-2 антигенов был расширен: в опытах использовали синтетический антиген — ПВП, полисахаридные антигены пневмококка и лейконостока и фиколл. Количество АОК и ИГОК в суспензиях спленоцитов определяли на 4-е сутки после иммунизации, т.е. на максимум.

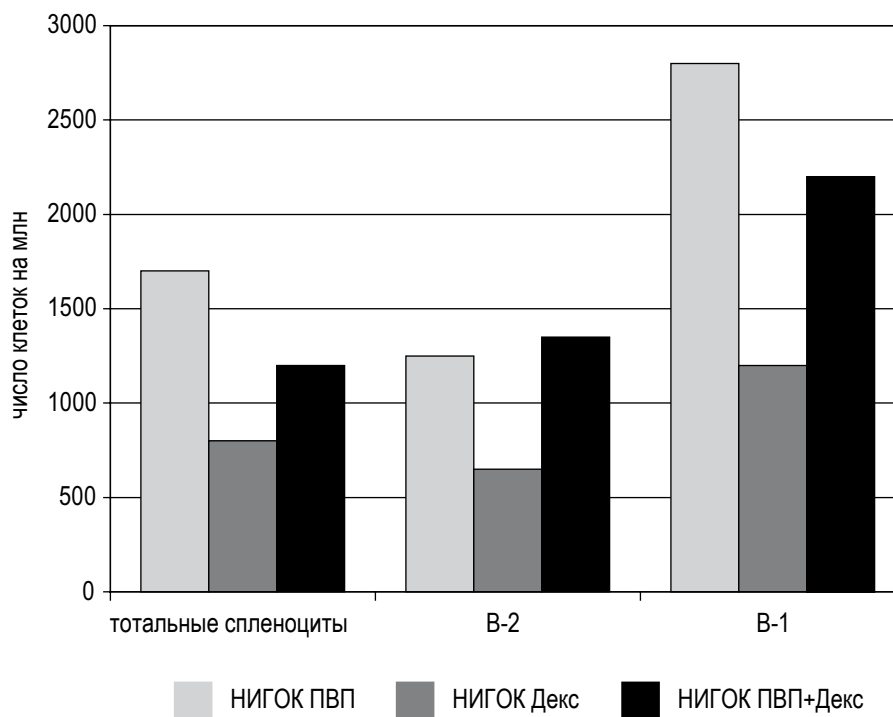


Рисунок 4. Число НИГОК, индуцированных ПВП и Декс, введенных порознь и совместно

ме иммунного ответа, и пересчитывали числа АОК и инНИГОК на  $10^6$  спленоцитов или В-клеток.

Внутривенное введение использованных ТН-2 антигенов, как и ожидалось, приводило не только к образованию АОК, но и к появлению инНИГОК, т.е. индуцировало и специфическую и неспецифическую (поликлональную) активацию В-клеток. Иммуногенность ТН-2 антигенов существенно ниже, чем ТЗ антигенов. Соответственно, и специфический (число АОК) и неспецифический (число инНИГОК) ответы на ТН-2 антигены были значительно ниже, чем на ТЗ антиген (см. рис. 2).

С ортодоксальной точки зрения, ТН-2 антигены, не связывающиеся с Toll-like 5 рецептором, лишены «внутренней» митогенной активности [7]. Следовательно, наблюдаемое в опытах увеличение числа клеток, синтезирующих НИГ, обусловлено какими-то другими, пока не установленными механизмами. Возможно, роль в этом играют неспецифические стимулирующие В-факторы (по аналогии с таковыми Т-клеток) [12]. Не исключена и роль стимулирующих факторов, продуцируемых другими клетками, в том числе — Т-клетками, активированными посторонними антигенами или же НК, макрофагами и дендритными клетками. Этот вопрос нуждается в дальнейшем исследовании.

Суммация количества инНИГОК, обнаруженная ранее при одновременном введении ТЗ и ТН-2 антигенов привела к предположению об участии в поликлональной активации, индуцируемой такими антигенами, разных субпопуляций В-лимфоцитов. Косвенным образом это подтверждалось данными, полученными при одновременном введении двух ТН-2 антигенов: суммация числа инНИГОК отсутствовала при любых комбинациях ТН-2 антигенов. При одновременном введении 2-х ТН-2 антигенов число инНИГОК обычно не превышало такового при ответе на наиболее иммуногенный из них. Объяснить эти данные наличием неспецифической супрессии, вызванной увеличением в 2 раза общей дозы ТН-2 антигенов вряд ли возможно, т.к. использованные дозы ТН-2 антигенов не являются супрессивными [2]. Кроме того, против неспецифической супрессии говорит отсутствие какого-либо угнетения специфического иммунного ответа. Как уже говорилось, количества АОК при совместном введении 2-х ТН-2 антигенов не только не снижались, но в некоторых случаях даже немного возрастали.

Отсутствие суммации числа инНИГОК при одновременном введении двух ТН-2 антигенов позволяет предположить, что эти антигены поликлонально активируют одну и ту же ограниченную в размере популяцию клеток. К таковым может относиться либо небольшая субпопуляция В-клеток, способных неспецифически активироваться к синтезу НИГ ТН-2 антигенами,

(например, клетки, находящиеся в определенной фазе клеточного цикла), либо ограниченная в размерах популяция клеток, продуцирующих факторы, неспецифически стимулирующие любые В-лимфоциты. Очевидно, что для выяснения механизма образования НИГ в ответ на ТН-2 антигены была необходима прямая фенотипическая характеристика клеток, ответственных за этот процесс.

Ранее для одного из ТН-2 — ПВП — было показано, что  $CD5^+$  В-1 клетки ответственны как за образование антител, так и за поликлональную стимуляцию [15]. Было интересно выяснить роль В-1 субпопуляции и в поликлональной активации, индуцируемой другим ТН-2 антигеном — Декс. При иммунизации Декс также, как и при введении ПВП, удаление  $CD5^+$  В-клеток приводило к снижению числа АОК на 25%. Напротив, число АОК в  $CD5^+$  В клеточной популяции превышало число АОК в группе  $CD5^-$  В-клеток в 2-3 раза. Это указывало на доминирующую роль  $CD5^+$  В-клеток в специфическом иммунном ответе на Декс. Однако, в отличие от опытов с ПВП, в случае Декс значительного увеличения количества инНИГОК в  $CD5^+$  фракции не обнаружилось.

Известно, что В-1-клетки подразделяются на В-1а ( $CD5^+$ ) и В-1б ( $CD5^-$ ) [5, 8]. Очевидно, что при изучении иммунного ответа на Декс и ПВП в  $CD5^+$  и  $CD5^-$  субпопуляциях В-клеток мы не учитывали роли последней субпопуляции. Различия по маркеру CD43, одному из фенотипических маркеров, отличающих В-1 субпопуляцию от В-2 клеток [16], позволило разделить суспензию спленоцитов на «В-1» и В-2 субпопуляции. Как и ранее при иммунизации ПВП наибольшее увеличение АОК и инНИГОК наблюдалось во фракции «В-1». В случае Декс число инНИГОК было максимальным также в «В-1» фракции, однако количества АОК в группах В-1 и В-2 были близкими по значению. Так как используемый для разделения клеток набор не позволяет получить чистую В-1-клеточную субпопуляцию (после выделения она включает Т-лимфоциты, макрофаги и другие лейкоциты), состав обеих полученных фракций был проанализирован методом проточной цитофлуориметрии. Оказалось, что содержание В-клеток в В-2 фракции примерно в 7 раз выше, чем в «В-1» (91,2% и 13,9% соответственно). Это значит, что основными продуцентами и антител и индуцированных Декс НИГ являются, как и в случае с ПВП, В-1 лимфоциты. Полученные данные позволяют заключить что как специфический, так и поликлональный иммунный ответ на ПВП и Декс зависит главным образом от В-1-клеток.

Следует отметить, что ПВП и особенно Декс индуцируют образование АОК и инНИГОК и в В-2 субпопуляции. Можно было предположить, что их появление обусловлено присут-

ствием в В-2 фракции В-клеток маргинальной зоны селезенки (MZ-B). Для проверки этого предположения были проведены опыты по удалению из В-2 фракции CD23<sup>+</sup> В-клеток (в основном В-2 клетки) [9, 11]. Это позволило получить В-клеточную популяцию, обогащенную MZ-B-клетками. Согласно предварительным данным, преобладающее число АОК и НИГОК было обнаружено именно в этой фракции.

Разработка метода высвобождения клеток из розеток позволила исследовать ответ на одновременное введение 2-х ТН-2 антигенов во фракциях «В-1» и В-2 лимфоцитов. Было установлено, что при совместной иммунизации мышей ПВП и Декс наибольшие количества АОК и инНИГОК выявляются именно в «В-1» фракции, однако, никакой суммы числа инНИГОК при этом не наблюдается. Полученные данные подтверждают результаты опытов на тотальных суспензиях спленоцитов и позволяют предполагать, что поликлональная активация В-1-клеток, индуцированная введением двух ТН-2, рестриктирована либо размерами способного к такой активации пула «посторонних» В-1/MZ-B-клеток, либо количеством неспецифических стимулирующих факторов, возникающих под влиянием ТН-2 антигенов.

## Благодарности

Выражаем благодарность за помощь в оформлении статьи аспиранту лаборатории Дмитрию Александровичу Ходченкову.

Работа выполнена при поддержке РФФИ.

## Список литературы

1. Агаджанян М.Г., Меграбян Т.Б., Сидорова Е.В. Нарастание числа клеток, секретирующих антитела и клеток, секретирующих неспецифические иммуноглобулины, при иммунизации мышей Т-зависимым и Т-независимым антигенами // Бюлл. эксперим. биол. мед. — 1981. — Т. 92. — С. 66-68.
2. Агаджанян М.Г., Смирнова И.Н., Сидорова Е.В. Зависимость образования продуцентов антигензависимых неспецифических иммуноглобулинов от дозы Т-зависимого и Т-независимых антигенов // Бюлл. эксперим. биол. мед. — 1986. — Т. СП — № 8. — С. 206-208.
3. Сидорова Е.В. Что нам известно сегодня о В-клетках // Успехи современ. биологии. — 2006. — Т. 126. — № 3. — С. 227-242.
4. Bakay M., Biladi I., Berencsi K., Sidorova E., Agadzhanian M., Fachet F., Erdei J. Immunoenhancement and suppression induced by adenovirus in chicken // *Acta Virol.* — 1992. — Vol. 36. — P. 269-276.
5. Baumgarth N., Tung J.W., Herzenberg L.A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion // *Springer Semin. Immun.* — 2005. — Vol. 26. — P. 347-362.
6. Boyd W.C., Bernard H. Quantitative changes in antibodies and  $\gamma$ -globulin fraction in sera of rabbits injected with several antigens // *J. Immunol.* — 1937. — V. 33. — P. 111-122.
7. Chandrashekar P., Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors // *Nature Letters* — 2005. — Vol. 438. — P. 364-368.
8. Hardy R.R., Hayakawa K. B cell development pathways // *Ann. Rev. Immunol.* — 2001. — Vol. 19. — P. 595-621.
9. Martin F., Kearney J. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 cells as part of a «natural immune memory» // *Immunol. Rev.* — 2000. — Vol. 175. — P. 70-79.
10. Mond J.J., Lees A., Snapper C.M. T cell-independent antigens type 2 // *Ann. Rev. Immunol.* — 1995. — V. 13. — P. 655-692.
11. Oliver A.M., Martin F., Gartland G.L., Carter R.H., Kearney J.F. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses // *Eur. J. Immunol.* — 1997. — Vol. 27, N 7. — P. 2366-2374.
12. Pers J.O., Jamin C., Youinou P., Charreire J. Role of IL-10 in the distribution of B cell subsets in the mouse B-1 cell population // *Eur. Cytokine Netw.* — 2003. — Vol. 14, N 3 — P. 178-185.
13. Seman M., Mazie J.C., Bussard A.E. Antigenic properties of a water soluble fraction of sheep erythrocytes // *Eur. J. Immunol.* — 1972. — Vol. 4. — P. 387-388.
14. Sidorova E.V., Agadzhanian M.G., Mazhul L.A., Biladi I., Bakai M., Berencsi K. Immunosuppression induced by respiratory viruses (influenza virus, adenovirus) in mice // *Biull. Eksp. Biol. Med.* — 1991. — Vol. 111. — P. 510-512.
15. Sidorova E.V., Li-Sheng Lu, Devlin B., Chernishova I., Gavrilova M. Role of different B-cell subsets in the specific and polyclonal immune response to T-independent antigens type 2 // *Immunol. Letts.* — 2003. — Vol. 88. — P. 37-42.
16. Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B cell subsets // *J. Immunol.* — 1994. — Vol. 153, N 12. — P. 5503-5515.

поступила в редакцию 11.01.2007  
принята к печати 16.01.2007