

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ В-КЛЕТОК МЫШИ. РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ

Дьяков И.Н., Григорьев И.В., Сидорова Е.В.,
Чернышова И.Н.

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, лаборатория биосинтеза иммуноглобулинов, Москва

Резюме. Для исследования влияния микроокружения на функциональную активность В-лимфоцитов использовали модель адоптивного переноса клеток мышей СВА конгенным мышам СВА/Н, не имеющим CD5⁺ В-1 клеток, и модель кокультивирования спленоцитов мышей СВА/Н с клетками селезенки или перитонеальной полости мышей СВА. Об активности В-лимфоцитов судили по числу IgM-продуцентов и клеток, образующих антитела к Т-независимому антигену 2-го типа – поливинилпирролидону. За распределением введенных клеток следили, определяя количество клеток, окрашенных витальным красителем CDFA-SE, в селезенке и брюшной полости реципиентов. Внутривенный перенос спленоцитов СВА приводил к значительному (в 3-4 раза) увеличению числа иммуноглобулин-продуцентов в селезенке хид-реципиентов, достигавшему уровня, характерного для мышей СВА. Перенос СВА/Н мышам хид-клеток увеличения количества иммуноглобулин-продуцентов не вызывал. Это свидетельствует о том, что увеличение количества IgM-продуцентов в селезенке реципиентов обусловлено клетками донора, предположительно, CD5⁺ В-1 лимфоцитами. Вместе с тем восстановить у хид-мышей иммунный ответ на поливинилпирролидон не удалось. В брюшной полости интактных мышей (и СВА, и СВА/Н) продуценты иммуноглобулина не выявлялись. Внутрибрюшинный перенос СВА спленоцитов к появлению иммуноглобулин-продуцентов в брюшной полости реципиентов также не приводил. Это означает, что микроокружение брюшной полости тормозит активность В-лимфоцитов. В то же время внутривенное введение «молчащих» перитонеальных клеток мышей СВА мышам СВА/Н, приводило к значительному возрастанию числа IgM-продуцентов в селезенке реципиента, т.е. в другом микроокружении работа перитонеальных В-клеток «разрешалась». Данные опытов *in vivo* согласуются с результатами, полученными *in vitro*. Добавление к спленоцитам СВА/Н 10-50% спленоцитов или перитонеальных клеток мышей СВА приводило к резкому повышению числа IgM-продуцентов в культурах. Полученные данные свидетельствуют об определяющей роли микроокружения в функциональной активности В-лимфоцитов мыши.

Ключевые слова: В-лимфоциты, локальное микроокружение, иммуноглобулины.

Dyakov I.N., Grigoriev I.V., Sidorova E.V., Chernyshova I.N.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF MURINE B CELL: A ROLE OF MICROENVIRONMENT

Abstract. To study influence of microenvironment upon functional activity of B cells, we used experimental models of adoptive cell transfer from CBA to congenic CBA/N mice lacking CD5⁺ B-1 cells, and co-cultivation of CBA/N splenocytes with spleen, or peritoneal CBA cells. B cell activity was determined as numbers of IgM-producing cells, and as amounts of cells producing antibodies to a T-independent antigen type 2 (polyvinylpyrrolidone). *In vivo* distribution of transferred cells was determined as the numbers of cells stained with a vital dye (CDFA-SE) in spleen and peritoneum of recipients. Intravenous injection of CBA splenocytes resulted into a significant (3- to 4-fold) increase in numbers of IgM-producing cells in the spleens of xid-recipients, where their levels reached those of CBA mice. Intravenous injection of CBA/N splenocytes into xid-mice did not induce any increase of IgM-producers in their spleen. That means that increased number of IgM-producers in recipient spleen is due to donor cells, presumably, CD5⁺ B-1 lymphocytes. Meanwhile, restoration of immune response to polyvinylpyrrolidone in xid-mice following transfer of CBA splenocytes was not successful. IgM-producing cells were undetectable

Адрес для переписки:

Дьяков Илья Николаевич
115088, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-08-42.
Факс: 8 (495) 674-57-10.
E-mail: dyakov.ilya@gmail.com

in peritoneum of intact mice (both CBA and CBA/N). Intraperitoneal transfer of CBA splenocytes also did not induce their accumulation. It could mean that peritoneal microenvironment inhibits B cell activity. Meanwhile, intravenous injection of «silent» peritoneal cells into CBA/N mice brought about great increase of IgM-producers in recipient spleen, i.e., the «job» of B cells was permitted in other microenvironment. The results yielded *in vivo* are in agreement with data of *in vitro* experiments. Addition of CBA splenocytes or peritoneal cells (10-50%) to CBA/N splenocytes induced sharp increase of IgM-producing cells in the cultures. The data obtained provide evidence for a decisive role of microenvironment in functional activity of murine B lymphocytes. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 51-58)

Введение

В лимфоциты подразделяют на 4 основные субпопуляции — B-1a, B-1b, MZ-B и B-2. Основными местами локализации В-клеток у мыши являются костный мозг, селезенка, лимфоузлы и брюшная полость. В селезенке доминируют B-2 клетки; основная масса перитонеальных В-клеток представлена B-1 лимфоцитами [22]. Между селезенкой и брюшной полостью происходит обмен В клетками, хотя он, по-видимому, невелик [13].

Несмотря на то, что в селезенке B-1a клетки представляют минорную субпопуляцию (2-5% от общего числа В-лимфоцитов), их абсолютное количество сходно с таковым B-1a клеток в брюшной полости [9, 10]. Считается, что около 50% нормальных IgM мыши могут продуцироваться B-1 лимфоцитами брюшной полости. Вместе с тем данные о наличии иммуноглобулин-образующих клеток (ИГОК) в брюшной полости противоречивы [4, 12, 17].

Свойства В-клеток, локализованных в разных органах, неодинаковы. Внимание большинства исследователей до последнего времени было направлено на изучение механизмов дифференцировки В-клеток, определение фенотипических маркеров и выяснение потенциальной способности В-лимфоцитов, принадлежащих к разным субпопуляциям, восстанавливать иммунореактивность организма [2, 16, 21]. Поведение и активность В-лимфоцитов, находящихся в разном микроокружении, остаются в тени.

Особый интерес в этом отношении представляют B-1a клетки, являющиеся продуцентами нормальных IgM [1]. Ранее было показано, что внутривенный перенос xid-мышам спленоцитов или клеток брюшной полости конгенных животных восстанавливает субпопуляцию CD5⁺ B-1 клеток и иммунореактивность xid-животных [6, 8, 18].

Задачей настоящей работы является выяснение того, как меняется реактивность В-лимфоцитов, содержащих и не содержащих CD5⁺ B-1 клеток, под влиянием микроокружения. Для этого использовали 2 подхода. В опытах *in vivo* использовали модель адоптивного переноса клеток селезенки и брюшной полости мышей CBA (содержат CD5⁺ B-1a клетки) мышам конгенной линии CBA/N, не имеющим B-1a клеток. В опытах *in vitro* клетки селезенки или брюшной полости

мышей CBA культивировали со спленоцитами мышей CBA/N. О функциональной активности В-лимфоцитов судили, определяя с помощью ELISPOT количество IgM-ИГОК и число клеток, образующих антитела (АОК) к Т-независимому антигену 2-го типа — поливинилпирролидону (ПВП). Полученные данные свидетельствуют об определяющей роли микроокружения в деятельности В-лимфоцитов.

Материалы и методы

Животные, антигены, иммунизация. В опытах использовали мышей CBA, самок 16-18 г весом, полученных из питомника «Столбовая» (Москва, Россия). CBA/N мыши были получены из вивария ГУ ЦНИИ туберкулеза РАМН и размножены в виварии Института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. В качестве Т-независимого антигена 2-го типа (ТН-2 антиген) использовали поливинилпирролидон (ПВП) с молекулярной массой 350 kDa. Мышей иммунизировали 2 мкг ПВП внутривенно в подглазничный синус. Селезенку брали на 4-й день после иммунизации.

Получение клеточных суспензий и адоптивный перенос. Моноклеточную суспензию спленоцитов получали, гомогенизируя селезенку в среде RPMI 1640. Эритроциты удаляли осмотическим шоком. Перитонеальные клетки получали, вымывая содержимое брюшной полости 10 мл среды RPMI 1640. Клетки отмывали средой и определяли их число в камере Горяева. В опытах по адоптивному переносу мышам внутривенно (в подглазничный синус) вводили по 15×10^6 спленоцитов или по 3×10^6 клеток перитонеальной полости в 150 мкл среды; внутрибрюшинно переносили по 5×10^6 спленоцитов или по 3×10^6 клеток перитонеальной полости в 200 мкл среды.

Витальное окрашивание клеток CFDA-SE. Для окрашивания клеток использовали витальный флуоресцентный краситель CFDA-SE (Invitrogen). Суспензию клеток 50×10^6 млн/мл в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина, смешивали 1:1 с рабочим раствором красителя (40 мкМ) и инкубировали 10 мин при +37°C рабочий раствор CFDA-SE готовили непосредственно перед использованием из 2мМ сток раствора в диметилсульфоксиде, хранящегося при -20°C. Окрашивание останавливали, добавляя холодную среду с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Затем клетки

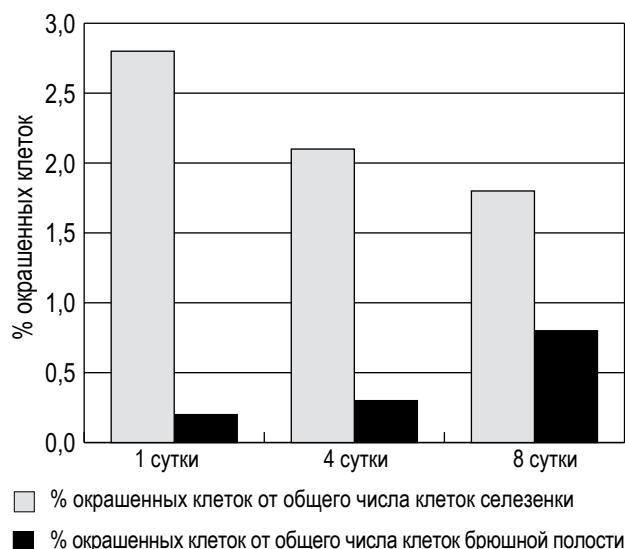


Рисунок 1. Распределение спленоцитов СВА, окрашенных CFDA-SE, после внутривенного введения мышам СВА/N

дважды отмывали средой без ЭТС, подсчитывали и вводили мышам. Число окрашенных клеток в селезенке и брюшной полости реципиентов определяли после фиксации 1% раствором параформальдегида в 0,9% растворе NaCl с помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter EPICS XL). Результаты обрабатывали с помощью программы SYSTEM II (Beckman Coulter).

Культивирование клеток. Клетки селезенки или перитонеальной полости мышей СВА или СВА/N (1×10^6 /лунку) культивировали в 96-луночных планках (Nunc) в 200 мкл полной среды с добавлением 10% фетальной сыворотки в CO_2 -инкубаторе в течение 4 дней. По окончании инкубации клетки собирали, отмывали и в моноклеточной суспензии определяли число ИГОК с помощью ELISPOT.

Клеточный иммуноферментный анализ (ELISPOT). Для выявления антителообразующих клеток (АОК) и IgM-ИГОК использовали нитроцеллюлозные планшеты (Millipore), сенсibilизированные ПВП (для выявления АОК) или козьими антителами к иммуноглобулинам (ИГ) мыши (Sigma, USA) (для выявления ИГОК). На сенсibilизированные и отмытые фосфатно-солевым буфером нитроцеллюлозные диски наносили клетки селезенки или брюшной полости мышей (по 100×10^3 для определения АОК и по 10×10^3 для определения ИГОК) и культивировали их при 37°C в среде RPMI-1640 с 1% ЭТС в течение 18-24 часов в CO_2 -инкубаторе. По окончании инкубации клетки удаляли, диски отмывали, добавляли усиливающую кроличью антисыворотку к IgM мыши, пероксидазный конъюгат антител к IgG кролика и субстратный буфер, содержащий 1,4-хлорнафтол, и H_2O_2 . Реакцию останавливали дистиллированной водой. После высушивания фильтров число образовавшихся

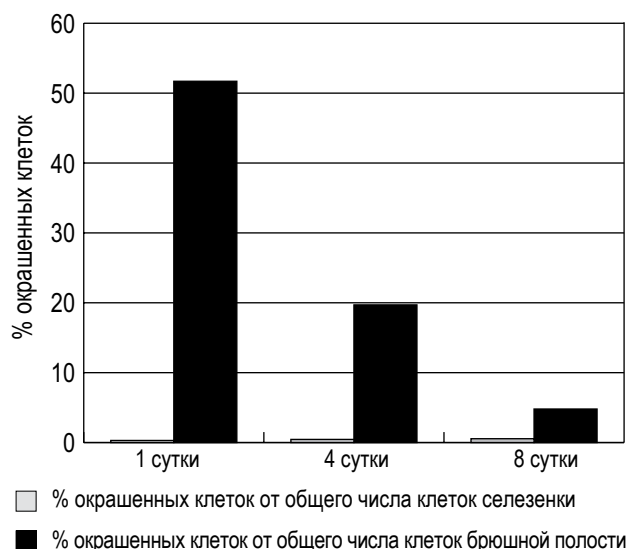


Рисунок 2. Распределение спленоцитов СВА, окрашенных CFDA-SE, после внутрибрюшинного введения мышам СВА/N

окрашенных комплексов (плаков) подсчитывали под микроскопом и пересчитывали на 10^6 клеток.

Результаты

Функциональная активность спленоцитов мышей СВА, введенных мышам СВА/N внутривенно или внутрибрюшинно

Для проведения опытов по адоптивному переносу, прежде всего, следовало проследить за распределением переносимых мышам клеток. Для этого были получены спленоциты, окрашенные CFDA-SE, и проверена их способность к продукции IgM. Было установлено, что окрашенные клетки сохраняют не менее 80-85% своей функциональной активности.

Спленоциты, окрашенные CFDA-SE, вводили внутривенно (по 15×10^6 клеток) или внутрибрюшинно (по 5×10^6 клеток); окрашенные перитонеальные клетки вводили внутривенно (по 3 млн). Процент окрашенных клеток в селезенке и перитонеальной полости определяли на различные сроки после переноса. Полученные данные представлены на рисунках 1 и 2. Из них видно, что при внутривенном введении в селезенке СВА/N реципиентов, содержащей около 40×10^6 клеток, на 1-е сутки обнаруживалось 2,8%, на 4-е сутки — 2,1% и на 8-е — 1,8% окрашенных клеток от числа всех клеток селезенки. В пересчете на абсолютные количества соответственные величины равнялись $1,12 \times 10^6$, $0,84 \times 10^6$ и $0,72 \times 10^6$ окрашенных клеток, что составляло 7,5%, 5,6% и 4,8% от числа введенных спленоцитов. В перитонеальной полости при этом обнаруживалось не более 0,8% от общего числа клеток, или 0,04% от числа введенных окрашенных спленоцитов.

При внутрибрюшинном введении окрашенных спленоцитов наоборот, значительная часть

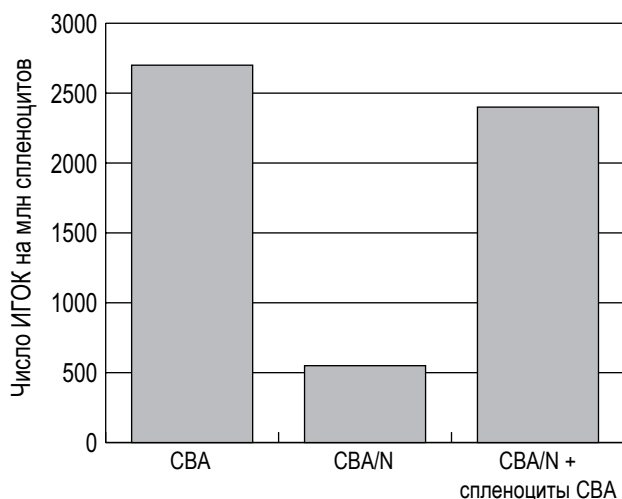


Рисунок 3. Число ИГОК в селезенке мышей CBA, CBA/N и CBA/N на 4 сутки после внутривенного переноса спленоцитов CBA

окрашенных клеток выявлялась в перитонеальной полости: до 50% от числа всех клеток на 1-е сутки, 20% на 4-е и ~ 5% — на 8-е. В пересчете на абсолютные количества это составляло 1×10^6 , $0,4 \times 10^6$ и $0,1 \times 10^6$ клеток, или 20%, 8% и 2% от числа введенных клеток, соответственно. При этом в селезенке и на 1-е, и на 4-е сутки число окрашенных клеток было незначительным (не более 0,15% от общего числа клеток).

На 4-е сутки после внутривенного переноса окрашенных CFDA-SE перитонеальных клеток в селезенке обнаруживалось $70-85 \times 10^3$ окрашенных клеток, т.е. ~ 0,15% от числа всех клеток, или 2,5% от числа введенных окрашенных клеток. В брюшной полости выявлялось 2×10^3 окрашенных клеток, т.е. ~ 0,4% от числа введенных окрашенных клеток.

Полученные данные позволяли перейти к модельным опытам по переносу клеток CBA мышам хид-мышам CBA/N. При адоптивном переносе мышам CBA/N внутривенно вводили 15×10^6 спленоцитов мышей CBA, содержащих 2700 IgM-ИГОК на 10^6 клеток, т.е. всего ~ $40 \times 10^3 \text{ ИГОК}$, и на 4 сутки определяли число IgM-ИГОК в селезенке реципиентов. Исходное количество IgM-ИГОК в селезенке CBA/N мышей составляло в среднем 550 на 10^6 клеток. На 4 сутки после внутривенного переноса CBA спленоцитов число IgM-ИГОК у реципиентов увеличивалось до 2400 IgM-ИГОК на 10^6 клеток, т.е. доходило примерно до уровня, характерного для мышей CBA (рис. 3).

Чтобы выяснить обусловлено ли это возрастание перенесенными клетками CBA, или оно происходит в результате «запуска» лимфоцитов реципиента самой процедурой переноса, CBA и CBA/N мышам внутривенно вводили спленоциты или перитонеальные клетки мышей CBA/N и на 4-е сутки определяли количества IgM-ИГОК в селезенках реципиентов. Перенос клеток хид-

мышей сколько-нибудь заметного увеличения числа IgM-ИГОК ни в одном случае не вызвал. Это говорит о том, что сама по себе процедура переноса клеток к «запуску» В-лимфоцитов реципиента не приводит, и, следовательно, наблюдаемый при внутривенном переносе клеток CBA прирост числа IgM-ИГОК в селезенке хид-мышей обусловлен клетками доноров.

В следующей серии опытов определяли, сохраняют ли В-клетки селезенки способность продуцировать IgM в другом микроокружении — при переносе их в брюшную полость. Мышам CBA/N вводили внутривенно по 5×10^6 окрашенных CFDA-SE спленоцитов CBA, содержащих $17,5 \times 10^3 \text{ IgM-ИГОК}$, и на разные сроки определяли число IgM-ИГОК в брюшной полости реципиентов. Уже на первые сутки после переноса число ИГОК в брюшной полости составило не более 200 на 10^6 клеток, а на четвертые сутки выявить там ИГОК вообще не удалось. В селезенке достоверного изменения числа ИГОК при внутрибрюшинном введении спленоцитов не наблюдалось.

Функциональная активность клеток брюшной полости мышей CBA, введенных мышам CBA/N внутривенно или внутрибрюшинно

Известно, что внутривенный перенос перитонеальных клеток нормальных мышей хид-мышам восстанавливает иммунологическую реактивность последних [6, 18]. Было интересно выяснить, как изменяется поведение перитонеальных В-лимфоцитов при их адоптивном переносе в селезенку и брюшную полость хид-мышей. В первую очередь следовало определить количество IgM-ИГОК в перитонеальной полости мышей CBA. Однако многократные попытки выявить такие IgM-продуценты как в норме, так и после иммунизации ПВП оказались безуспешными.

Вместе с тем внутривенный перенос 3×10^6 «молчащих» перитонеальных клеток мышей CBA хид-мышам приводил к значительному увеличению на 4 сутки числа IgM-ИГОК в селезенке реципиентов (рис. 4.). Так, исходное количество IgM-ИГОК в селезенке мышей CBA/N составляло в среднем 735 на 10^6 спленоцитов. На 1-е и 2-е сутки после переноса 3×10^6 перитонеальных клеток достоверного увеличения числа IgM-ИГОК в селезенке реципиентов не наблюдалось. Однако на 3-и сутки оно повышалось до 1500 на 10^6 спленоцитов, а на 4-е достигало максимальных значений (в среднем 3325 на 10^6 спленоцитов) и сохранялось на этом уровне в течение 2-х недель (время наблюдения). Таким образом, «молчащие» в перитонеальной полости В-клетки CBA при попадании в селезенку мышей CBA/N активировались к синтезу и секреции IgM. При внутрибрюшинном переносе клеток перитонеальной полости CBA мышей хид-мышам появления ИГОК в брюшной полости не наблюдалось (увеличения числа ИГОК в селезенке реципиентов также не было).

ТАБЛИЦА 1. ОБРАЗОВАНИЕ IgM-ИГОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШЕЙ СВА СО СПЛЕНОЦИТАМИ XID-МЫШЕЙ СВА/N

Спленициты СВА/N, %	Спленициты СВА, %	Предполагаемое число ИГОК/10 ⁶ клеток*	Полученное число ИГОК/10 ⁶ клеток
100	—	—	100
98	2	213	291
95	5	383	534
90	10	665	2095
50	50	2925	6150
—	100	—	5750

Примечание: * — предполагаемые числа ИГОК получены суммацией чисел ИГОК в клетках селезенки СВА и СВА/N мышей, внесенных в культуры.

Иммунный ответ на ПВП

Определение числа IgM-ИГОК в селезенке xid-мышей показало, что оно значительно ниже, чем у конгенных мышей СВА. Известно также, что СВА/N мыши не отвечают на ТН-2 антигены [15]. Поскольку внутривенный перенос СВА/N мышам нормальных клеток селезенки или брюшной полости мышей СВА восстанавливал количество ИГОК в селезенке до «нормального» уровня, представлялось интересным выяснить, приобретают ли при этом xid-реципиенты способность отвечать на ТН-2 антиген. Для этого определяли иммунный ответ на ПВП у мышей СВА, СВА/N и СВА/N после внутривенного переноса им спленоцитов или клеток брюшной полости мышей СВА.

Реципиентов иммунизировали ПВП одновременно с переносом клеток или спустя неделю. Число АОК в селезенке определяли на 4 сутки после введения антигена. В качестве контроля использовали нормальных и иммунизированных мышей СВА и СВА/N. Иммунизация ПВП мышей СВА приводила к увеличению числа АОК в 2-2,5 раза (с 248 АОК на 10⁶ спленоцитов в норме до 632 АОК на 10⁶ спленоцитов на 4-е сутки после иммунизации). Число АОК к ПВП у неиммунизированных мышей СВА/N не превышало в среднем 35 на 10⁶ клеток селезенки. После внутривенного введения 15 х 10⁶ спленоцитов мышей СВА оно возрастало до 180-220, а после переноса 3 х 10⁶ перитонеальных клеток — даже до 300-350 АОК на 10⁶ спленоцитов. Таким образом, внутривенное введение СВА/N мышам клеток СВА приводило не только к увеличению общего числа ИГОК, но и повышало количество фоновых АОК на ПВП. Однако иммунизация реципиентов ПВП достоверного увеличения числа АОК в селезенке не вызвала, т.е. способность к ответу на ТН-2 антиген в описанной постановке опыта не восстановилась.

Образование IgM-продуцентов при совместной инкубации клеток СВА и СВА/N *in vitro*

Определение числа окрашенных клеток в селезенке и брюшной полости реципиентов показало, что при внутривенном введении в этих органах выявляется относительно небольшая часть переносимых клеток. Это затрудняет оценку

их функциональной активности. Чтобы исключить влияние миграции клеток было решено использовать систему культивирования лимфоцитов *in vitro*.

Спленициты или перитонеальные клетки мышей СВА культивировали в разных соотношениях со спленоцитами мышей СВА/N и на 4-е сутки определяли количества IgM-продуцентов методом ELISPOT. В ряде опытов к культурам добавляли ПВП и определяли кроме ИГОК также и количества АОК. Полученные данные представлены в таблицах 1 и 2.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что культивируемые В-лимфоциты селезенки сохраняют *in vitro* свою функциональную активность, а перитонеальные клетки, перенесенные в культуру, приобретают способность к продукции и секреции IgM. Таким образом, как и в опытах *in vivo*, перенос перитонеальных клеток СВА в другие условия, приводит к их «растормаживанию». Внесение в культуру, состоящую в основном из спленоцитов СВА/N, даже незначительных количеств клеток СВА (как селезеночных,

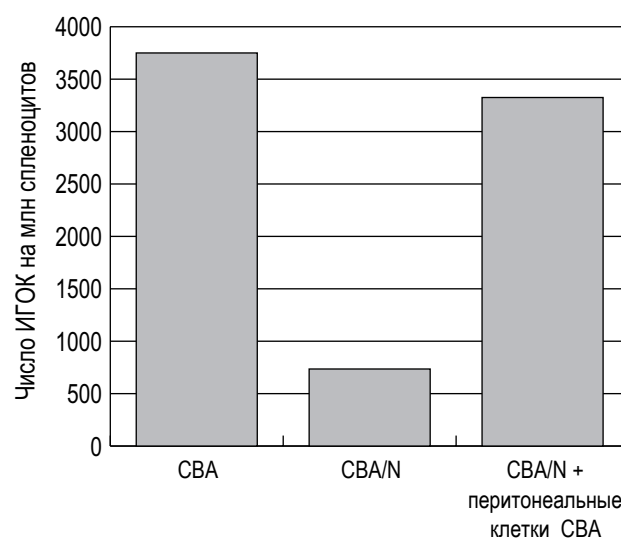


Рисунок 4. Число ИГОК в селезенке мышей СВА, СВА/N и СВА/N на 4 день после внутрибрюшинного переноса перитонеальных клеток СВА

ТАБЛИЦА 2. ОБРАЗОВАНИЕ IgM-ИГОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ СВА СО СПЛЕНОЦИТАМИ МЫШЕЙ СВА/N

Спленициты СВА/N, %	Перитонеальные клетки СВА, %	Предполагаемое число ИГОК/10 ⁶ клеток*	Полученное число ИГОК/10 ⁶ клеток
100	—	—	80
95	5	154	617
90	10	229	1283
80	20	378	1483
50	50	825	2425
—	100	—	1569

Примечание: * — предполагаемые числа ИГОК получены суммацией чисел ИГОК в клетках СВА и СВА/N мышей, внесенных в культуры.

так и перитонеальных) приводило к увеличению числа IgM-ИГОК, превышающему предполагавшиеся значения. Это говорит о том, что в культуре имеет место активация/пролиферация В-лимфоцитов.

Как и в опытах с адоптивным переносом, выявить образование АОК к ПВП в смешанных культурах клеток не удалось.

Обсуждение

Ряд данных свидетельствует о различии свойств В-клеток в зависимости от локализации [13, 20]. Однако сравнительное поведение В-клеток селезенки и брюшной полости при их внутривенном и внутрибрюшинном введении изучено недостаточно. Представлялось интересным сравнить функциональную активность В-лимфоцитов селезенки и перитонеальной полости мышей конгенных линий СВА и СВА/N в гомологичном и гетерологичном окружении.

СВА/N мыши дефектны по гену Брунтона-тирозин киназы (Btk), в связи с чем у них нарушено созревание В-клеток, отсутствуют CD5⁺ В-1a лимфоциты и резко снижено содержание нормальных IgM в крови [7, 9]. Такие мыши не отвечают на ТН-2 антигены. Внутривенное введение xid-мышам клеток селезенки или брюшной полости нормальных мышей в значительной степени устраняет эти дефекты [6, 8, 18]. Это позволяет использовать модель адоптивного переноса клеток мышей СВА мышам СВА/N и vice versa для изучения роли микроокружения в функциональной активности В-клеток, содержащих и не содержащих CD5⁺ В лимфоциты. В настоящей работе было исследовано влияние микроокружения селезенки и брюшной полости мышей СВА/N на способность В-лимфоцитов мышей СВА продуцировать IgM.

Изучение распределения клеток селезенки, окрашенных витальным красителем CFDA-SE, показало, что при внутривенном введении в селезенке обнаруживается больше окрашенных клеток, чем в перитонеальной полости, а при внутрибрюшинном — наоборот. На четвертые сутки после внутривенного переноса, в селезенке

выявлялось 5,6% от числа введенных окрашенных клеток (0,84 x 10⁶ клеток на орган), а в брюшной полости — не более 0,04%. На 4-е сутки после внутрибрюшинного переноса, напротив, в брюшной полости оставалось ~8% от числа введенных клеток (0,4 x 10⁶ клеток на орган), а в селезенке — 1,2%. По-видимому, основная часть переносимых клеток мигрирует в другие органы, либо погибает. Действительно, было показано, что при переносе лимфоцитов взрослым нормальным мышам, большая часть введенных клеток погибает вскоре после переноса [5].

Внутривенный перенос 15 млн спленицитов СВА, содержащих 2700 ИГОК на 10⁶ клеток, т.е. всего 40 x 10³ ИГОК, приводил к возрастанию их числа в селезенке СВА/N реципиентов на четвертые сутки с 550 на 10⁶ до 2400 на 10⁶.

Согласно данным по переносу окрашенных спленицитов, на 4-е сутки в селезенке мышей СВА/N выявляется 2,1% окрашенных клеток или 5,6% от числа введенных. В пересчете на вносимое количество ИГОК (40 x 10³) это составляет 2240 ИГОК на селезенку. В то же время реальное возрастание числа ИГОК в селезенках реципиентов достигало ~80 x 10³. Резкое повышение количества ИГОК может объясняться как активацией клеток донора, так и активацией клеток реципиента процедурой переноса или внесением клетками СВА каких-то отсутствующих в селезенке мышей СВА/N факторов. Однако внутривенный перенос мышам СВА и СВА/N лимфоцитов мышей СВА/N увеличения числа ИГОК в селезенке реципиентов не вызывал. Это свидетельствует о том, что сама процедура переноса клеток не активирует спленициты реципиента. Прирост числа ИГОК в селезенке мышей СВА/N, после переноса им клеток СВА, обусловлен функциональной активностью клеток донора.

Интересно было установить, что происходит при внутривенном переносе клеток из другого микроокружения, а именно из брюшной полости. Несмотря на наличие в последней значительного количества В-клеток, нам, как и ряду других авторов [4, 11, 14] выявить среди них IgM-ИГОК не удалось. Отсутствие ИГОК в брюшной полости

могло быть обусловлено как особенностями самих перитонеальных В-лимфоцитов, так и влиянием локального микроокружения. Известно, например, что макрофаги брюшной полости выделяют простагландин Е₂, угнетающий В-лимфоциты [3]. Можно было предположить, что «освободившись» от угнетающего микроокружения брюшной полости В-клетки начнут функционировать и продуцировать ИГ. Для проверки этого предположения были проведены опыты по внутривенному переносу перитонеальных клеток. При внутривенном введении 3 млн перитонеальных клеток СВА мышам СВА/Н в селезенке последних наблюдалось постепенное возрастание числа IgM-ИГОК, достигающее на 3-4-е сутки «нормальных» величин, практически не отличающихся от таковых в селезенке мышей СВА (см. рис. 4). Это означает, что В-клетки, «молчащие» в брюшной полости, в микроокружении селезенки приобретают способность к размножению и синтезу и секреции ИГ.

Как показали опыты с введением окрашенных перитонеальных клеток, процент последних в селезенке хид-реципиентов был весьма низок, составляя не более 0,15% всех клеток селезенки, или $\sim 80 \times 10^3$ клеток на орган. Это свидетельствует о крайне высокой функциональной активности перенесенных перитонеальных клеток, в несколько раз превышающей таковую СВА спленоцитов. Возможно, это связано с большим содержанием в брюшной полости CD5⁺В-клеток. Ранее на восстановление иммунореактивности мышей BALB.xid после переноса им перитонеальных клеток мышей BALB/c, указывал Riggs et al. [18].

Возник вопрос, сохраняют ли спленоциты способность к образованию и секреции ИГ при помещении их в брюшную полость. Для проверки этого предположения клетки селезенки мышей СВА (5×10^6), содержащие 3500 ИГОК на 10^6 клеток, переносили в брюшную полость мышей СВА/Н. Через сутки перенесенные спленоциты составляли в брюшной полости около 50% от общего числа клеток, а через 4 дня — около 20%. Теоретически это позволяло выявить в перитонеальных клетках реципиентов не менее 1750 и 700 ИГОК на 10^6 клеток, соответственно. Однако в действительности, даже на 1-е сутки удалось выявить лишь около 200 ИГОК на 10^6 клеток (вместо ожидаемых 1750); на 4-е же сутки обнаружить ИГОК вообще не удалось. Таким образом, не только перитонеальные клетки (ни В-2, ни В-1) не секретируют ИГ, но и спленоциты, помещенные в перитонеальное микроокружение, перестают это делать. Альтернативному предположению о том, что В-клетки после переноса чрезвычайно быстро «уходят» из брюшной полости противоречат данные о наличии в ней значительных количеств перенесенных окрашенных спленоцитов. Таким образом, отсутствие ИГОК в брюшной полости

мышей, по-видимому, обусловлено тормозящим влиянием перитонеального окружения.

При адоптивном переносе введенные клетки в организме мигрируют, что осложняет интерпретацию результатов. Система совместного культивирования клеток селезенки мышей СВА/Н с клетками селезенки и брюшной полости мышей СВА позволяет исследовать активность нормальных В-клеток в окружении, в значительной степени имитирующем селезенку и перитонеальную полость. Проведенные опыты по кокультивированию нормальных спленоцитов и перитонеальных клеток СВА со спленоцитами СВА/Н показали (в соответствии с данными опытов *in vivo*), что перенос клеток из брюшной полости в питательную среду приводит к «растормаживанию» В-клеток и появлению в культуре IgM-ИГОК, и что совместная инкубация нормальных клеток СВА со спленоцитами СВА/Н приводит к увеличению числа IgM-ИГОК в культурах (см. таблицы 1 и 2). Необходимо отметить, что это увеличение превышает предполагаемые величины, рассчитанные на основании данных о количествах ИГОК в культурах спленоцитов СВА и СВА/Н и культурах перитонеальных клеток, что свидетельствует об активации В-лимфоцитов. Особенно выражена активация при совместной культивации спленоцитов СВА/Н и перитонеальных клеток СВА.

Полученные данные не позволяют определить, какие В-клетки активируются в смешанных культурах. Возможно, что и В-клетки СВА, и В-клетки СВА/Н. Для выяснения этого следует использовать отдельные субпопуляции В-лимфоцитов селезенки и перитонеальной полости и раздельное культивирование клеток в двухкамерных плашках.

Ранее было установлено, что основной популяцией В-клеток, отвечающих на ПВП, являются CD5⁺В-1 лимфоциты [19, 22]. В настоящей работе внутривенный перенос СВА/Н мышам нормальных лимфоцитов СВА приводил к возрастанию числа «фоновых» АОК к ПВП в селезенке реципиентов, однако, специфического иммунного ответа на ПВП не восстанавливал.

Полученные данные отличаются от результатов Riggs et al., выявивших ответ репопулированных нормальными В-клетками мышей BALB.xid на ДНФ-фиколл [18]. Эти различия могут быть связаны: 1) с использованием в опытах разных линий мышей, 2) с использованием разных ТН-2 антигенов и, наконец, 3) с различными способами выявления иммунного ответа.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что использованные нами модели адоптивного переноса и система культивирования лимфоцитов *in vitro* позволяет исследовать функциональную активность В-лимфоцитов различной локализации. Показано, что ведущую роль в деятельности В-клеток играет микроокружение. Микроокружение селезенки и брюшной полости

влияет на функциональную активность В-клеток противоположным образом. В селезенке «разрешается» деятельность не только спленоцитов, но и клеток брюшной полости, а в брюшной полости деятельность и тех и других «запрещается». Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования с использованием чистых субпопуляций В-1 и В-2 клеток.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.

Список литературы

1. Baumgarth N., Tung J.W., Herzenberg L.A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion // Springer Semin. Immunopathol. — 2005. — Vol. 26, N 4. — P. 347-62.
2. Berland R., Wortis H.H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5 // Annu. Rev. Immunol. — 2002. — Vol. 20. — P. 253-300.
3. Chace J.H., Fleming A.L., Gordon J.A., Perandones C.E., Cowdery J.S. Regulation of differentiation of peritoneal B-1a (CD5⁺) B cells. Activated peritoneal macrophages release prostaglandin E2, which inhibits IgM secretion by peritoneal B-1a cells // J. Immunol. — 1995. — Vol. 154, N 11. — P. 5630-5636.
4. Fagarasan S., Watanabe N., Honjo T. Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells // Immunol. Rev. — 2000. — Vol. 176. — P. 205-215.
5. Gaudin E., Rosado M., Agenes F., McLean A., Freitas A.A. B-cell homeostasis, competition, resources, and positive selection by self-antigens // Immunol. Rev. — 2004. — Vol. 197. — P. 102-115.
6. Hayakawa K., Hardy R.R., Stall A.M., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage // Eur. J. Immunol. — 1986. — Vol. 16, N 10. — P. 1313-1316.
7. Herzenberg L.A. B-1 cells: the lineage question revisited // Immunol. Rev. — 2000. — Vol. 175. — P. 9-22.
8. Julius P. Jr., Kaga M., Palmer Y., Vyas V., Prior L., Delice D., Riggs J. Recipient age determines the success of intraperitoneal transplantation of peritoneal cavity B cells // Immunology. — 1997. — Vol. 91, N 3. — P. 383-390.
9. Kantor A.B., Herzenberg L.A. Origin of murine B cell lineages // Annu. Rev. Immunol. — 1993. — Vol. 11. — P. 501-538.
10. Kantor A.B., Stall A.M., Adams S., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 3320-3324.
11. Kawahara T., Ohdan H., Zhao G., Yang Y.G., Sykes M. Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells // J. Immunol. — 2003. — Vol. 171, N 10. — P. 5406-5414.
12. Klinman D.M., Holmes K.L. Differences in the repertoire expressed by peritoneal and splenic Ly-1 (CD5)⁺ B cells // J. Immunol. — 1990. — Vol. 144, N 12. — P. 4520-4525.
13. Kretschmer K., Jungebloud A., Stopkiewicz J., Stoermann B., Hoffmann R., Weiss S. Antibody repertoire and gene expression profile: Implications for different developmental and functional traits of splenic and peritoneal B-1 lymphocytes // J. Immunol. — 2003. — Vol. 171. — P. 1192-1201.
14. McIntyre T.M., Holmes K.L., Steinberg A.D., Kastner D.L. CD5⁺ peritoneal B cells express high levels of membrane, but not secretory, C mu mRNA // J. Immunol. — 1991. — Vol. 146, N 10. — P. 3639-3645.
15. Mond J.J., Vos Q., Lees A., Snapper C.M. T cell independent antigens // Curr. Opin. Immunol. — 1995. — Vol. 7, N 3. — P. 349-354.
16. Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor // Nat. Immunol. — 2006. — Vol. 7, N 3. — P. 293-301.
17. Murakami M., Tsubata T., Shinkura R., Nisitani S., Okamoto M., Yoshioka H., Usui T., Miyawaki S., Honjo T. Oral administration of lipopolysaccharides activates B-1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse // J. Exp. Med. — 1994. — Vol. 180, N 1. — P. 111-121.
18. Prior L., Pierson S., Woodland R.T., Riggs J. Rapid restoration of B-cell function in XID mice by intravenous transfer of peritoneal cavity B cells // Immunology. — 1994. — Vol. 83, N 2. — P. 180-183.
19. Sidorova E.V., Li-Sheng L., 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. Lett. — 2003. — Vol. 88, N 1. — P. 37-42.
20. Tumang J.R., Hastings W.D., Bai C., Rothstein T.L. Peritoneal and splenic B-1 cells are separable by phenotypic, functional, and transcriptomic characteristics // Eur. J. Immunol. — 2004. — Vol. 34, N 8. — P. 2158-2167.
21. Tung J.W., Herzenberg L.A. Unraveling B-1 progenitors // Curr. Opin. Immunol. — 2007. — Vol. 19, N 2. — P. 150-155.
22. Whitmore A.C., Haughton G., Arnold L.W. Phenotype of B cells responding to the thymus-independent type-2 antigen polyvinylpyrrolidone // Int. Immunol. — 1996. — Vol. 8, N 4. — P. 533-542.
23. Сидорова Е.В. Что нам известно сегодня о В-клетках // Успехи современной биологии. — 2006. — № 3. — С. 227-241.

поступила в редакцию 27.07.2007

принята к печати 15.09.2007