

# КЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ ОТВЕТЕ НА Т-НЕЗАВИСИМЫЕ АНТИГЕНЫ 2-ГО ТИПА *IN VITRO*

Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Хоченков Д.А.,  
Сидорова Е.В.

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

**Резюме.** Взаимодействие В1-, В2-лимфоцитов и дендритных клеток (ДК) костного мозга мышей СВА при ответе на Т-независимые антигены 2-го типа (ТН-2 АГ) исследовали в модельной системе *in vitro*. В качестве «филлеров» использовали спленоциты хид мышей СВА/Н. Установлено, что под действием ДК увеличивается выживаемость В1- и В2-лимфоцитов. Функциональную активность В1- и В2-лимфоцитов оценивали, определяя с помощью ELISPOT количества антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток (АОК и ИГОК соответственно) после 4-х дневного культивирования клеток. Усиление ответа на ТН-2 АГ под действием ДК обнаруживалось, главным образом, в культуре В2-клеток, содержащей также МЗ-В-лимфоциты. Влияние ДК на В2-субпопуляцию было подтверждено при определении прямого взаимодействия ДК с Т- и В-лимфоцитами *in vitro*. В смешанных культурах В2- и Т-лимфоцитов, роль филлеров в которых играли Т-клетки (а не спленоциты мышей СВА/Н), добавление ДК снижало количества АОК и ИГОК как в отсутствие, так и в присутствии ТН-2 АГ. В культурах с В1-клетками снижение числа АОК и ИГОК наблюдалось только в присутствии АГ. Угнетающее влияние ДК было обусловлено контактным взаимодействием; при раздельном культивировании В1- или В2-лимфоцитов с ДК в «трансвеллах» количества АОК и ИГОК незначительно отличались от таковых в культурах, инкубируемых в отсутствие ДК.

**Ключевые слова:** В1-лимфоциты, ТН-2-антигены, В2-лимфоциты, дендритные клетки

## Адрес для переписки:

Гаврилова Марина Викторовна  
научный сотрудник лаборатории биосинтеза  
иммуноглобулинов  
ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток  
им. И.И. Мечникова» РАМН  
115533, Россия, Москва, Нагатинская наб., 18,  
кв. 90.  
Тел.: 8 (495) 674-08-42.  
E-mail: gavrilovamv@gmail.com

## Авторы:

Гаврилова М.В. — научный сотрудник лаборатории  
биосинтеза иммуноглобулинов ФГБУ «НИИ вакцин  
и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва  
Чернышова И.Н. — к.м.н., старший научный  
сотрудник лаборатории биосинтеза иммуно-  
глобулинов ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток  
им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва  
Хоченков Д.А. — к.б.н., научный сотрудник лабора-  
тории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБУ «НИИ  
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН,  
Москва  
Сидорова Е.В. — д.б.н., заведующая лабораторией  
биосинтеза иммуноглобулинов ФГБУ «НИИ вакцин  
и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва

Поступила 06.02.2013

Принята к печати 18.02.2013

# IN VITRO CELLULAR INTERACTIONS DURING IMMUNE RESPONSE TO T CELL-INDEPENDENT TYPE 2 ANTIGENS

Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Khochenkov D.A., Sidorova E.V.

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

**Abstract.** Interactions between B1, B2 and bone marrow dendritic cells (DCs) of CBA mice were investigated in the course of immune response to T-independent antigen type 2 (TI 2 Ag) in model system. Splenocytes of Xid-mice CBA/N were used as “fillers”. It was shown that DCs augmented viability of B1 and B2 lymphocytes. Functional activity of the B1 and B2 lymphocytes was determined by ELISPOT method, as relative numbers of antibody- and immunoglobulin-forming cells (AFCs and IFCs, respectively) detectable after four days in culture. An increased immune response to TI 2 Ag in presence of DCs was observed mainly for B2 subpopulation, containing MZ-B lymphocytes as well. Specific effect of DC upon B2 cell subpopulation was confirmed by detection of direct *in vitro* interactions of DCs with T and B lymphocytes. DCs cultivated with B2 and T lymphocytes, used as fillers, decreased the numbers of AFCs and IFCs, irrespectively of absence or presence of TI-2 Ags. A decrease in AFC and IFC numbers in the cultures with B1 cells was evident in presence of the Ags only. It was shown that the inhibitory effect of DCs depended on their contact interactions. Separate cultures of B1 and B2 cells with DC under transwell conditions resulted into occurrence of AFC and IFC in amounts similar to those generated *in vitro* without DCs. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 4, pp 325-334)

**Keywords:** B1 cells, TH lymphocytes, TH2 antigens, B2 lymphocytes, dendritic cells

---

## Address for correspondence:

Gavrilova Marina V.  
Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin  
Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute  
of Vaccines and Sera  
115533, Russian Federation, Moscow, Nagatinskaya  
emb., 18, apt 90.  
Phone: 7 (495) 674-08-42.  
E-mail: gavrilovamv@gmail.com

---

## Authors:

Gavrilova M.V., Research Associate, Laboratory  
of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov  
Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow  
Chernyshova I.N., PhD (Medicine), Senior Research  
Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis,  
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and  
Sera, Moscow  
Khochenkov D.A., PhD (Biology), Research Associate,  
Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis,  
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and  
Sera, Moscow  
Sidorova E.V., PhD, MD (Biology), Chief, Laboratory  
of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov  
Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

Received 06.02.2013

Accepted 18.02.2013

## Введение

Иммунный ответ требует взаимодействия различных клеток иммунной системы. Для гуморального ответа на Т-зависимые антигены (ТЗ-АГ) необходима кооперация Т- и В-лимфоцитов. Антиген (АГ) при этом типе взаимодействия захватывается В-клеточным рецептором, процессируется и презентруется Т-лимфоцитам в комплексе с МНС II. В развитии ответа на ТЗ-АГ участвуют и другие поверхностные структуры Т- и В-клеток, прежде всего CD40 и CD40L. Цитокины активированных Т-хелперов регулируют В-клеточную пролиферацию и дифференцировку.

Существенную роль при Т-В взаимодействии играют и дендритные клетки (ДК) — самые эффективные АГ-презентирующие клетки. ДК поглощают, процессируют и представляют АГ Т- и В-лимфоцитам. Наряду с этим ДК являются источником широкого набора цитокинов.

АГ, способные вызывать гуморальный иммунный ответ без участия Т-хелперов, называют Т-независимыми (ТН-АГ). Выделяют два типа ТН-АГ — ТН-1 и ТН-2 АГ. Ответ на ТН-1 АГ осуществляется при посредстве структур, отличных от поверхностных В-клеточных рецепторов (BCR), и носит поликлональный характер. Клеточные механизмы ответа на ТН-2 АГ до сих пор до конца не выяснены. Считается, что эти АГ (бактериальные полисахариды, некоторые синтетические полимеры и др.) не встраиваются в МНС II, из-за особенностей своего строения [11]. В то же время полисахариды, обладающие двойным зарядом — цвиттер-ионы, могут индуцировать иммунный ответ, активируя Т-клетки через комплекс АГ — МНС II [7]. Однако, подавляющая часть ТН-2 АГ не относится к цвиттер-ионам и не активирует Т-клеток. Каков же в этих случаях источник костимулирующего сигнала для В-лимфоцитов? Не исключено, что в ответе на ТН-2 АГ Т-клетки все-таки играют определенную роль. Так есть данные о влиянии Т-клеточных цитокинов на образование иммуноглобулинов (ИГ) при ответе на конъюгаты декстрана и анти-IgD антител (АТ) [12]; факторы, образующиеся при Т-В взаимодействии, способны стимулировать секрецию АТ к полисахаридам примированными В-лимфоцитами [5]. Известно об угнетении образования IgG АТ к  $\alpha(1\rightarrow3)$ декстрану Т-регуляторными клетками [9]. Не исключено участие в индукции ответа на ТН-2 АГ и ДК, о роли которых в этом процессе пока известно немного [3, 11].

Введение ТЗ-АГ приводит к образованию не только специфических АТ, но и к резкому увеличению синтеза тотальных ИГ. Введение ТН-2 АГ также индуцирует образование тотальных ИГ, хотя и менее выраженное, чем введение ТЗ-АГ [1].

Ранее нами была разработана модельная система для изучения клеточных взаимодействий при ответе на ТН-2 АГ *in vitro*. В этой системе для создания необходимой клеточной плотности в культурах в качестве клеток «филлеров» использовали спленоциты хид-мышей СВА/N, не отвечающих на ТН-2 АГ [4]. **Целью настоящей работы** являлось изучение взаимодействия В1-, В2-, Т-лимфоцитов и ДК при индукции иммунного ответа на ТН-2 АГ *in vitro* с использованием разработанной системы.

## Материалы и методы

### Животные, антигены

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

В качестве ТН-2 АГ использовали поливинилпирролидон (ПВП) с мол. массой 360 кДа (Sigma) и  $\alpha(1\rightarrow3)$ декстран (Декс) *Leuconostoc mesenteroides*, любезно предоставленный д-ром М.Е. Преображенской (ФГБУ «ИБМХ» РАМН, Москва). АГ вносили в культуры в дозе 10 нг/мл.

### Клеточные субпопуляции

Для создания необходимой плотности клеток в лунках 96-луночных плейтов в качестве филлеров использовали спленоциты мышей СВА/N.

Для получения В1-лимфоцитов клетки перитонеальной полости мышей СВА инкубировали с магнитными бусами, покрытыми крысиными АТ к CD19 мыши и пропускали через MS колонку (Miltenyi Biotec, США). Выделенные клетки содержали как В1-, так и В2-лимфоциты. Последние удаляли, инкубируя тотальные В-клетки вначале с биотинилированными АТ к CD23 мыши (Dynal, Норвегия), а затем со стрептавидиновыми магнитными бусами (Dynal).

В2-лимфоциты выделяли из селезенки мышей СВА с использованием магнитных бус Dynabeads Mouse CD43 (Dynal, Норвегия), согласно инструкции.

Т-клетки получали из спленоцитов мышей методом позитивной селекции, используя магнитные бусы, покрытые АТ к CD90.2 (Thy1.2) мыши (Miltenyi Biotec, США) и MS колоноки

(Miltenyi Biotec, США). Чистоту клеточных субпопуляций проверяли с помощью метода проточной цитометрии, используя Beckman Coulter EPICS XL. Чистота полученных субпопуляций была не ниже 95%.

ДК получали по методу Lutz В.М. с незначительными изменениями [6]. Из костного мозга мышей СВА выделяли клетки-предшественники и культивировали их в течение 10 сут в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), рекомбинантный мышинный гранулацитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) 25 мкг/мл (Invitrogen, США), и все необходимые добавки. Чистота ДК, определяемая по экспрессии маркера CD11c<sup>+</sup>, варьировала в пределах 80-95%.

#### Культивирование клеток

B1- и B2-клетки смешивали со спленоцитами мышей СВА/N, или в различных пропорциях с Т-клетками и/или ДК мышей СВА, и культивировали в полной среде RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками в плоскостонных 96-луночных планшетах (Nunc, Дания) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в течение 4-х дней с АГ или без них.

Для раздельного культивирования ДК с лимфоцитами использовали 24-луночные плоскостонные планшеты (Nunc) с мембранными вставками Millicell (Millipore, США). В лунки вносили по  $3 \times 10^6$  смесей клеток, а в мембранные вставки — по  $0,6 \times 10^6$  ДК, 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 ИГ- образующих клеток (АОК и ИГОК соответственно) в культурах с ТН-2 АГ и без них. Для проведения клеточного иммуноферментного анализа (ELISPOT) использовали нитроцеллюлозные планшеты (МАНА N4510, Millipore). Для определения АОК фильтры сенсibilизировали АГ и вносили по  $100 \times 10^3$  клеток/лунку; для выявления ИГОК фильтры покрывали козьими АТ к ИГ мыши (Caltag) и вносили в лунки по  $10 \times 10^3$  клеток. Пробы культивировали в среде RPMI 1640 с 1% ЭТС в течение 12-18 час в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. По окончании инкубации подсчитывали количества АОК и ИГОК на фильтрах и пересчитывали их на  $10^6$  клеток [1].

#### Витальное окрашивание клеток CFDA-SE (CFSE)

При изучении влияния ДК на выживаемость B1- и B2-клеток мышей СВА и В-клеток мышей СВА/N в культурах спленоциты хид-мышей окрашивали CFSE в ФСБ, содержащем 0,1% БСА. Суспензию клеток смешивали (1:1) с 2,5 мМ CFSE (Invitrogen) в том же буфере и инкубировали 10 мин при 37 °С. По окончании инкубации клетки отмывали один раз средой RPMI 1640 с 5% ЭТС и дважды — средой RPMI 1640 [8]. Окрашенные CFSE спленоциты мышей СВА/N инкубировали с B1- и B2-клетками мышей СВА в течение 4-х дней. После инкубации определяли число живых CD19<sup>+</sup> клеток, окрашенных и неокрашенных CFSE, методом проточной цитометрии. 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).

В отдельных опытах CFSE окрашивали B2-клетки мышей СВА, затем их смешивали со спленоцитами мышей СВА/N и после 4-х дневно-го культивирования определяли число живых CD19<sup>+</sup> клеток, окрашенных и неокрашенных CFSE.

#### Статистическая обработка экспериментов

Результаты экспериментов представлены в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения ( $M \pm s$ ). Достоверность различий между группами при культивировании клеток исследовали при помощи дисперсионного анализа. Различия рассматривались как значимые при  $p < 0,05$ .

## Результаты

#### Влияние ДК на жизнеспособность В-клеток

На первом этапе работы исследовали влияние ДК на жизнеспособность В-клеток в модельной системе. В культуру, содержащую B1- или B2-клетки мышей СВА и спленоциты СВА/N (в соотношении 1:9 соответственно), вносили 20% ДК и на 4-е сутки определяли число живых и мертвых клеток. Под действием ДК общая выживаемость клеток в культурах возрастала с 40% до 70%.

Поскольку в модельных культурах имелись не только B1- или B2-клетки мышей СВА, но и В-клетки мышей СВА/N, следовало определить, одинаково ли ДК влияют на выживаемость В-клеток мышей этих линий. В лунки 96-луночных планшетов помещали окрашенные CFSE спленоциты мышей СВА/N (90%) и неокрашен-

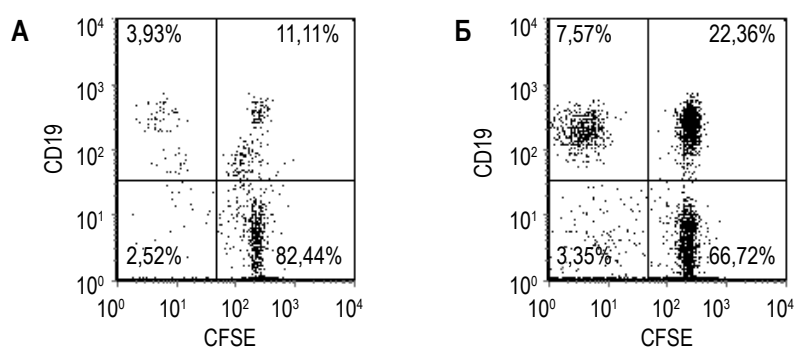


Рисунок 1. Влияние ДК на выживаемость В2-клеток мышей СВА и спленоцитов мышей СВА/Н *in vitro* (А – без ДК, Б – в присутствии ДК). В2-клетки мышей СВА окрашены PE-CD19, спленоциты мышей СВА/Н – CFSE и PE-CD19

ные В1- или В2-клетки мышей СВА (10%). Смесь клеток культивировали в присутствии или в отсутствие ДК 4 суток и определяли в пробах число CD19<sup>+</sup>В-клеток. В ряде случаев происходило увеличение числа В-клеток в 1,5-2 раза, выживаемость CD19<sup>+</sup>В-клеток СВА/Н и СВА мышей в культурах под влиянием ДК при этом возрастала примерно одинаково (рис. 1).

Эти результаты были подтверждены и в опытах с окрашиванием CFSE В2-лимфоцитов мышей СВА и последующим культивированием их с неокрашенными спленоцитами мышей СВА/Н и ДК. В-клетки мышей и СВА, и СВА/Н в смешанных культурах в присутствии ДК выживали ~ в 2 раза лучше, чем в пробах без ДК.

#### Влияние ДК на иммунный ответ В1- и В2-лимфоцитов на ТН-2 АГ в модельной системе

На следующем этапе исследовали влияние ДК на иммунный ответ В1- и В2-лимфоцитов на ТН-2 АГ. В лунки, содержащие В1- или В2-клетки мышей СВА и спленоциты мышей

СВА/Н, вносили ДК (20%) и культивировали смесь клеток в присутствии или в отсутствие ТН-2 АГ (ПВП или Декс) в течение 4-х суток. По окончании культивирования в суспензиях определяли количества АОК и ИГОК.

Полученные данные приведены на (рис. 2А). Из рисунка видно, что под действием ТН-2 АГ в культуре с В1-лимфоцитами незначительно увеличивается число АОК. Внесение ДК на число АОК в культурах с В1-клетками не влияло. Количество тотальных ИГОК при добавлении ДК к культурам с В1-лимфоцитами в присутствии ТН-2 АГ также не изменялось (данные не приведены). Таким образом, на индукцию первичного иммунного ответа на ТН-2 АГ в культурах с В1-клетками *in vitro* ДК практически не влияли.

В опытах с культурами, содержащими В2-клетки мышей СВА, были получены неожиданные результаты. ТН-2 АГ сами по себе образования АОК в таких культурах не индуцировали (рис. 2Б). Однако, добавление ДК снижало ко-

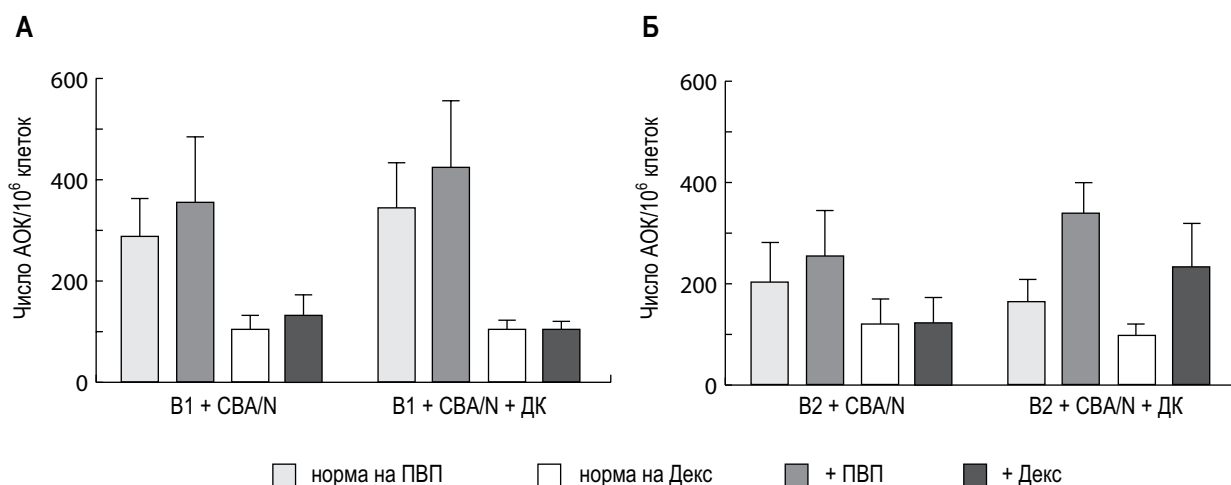


Рисунок 2. Влияние ДК на число АОК в культуре В1- (А) или В2-клеток (Б) клеток мышей СВА в модельной системе

личество «фоновых» АОК (для ПВП с  $352 \pm 121$  до  $126 \pm 57$ , для Декс с  $225 \pm 9$  до  $121 \pm 61 \times 10^6$  клеток) и количество «фоновых» ИГОК (в 1,5-2 раза). Одновременно при добавлении Декс количество АОК повышалось с  $244 \pm 29$  до  $441 \pm 59 \times 10^6$  клеток; при добавлении ПВП число АОК не изменялось (рис. 2Б). На число ИГОК в иммунных пробах ДК влияли незначительно.

Поскольку в опытах определяли только IgM-АОК или IgM-ИГОК (основной изотип ИГ при ответе на ТН-2 АГ), видимое снижение «фоновых» количеств этих клеток могло быть связано с тем, что под действием ДК в них происходило переключение изотипа ИГ, и в результате уменьшалось число IgM-продуцентов. Для проверки этого предположения в культурах определяли количества не только IgM-, но и IgG-ИГОК. В результате было установлено, что под действием ДК в культурах без АГ уменьшается не только число IgM-ИГОК, но и количество IgG-ИГОК (примерно в те же 1,5-2 раза). Таким образом, снижение числа «фоновых» ИГОК не связано с переключением изотипа с IgM на IgG, но обусловлено общим снижением числа ИГ-продуцентов.

В использованной нами модельной системе присутствуют не только В1- и В2-клетки мышей СВА, но и Т- и В лимфоциты мышей СВА/Н. Очевидно, что эффект ДК на В-клетки мышей СВА мог быть опосредованным и зависеть от взаимодействия ДК с Т- или В-лимфоцитами мышей СВА/Н. Для выяснения того, на какие клетки действуют ДК в модельной системе, исследовали прямое взаимодействие ДК с Т- и В-лимфоцитами в культурах, не содержащих спленоцитов мышей СВА/Н, в отсутствие и в присутствии ТН-2 АГ.

#### **Влияние Т-клеток на иммунный ответ В1- и В2-лимфоцитов на ТН-2 АГ**

Т-лимфоциты выделяли из селезенки мышей СВА и инкубировали их в различных соотношениях с В1- или В2-клетками в течение 4-х дней с добавлением ПВП и без него. Число «фоновых» АОК и ИГОК при увеличении доли В1-клеток в смешанных культурах В1- и Т-лимфоцитов возрастало. Это увеличение было, однако, непропорциональным: при увеличении доли В1-клеток в 9 раз количества «фоновых» АОК и ИГОК возрастали не более чем в 2-4 раза — с  $417 \pm 75$  до  $988 \pm 266 \times 10^6$  клеток и с  $5725 \pm 742$  до  $21811 \pm 2855 \times 10^6$  клеток соответственно.

Внесение в пробы АГ индуцировало слабый иммунный ответ. Так при соотношении Т- и В1-клеток 1:9, соответственно, число АОК при иммунизации ПВП возрастало с  $988 \pm 266$

до  $1413 \pm 744 \times 10^6$  клеток. Т-клетки на иммунный ответ на ПВП в культуре В1-клеток влияния не оказывали. Независимо от соотношения Т/В количества АОК в ответ на ПВП увеличивались ~ в 1,4 раза. Так в смесях Т- и В-клеток 1:1 и 9:1 число АОК при добавлении ПВП возрастало с  $767 \pm 160$  до  $1076 \pm 348$  и с  $417 \pm 75$  до  $1076 \pm 348$  соответственно. Число ИГОК изменялось незначительно.

Как известно, В2-клетки практически не отвечают на ТН-2 АГ. Однако, следовало проверить, не повлияют ли Т-лимфоциты на ответ В2-клеток на ПВП при изменении соотношений В2- и Т-клеток в культуре. Влияние Т-клеток на иммунный ответ на ТН-2 АГ обнаруживалось только при содержании в пробе 10% В2 и 90% Т-лимфоцитов (количество АОК и ИГОК возрастало с  $332 \pm 239$  до  $619 \pm 392$  и с  $6483 \pm 1414$  до  $11763 \pm 6499 \times 10^6$  клеток соответственно). При остальных соотношениях В2- и Т-клеток (1:1 и 9:1 соответственно) влияния Т-лимфоцитов на ответ не наблюдалось.

#### **Влияние ДК на иммунный ответ В1- и В2-лимфоцитов в присутствии Т-клеток**

На следующем этапе исследовали влияние ДК на иммунный ответ В1-лимфоцитов на ТН-2 АГ в присутствии Т-клеток (Т-лимфоциты в этом случае использовали в качестве филлеров). Для этого в лунки, с 10% В1 вносили 20% ДК в присутствии или в отсутствие ТН-2 АГ (ПВП или Декс) и на 4-е сутки культивирования определяли в культурах количества АОК и ИГОК.

Изменение числа АОК при добавлении ДК как в нормальных, так и в иммунных культурах с Т- и В1-лимфоцитами было незначительным (данные не приведены). В то же время на количества ИГОК в нормальных и иммунных культурах ДК влияли по-разному. Внесение ДК практически не влияло на число «фоновых» ИГОК в культурах с В1-клетками, но существенно снижало количество ИГОК при добавлении с ТН-2 АГ (от  $14199 \pm 6227$  до  $5585 \pm 3135 \times 10^6$  клеток для ПВП и от  $11345 \pm 1325$  до  $6678 \pm 1555 \times 10^6$  клеток для Декс) (рис. 3А).

В культурах с Т- и В2-клетками ДК снижали образование и «фоновых», и иммунных АОК к ПВП с  $199 \pm 80$  до  $112 \pm 73$ , и с  $395 \pm 82$  до  $138 \pm 61 \times 10^6$  клеток соответственно, но почти не влияли на образование АОК к Декс. При этом ДК угнетали появление как «фоновых», так и иммунных ИГОК (рис. 3Б): в норме число ИГОК снижалось с  $6808 \pm 1835$  до  $2365 \pm 893$  в иммунных группах с ПВП и Декс: с  $12103 \pm 4356$  до  $2825 \pm 719$  и с  $12404 \pm 3239$  до  $2939 \pm 1030 \times 10^6$  клеток соответ-

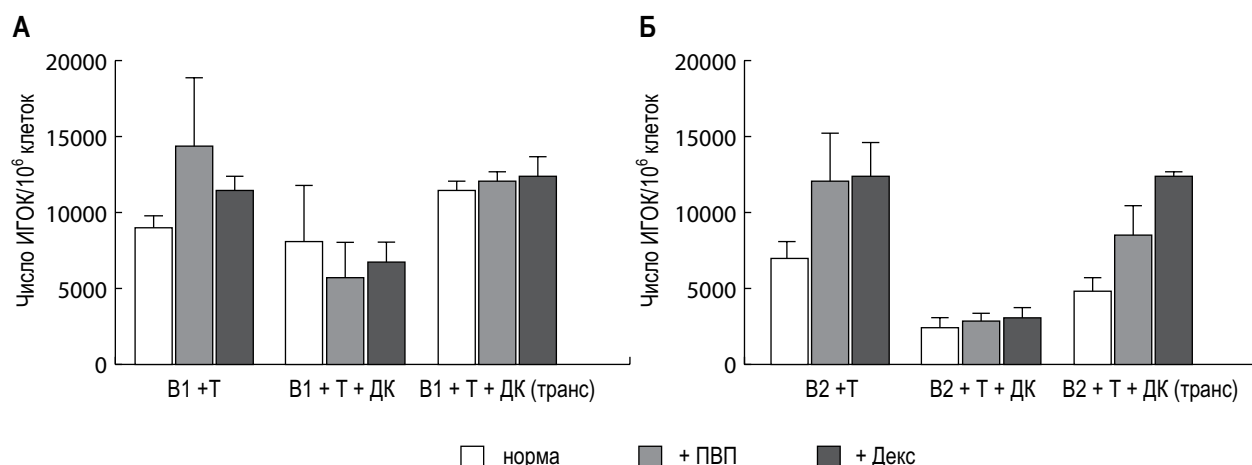


Рисунок 3. Число ИГОК в культурах В1- (А) или В2-клеток (Б) клеток с Т-лимфоцитами мышей СВА без ДК, при совместном и раздельном культивировании с ДК (в трансвеллах)

ственно. Таким образом, независимо от наличия в пробах Т-клеток, добавление ДК снижало количества клеток, секретирующих специфические АТ и тотальные ИГ.

Возник вопрос, от чего зависит угнетение ДК секреции АТ/ИГ? Для ответа на этот вопрос использовали культивирование ДК и лимфоцитов, разделенных полупроницаемой мембраной (трансвеллы). По окончании культивирования определяли количества ИГОК. Полученные данные приведены на рисунках 3А и 3Б.

Как видно из рисунка 3А, при раздельном культивировании В1-клеток с ДК количество иммунных ИГОК было достаточно высоким, хотя и не достигало уровня, наблюдаемого при совместном культивировании лимфоцитов без ДК: так при ответе на ПВП оно достигало  $11815 \pm 857$  вместо  $5585 \pm 3135 \times 10^6$  клеток при совместном культивировании и при ответе на Декс —  $12114 \pm 1924$  вместо  $6678 \pm 1555 \times 10^6$  клеток. Аналогичная тенденция наблюдалась при раздельном культивировании ДК с В2-клетками (рис. 3Б): как число «фоновых», так и иммунных ИГОК под влиянием ПВП и Декс увеличивалось по сравнению с таковым при совместном культивировании в 3 и 4 раза соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение числа как «фоновых», так и иммунных ИГОК под действием ДК обусловлено контактным взаимодействием.

## Обсуждение

Ранее для изучения ответа В1- и В2-лимфоцитов мышей СВА на ТН-2 АГ *in vitro* [4] нами была разработана модельная система, позволяющая снизить количества исследуемых В-клеток. В настоящей работе эта система была

использована для изучения взаимодействия ДК с В1- и В2-лимфоцитами в присутствии и в отсутствие ТН-2 АГ.

Опыты проводили с культурами, содержащими В1- или В2-клетки мышей СВА (10%) и спленоциты мышей СВА/Н (90%) в качестве филлеров, обеспечивающих необходимую клеточную плотность.

Как и ожидалось, под действием ДК общая выживаемость клеток возрастала (с 40% до 70%). На число Т-клеток ДК практически не влияли. В некоторых случаях в 1,5–2 раза увеличивалось количество CD19<sup>+</sup> клеток (В-лимфоциты). Возможно, наблюдаемые колебания зависят от использования в разных опытах ДК, несколько отличающихся по экспрессии поверхностных маркеров CD80 и CD86 (т.е. по степени активации). Как показали опыты с окрашиванием клеток прижизненным красителем CFSE, выживаемость В-клеток СВА и СВА/Н мышей под влиянием ДК увеличивалась примерно одинаково (рис. 1).

ДК играют большую роль в ТЗ-иммунном ответе, связывая и процессируя ТЗ-АГ и презентуя их наивным Т-лимфоцитам. Недавно было показано, что ДК способны связывать не только ТЗ-, но и ТН-2 АГ. При этом ДК активируются и повышают способность АГ индуцировать иммунный ответ [3]. Эти исследования, однако, были выполнены при нагрузке ДК очень большими («нефизиологичными») дозами ТН-2 АГ. Используемая в настоящей работе модельная система позволяет исследовать взаимодействие ненагруженных ДК с В1- и В2-лимфоцитами в норме и при иммунизации низкими иммуногенными дозами ТН-2 АГ. В качестве последних были вы-

браны бактериальный ТН-2 АГ — Декс и синтетический ТН-2 АГ — ПВП.

На иммунный ответ В1-клеток на ПВП в модельной системе ДК влияния практически не оказывали (число АОК в культурах с ДК и без ДК при добавлении АГ возрастало одинаково ~ на 25%). Скорее всего, это обуславливалось просто повышением жизнеспособности В-клеток (рис. 2А).

В культурах, содержащих В2-клетки, влияние ДК на число АОК оказалось значительно более заметным. Так, внесение в культуру ДК в отсутствие АГ приводило к снижению числа «фоновых» АОК (рис. 2Б) и ИГОК ~ в 2 раза.

Основным изотипом ИГ при ответе на ТН-2 АГ является IgM. Поэтому влияние ДК на образование АОК и ИГОК мы оценивали по числу IgM-продуцентов в культурах. Можно было предположить, что наблюдаемое в присутствии ДК снижение количеств «фоновых» АОК и ИГОК обусловлено тем, что ДК индуцируют в В2-лимфоцитах переключение с IgM на другие изотипы, снижая тем самым количества IgM продуцентов. Проверка этого предположения, показала, однако, что под влиянием ДК в пробах снижается число не только IgM-, но и IgG-продуцентов (примерно в те же 1,5-2 раза). Таким образом, снижение «фоновых» ИГОК не связано с переключениями изотипов, но обусловлено общим угнетающим действием ДК на В2-лимфоциты.

Как объяснить возникающее противоречие между данными об увеличении жизнеспособности В-клеток под влиянием ДК и данными о снижении числа «фоновых» IgM- и IgG-продуцентов? Можно предположить, что ДК по-разному влияют на активированные и неактивированные В-клетки, способствуя выживаемости последних; в результате относительное количество В-клеток, секретирующих ИГ, снижается. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что в культурах со смесями Т- и В1-клеток ДК снижают числа АОК и ИГОК только в присутствии АГ, т.е. действуют только на В1-клетки, активированные АГ, но не влияют на «фоновые» количества конститутивных продуцентов ИГ. В то же время в селезенке нормальных неиммунизированных мышей всегда присутствуют В2-лимфоциты, активированные разными АГ; поэтому внесение ДК в культуру В2-клеток приводит к снижению их количества даже в отсутствие экзогенного АГ.

Известно, что В2-лимфоциты слабо отвечают на ТН-2 АГ. Однако, при внесении Декса в культуру В2-лимфоцитов наблюдалось незначительное

увеличение количества АОК. Вместе с тем при добавлении ДК происходило снижение числа «фоновых» АОК. В результате возрастала разница между «опытом» и «контролем», и выявлялся иммунный ответ на Декс. Внесение в культуру ПВП к «появлению» иммунного ответа на него не приводило.

«Неожиданное» наличие иммунного ответа В2-лимфоцитов на Декс скорее всего объясняется тем, что использованный в наших опытах метод выделения В2-лимфоцитов не позволяет получить популяцию В2-клеток, не содержащую МZ-В-лимфоцитов. Как известно, последние отвечают на полисахаридные ТН-2 АГ и, следовательно, могут вносить свою лепту в появление АОК к ТН-2 АГ [2]. Отвечают ли МZ-В-клетки на ПВП, неизвестно. Возможно, что разница в ответе В2-клеток на Декс и ПВП в присутствии ДК указывает на то, что МZ-В-клетки на ПВП не отвечают. Влияние ДК на МZ-В-клетки не исследовано. Наличие на них маркера CD9, позволяет выделить МZ-В-лимфоциты и исследовать их роль в клеточных взаимодействиях.

В модельной системе 90% клеток в культурах составляют спленоциты мышей СВА/Н, содержащие как В2-, так и Т-клетки. Очевидно, что влияние ДК на В-клетки мышей СВА в этой системе может зависеть от взаимодействия ДК с Т-лимфоцитами мышей СВА/Н и выделения последними каких-то неспецифических стимулирующих В-клетки факторов. Поэтому следовало выяснить как влияют ДК на Т- и В-лимфоциты.

Изучение взаимодействия Т- и В-лимфоцитов мышей СВА при иммунизации ТН-2 АГ *in vitro* показало, что Т-клетки сами по себе влияния на ответ В1-клеток не оказывают. В то же время ответ В2-клеток в присутствии 9-кратного избытка Т-лимфоцитов увеличивался в 1,5-2 раза. Механизм влияния избытка Т-клеток на В2-лимфоциты неясен.

Изучение прямого взаимодействия ДК с В-лимфоцитами позволило выявить угнетающее действие ДК на В-клетки: в случае В2-лимфоцитов добавление ДК снижало число АОК и ИГОК как в присутствии, так и в отсутствие ТН-2 АГ в культуре, а в случае В1-клеток — только в присутствии АГ (рис. 3А, Б).

Для того чтобы выяснить, связано ли угнетение образования ИГОК с прямым действием ДК на В-лимфоциты были поставлены опыты по совместному и отдельному культивированию ДК с В2-клетками, последние инкубировали (в отсутствие Т-лимфоцитов) либо вместе с ДК, либо



в трансвеллах. При отдельном культивировании число секретирующих ИГ В2-лимфоцитов достигало  $56333 \pm 3214$  ИГОК  $\times 10^6$  клеток, а при непосредственном контакте их число составляло  $19437 \pm 1328$  ИГОК  $\times 10^6$  клеток, т.е. уменьшалось в 2-3 раза. Полученные данные свидетельствуют о прямом угнетающем действии ДК на В2-лимфоциты.

Ранее Santos и др. [10] продемонстрировали наличие контактного угнетения BCR — индуцированной пролиферации В-спленоцитов мыши под действием ДК костномозгового происхожде-

ния. Пролиферация индуцировалась внесением в культуру В-спленоцитов мыши анти-IgM антител. Угнетение зависело от CD22 (корцептор BCR), содержащего ITIM. Наблюдаемое нами угнетение иммунного ответа на ТН-2 АГ в культурах В1- и Т-, или В2- и Т-клеток под действием ДК согласуется с этими данными. Анти-IgM антитела являются аналогом ТН-2 АГ [13]. Использование реальных ТН-2 АГ и проведение опытов не с тотальными В-спленоцитами, а с отдельными субпопуляциями В-клеток расширяет имеющиеся сведения.

## Список литературы

1. Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Сидорова Е.В. Роль различных субпопуляций В-клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены 2-го типа // Медицинская иммунология. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 39-46.
2. Сидорова Е.В. Субпопуляции В-лимфоцитов и их функциональная роль // Успехи современной биологии. — 2002. — Т. 122, № 5. — С. 467-479.
3. Хоченков Д.А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2 // Биологические мембраны. — 2010. — Т. 27, № 4. — С. 1-6.
4. Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Сидорова Е.В. Модельная система для изучения клеточных взаимодействий и механизмов иммунного ответа на Т-независимые антигены 2-го типа *in vitro* // Биологические мембраны. — 2010. — Т. 27, № 5. — С. 1-7.

Ссылки 5-13 см. в References (сmp. 333-334). See References for numbers 5-13 at pp. 333-334.

## References

1. Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Sidorova E.V. Rol' razlichnykh subpopulyatsiy B-kletok v immunnom otvete na T-nezavisimye antigeny 2-go tipa [Role of different B cell subpopulations in immune response to T-independent type 2 antigens]. *Meditsinskaya immunologiya — Medical Immunology*, 2007, vol. 1, no. 9, pp. 39-46.
2. Sidorova E.V. Subpopulyatsii B-limfotsitov i ikh funktsional'naya rol' [B-lymphocytes subpopulation and their functional role. Biology bulletin reviews]. *Uspekhi sovremennoy biologii — Biology Bulletin Reviews*, 2002, vol. 122, no. 5, pp. 467-479.
3. Hochenkov D.A. Rol' dendritnykh kletok v immunnom otvete na T-nezavisimye antigeny tipa 2 [Role of dendritic cells in immune response to T-independent type 2 antigens]. *Biologicheskie membrany — Membrane and Cell Biology. Biochemistry (Moscow) suppl. Series A.*, 2010, vol. 27, no. 4, pp. 1-6.
4. Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Sidorova E.V. Model'naya sistema dlya izucheniya kletochnykh vzaimodeystviy i mekhanizmov immunnogo otveta na T-nezavisimye antigeny 2-go tipa *in vitro* [Model system to study cell interactions and mechanisms of immune response to T-independent type 2 antigens *in vitro*]. *Biologicheskie membrany — Membrane and Cell Biology. Biochemistry (Moscow) suppl. Series A.*, 2010, vol. 27, no. 5, pp. 1-7.
5. Breukels M., Rijkers G., Voorhorst-Ogink M., Zegers B. Regulatory T cells in the antibody response to *Haemophilus influenza* type b polysaccharide. *Infection and Immunity*, 1999, vol. 67, pp. 789-793.
6. Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rössner S., Koch F., Romani N., Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods*, 1999, vol. 223, pp. 77-92.
7. Cobb B., Wang Q., Tzianabos O., Kasper D. Polysaccharide processing and presentation by the MHCII Pathway. *Cell*, 2004, vol. 117, no. 5, pp. 677-687.
8. Quah B., Warren H., Parish C. Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, pp. 2049-2056.

9. Rademaekers A., Kolsch E., Specht C. T cell mediated antibody invariance in an immune response against a bacterial carbohydrate antigen requires CD28/B7-1 costimulation. *Developmental Immunology*, 2001, vol. 8, no. 3-4, pp. 243-257.
10. Santos L., Draves K., Botton M., Grewal P., Marth J., Clark E. Dendritic cell-dependent inhibition of B cell proliferation requires CD22. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 7, pp. 4561-4569.
11. Vos Q., Lees A., Wu Z., Snapper C., Mond J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews*, 2000, vol. 176, pp. 154-170.
12. Vos Q., Snapper C., Mond J. Th1 versus Th2 cytokine profile determines the modulation of *in vitro* T cell-independent type 2 responses by IL-4. *International Immunology*, 2000, vol. 12, pp. 1337-1345.
13. Chelvarajan R.L., Raithatha R., Venkataraman C., Kaul R., Han S.S., Robertson D.A., Bondada S. CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. *Eur. J. Immunol.*, 1999, vol. 29, pp. 2808-2818.