

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК С В-ЛИМФОЦИТАМИ ПРИ ОТВЕТЕ НА Т-НЕЗАВИСИМЫЕ АНТИГЕНЫ

Хоченков Д.А., Гаврилова М.В.

НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН, Москва

Резюме. Участие ДК в индукции иммунного ответа на тимус-независимые антигены второго типа (ТН-2 АГ) мало изучено. В настоящей работе исследовали взаимодействие ДК с ТН-2 АГ- полисахаридом S3 пневмококка и поливинилпирролидоном с мол. массой 360 кДа (ПВП-360) и роль ДК, нагруженных АГ, в инициации иммунного ответа. Культивирование наивных ДК с S3 и ПВП приводило к активации ДК, выражающейся в увеличении числа CD80- и CD86-позитивных клеток. ДК, связавшие ТН-2 АГ, смешивали с нормальными спленоцитами мышей, культивировали в течение 4 сут. и определяли количества антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток (АОК и ИГОК, соответственно) с помощью ELISPOT. Добавление ДК, нагруженных ТН-2 АГ, приводило к увеличению специфического иммунного ответа в 2-2,7 раз; индуцированный антигеном поликлональный ответ увеличивался примерно на 40%. Полученные данные свидетельствуют о прямом взаимодействии ТН-2 антигена с ДК и презентации его спленоцитам, приводящей к специфической и поликлональной активации В клеток. Было установлено, что основную роль в ответе играют В-1 клетки. Разделение спленоцитов и нагруженных ДК при помощи полупроницаемых мембран снижает иммунный ответ.

Ключевые слова: дендритные клетки, полисахарид S3 *Streptococcus pneumoniae*, поливинилпирролидон, Т-независимые антигены типа 2, индукция иммунного ответа *in vitro*.

Khochenkov D.A., Gavrilova M.V.

INTERACTION BETWEEN DENDRITIC CELLS AND B CELLS DURING IMMUNE RESPONSE TO T CELL-INDEPENDENT ANTIGENS

Abstract. Involvement of dendritic cells (DC) into switching of immune response to T-independent type 2 antigens (TI2 antigens) is poorly studied. The present study addressed some interactions between DCs and TI2-type antigens, i.e., with *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide type 3 (S3), and polyvinylpyrrolidone (PVP, mw. of 360 kDa), as well as a role of antigen-loaded DCs for triggering the immune response. Short-term treatment of DCs with TI-2 antigens induced their activation manifesting as an increase in numbers of CD80- and CD86-positive cells under the cell culture conditions. DCs loaded with TI-2 antigens were then mixed with normal murine splenocytes and cultured in complete RPMI 1640 medium for 4 days. The numbers of antibody- and immunoglobulin-forming cells (AFCs and IFCs, respectively) were determined by ELISPOT assay. Supplementation with TI2-treated DCs induced a 2.0 to 2.7-fold increase in specific immune response. Antigen-induced polyclonal response was enhanced by 40%. These data suggest a direct interaction between DCs and TI-2 antigens, and their presentation to murine splenocytes, thus leading to both specific and polyclonal B cell activation. B-1 cells are shown to play a main role in such response. Separation of loaded DC and splenocytes by semi-permeable membranes caused inhibition of this immune response. (*Med. Immunol., 2012, vol. 14, N 1-2, pp 51-58*)

Keywords: dendritic cells, *Streptococcus pneumoniae* S3 polysaccharide, polyvinylpyrrolidone, T cell-independent type 2 antigens, immune response, *in vitro* induction.

Адрес для переписки:

Хоченков Дмитрий Александрович
111395, Москва, ул. Красный Казанец, 5, кв. 41.
Тел.: (499) 374-20-01, (495) 674-08-42.
E-mail: khochenkov@gmail.com

Введение

В зависимости от характера взаимодействия с клетками иммунной системы антигены (АГ) подразделяются на Т-зависимые (ТЗ)

и Т-независимые (ТН) АГ. К ТЗ-АГ относятся полипептиды, эритроцитарные АГ, вирусные белки. Для индукции иммунного ответа на них требуется кооперация В- и Т-клеток иммунной системы. ТН-АГ стимулируют синтез антител (АТ) в отсутствие МНС-II рестриктированной Т-помощи. Эти АГ, в свою очередь, подразделяется на 2 большие группы – ТН-1 и ТН-2 АГ. Основным свойством ТН-1 АГ является их митогенная активность. Они способны неспецифически активировать В-лимфоциты, либо реагируя с ВСР в участке, отличном от АГ-связывающего центра, либо влияя на В-лимфоцит через альтернативные рецепторы. К ТН-1 АГ относятся бактериальные липополисахариды (ЛПС), белок А стафилококка, и ряд др. [10, 11].

Группу ТН-2 Аг составляют иммуногены различной природы. Это – бактериальные полисахариды, некоторые высокомолекулярные упорядоченные белки (бактериальный полимеризованный флагеллин, коллаген), синтетические D-полипептиды, поливинилпирролидон, некоторые вирусные компоненты и т.д. Несмотря на значительное химическое разнообразие ТН-2 АГ они обладают рядом общих черт. Так, для них характерна высокая молекулярная масса (обычно более 100 кДа) и наличие повторяющихся эпитопов, расположенных на расстоянии 5-10 нм друг от друга [3]. Для распознавания поливалентного АГ и последующего связывания его с мембранными Ig (mIg) существенна жесткость структуры молекулы.

Дендритные клетки (ДК) представляют собой наиболее эффективные антиген-презентирующие клетки, наделенные способностью захватывать, процессировать и презентировать антигены Т- и В-лимфоцитам и инициировать первичный иммунный ответ.

Наличие у ДК способности к «сохранению» захваченных АГ в течение достаточно длительного времени позволяет им переносить АГ с периферии во вторичные лимфоидные органы. Wykes et al. на модели переноса примированных DNP-KLH ДК наивным реципиентам показали, что *in vivo* ДК, нагруженные АГ, могут сохранять его в нативном состоянии не менее 24 ч и вызывать у реципиентов DNP-специфический иммунный ответ [14].

На участие ДК в иммунном ответе на ТН-2 АГ указывают опыты с нагрузкой ДК интактными *Streptococcus pneumoniae in vitro* и последующим переносом наивным реципиентам, в которых была показана инициация первичного АТ ответа и к капсульному белку, и к капсульному полисахариду и фосфорилхолину [6]. Ответ на полисахаридные АГ был связан преимущественно с IgM и IgG3 классами; пик титра АТ достигался

на 7-й день. Ненагруженные ДК такой способностью не обладали.

Balazs et al. показали, что CD11c^{low} ДК селезенки эффективно захватывают бактерии и стимулируют АГ-специфичные В-лимфоциты маргинальной зоны селезенки к дифференцировке в IgM-секретирующие плазмобласты [4].

Ранее нами было показано, что ДК, нагруженные декстраном (Dex) *Leuconostoc mesenteroides*, вызывают иммунный ответ *in vitro* [2].

Цель настоящей работы состояла в выяснении роли ДК в специфическом и поликлональном ответе на два других ТН-2 АГ: поливинилпирролидон и полисахарид S3 *Streptococcus pneumoniae*.

Материалы и методы

Животные, антигены, антитела

В опытах использовали самок мышей линии СВА весом 16-18 г, полученных из Научного центра биомедицинских технологий РАМН, филиал «Андреевка».

В качестве ТН-2 АГ использовали полисахарид S3 *Streptococcus pneumoniae* (S3), полученный от проф. Бейкера (за что приносим ему глубокую благодарность), поливинилпирролидон с молекулярной массой 10 и 360 кДа (ПВП-10 и ПВП-360, соответственно («Sigma», США). Для неспецифической стимуляции ДК использовался липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli* («Sigma», США).

Получение и активация ДК Т-независимыми антигенами

ДК получали по методу М.В. Lutz [9] с незначительными изменениями. Вкратце: из костного мозга мышей выделяли клетки-предшественники и культивировали их в течение 10 сут в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), рекомбинантный мышинный гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) 25 мкг/мл, («Biosource», США) и все необходимые добавки, в чашках Петри для суспензионных культур («Corning», США). Исходная (посевная) концентрация клеток при внесении в культуру составляла 250×10^3 клеток/мл, объем полной среды 4 мл. На 3-й день культивирования в чашки добавляли равное количество полной среды; в дальнейшем каждые 2 дня заменяли 50% среды.

Нагрузку ДК проводили, инкубируя клетки с ТН-2 АГ в концентрации 100 мкг/10⁶ ДК в течение 24 час. при 37 °С и 5% CO₂. Для получения неспецифически активированных ДК клетки инкубировали с ЛПС *E. coli* в концентрации 2 мкг/10⁶ ДК в течение 24 час. при 37 °С и 5% CO₂.

Фенотип ДК определяли с помощью проточной цитометрии. При этом использовали следующие флуоресцентные конъюгаты антител

к поверхностным АГ: I-A^k-FITC (11-5.2), CD11c-PE (HL3) («BD Pharmingen», США), CD80-PE (RMMP-1) и CD86-PE (RMMP-2) («Caltag», Великобритания).

Получение суспензии спленоцитов и субпопуляций В-клеток

Моноклеточную суспензию спленоцитов получали, гомогенизируя селезенку в среде RPMI-1640 («Gibco», США). Клетки осаждали центрифугированием при +4 °С (1500 об/мин, 10 мин). Осадок ресуспендировали и удаляли эритроциты гипотоническим шоком: к осадку добавляли 900 мкл дистиллированной H₂O и перемешивали 10 сек., затем добавляли 100 мкл 10-кратного раствора Хэнкса с феноловым красным (МПБП, Россия). После лизиса эритроцитов спленоциты осаждали и дважды отмывали средой RPMI-1640.

Для получения разных субпопуляций лимфоцитов использовали метод иммуномагнитной сепарации («Miltenyi», США). В-1 клетки выделяли из перитонеальной полости мышей СВА; В-2 клетки — из селезенки. Чистоту субпопуляций В-клеток и их выход анализировали с помощью проточной цитометрии на Beckman Coulter EPICS XL («Beckman Coulter», США).

Культивирование клеток *in vitro*

Для определения функциональной активности ДК, нагруженных ТН-2 АГ, в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов («Nunc», Дания) вносили по 10×10^5 спленоцитов и 2×10^5 ДК (соотношение 5:1) и культивировали клетки в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), и все необходимые добавки при +37 °С, 5% CO₂ в течение 4 сут. По окончании инкубации клетки собирали и дважды отмывали в RPMI 1640. В полученных суспензиях определяли число антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток (АОК и ИГОК, соответственно) методом клеточного иммуноферментного анализа (ELISPOT). В качестве контроля использовали культуры, содержащие только спленоциты, спленоциты и ТН-2 АГ, ненагруженные ДК и спленоциты, ДК, активированные ЛПС.

Аналогичным образом культивировали ДК с В-1 клетками перитонеальной полости и В-2 клетками селезенки.

Для отдельного культивирования ДК со спленоцитами использовали поликарбонатные мембранные вставки Millicell («Millipore», США) и 24-луночные плоскодонные планшеты («Nunc», Дания). В лунки 24-луночного планшета вносили по 60×10^5 спленоцитов, а в мембранные вставки — 12×10^5 ДК, нагруженных ТН-2 АГ. Вставки помещали в лунки планшета и культивировали смесь клеток в полной среде при +37 °С, 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе в течение 4 суток.

Клеточный иммуноферментный анализ (ELISPOT)

Количество АОК и ИГОК определяли с использованием нитроцеллюлозных планшетов («Millipore», США), которые сенсibilizировали ТН-2 АГ (для выявления АОК) или козьими антителами к Ig мыши (Caltag) (для выявления ИГОК), как описано ранее [2]. Число окрашенных зон (ИГОК и АОК) подсчитывали на нитроцеллюлозных дисках под микроскопом и пересчитывали на 10^6 спленоцитов.

Статистическая обработка экспериментов

Результаты экспериментов представлены в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения ($M \pm SD$). Достоверность различий результатов опытов по совместному культивированию различных клеток исследовали при помощи дисперсионного анализа. Различия рассматривались как значимые при $p < 0,0001$.

Результаты

Влияние ТН-2 антигенов на созревание ДК

Фенотип $\geq 90\%$ незрелых ДК после 10 дней культивирования клеток костного мозга в среде RPMI-1640 с 10% ЭТС, GM-CSF и всеми необходимыми добавками представлен на рисунке 1А.

Нагрузка ДК S3 *in vitro* вызывает созревание ДК (рис. 1Б), что выражается в увеличении экспрессии CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), по сравнению с нормой. Так, исходно культуры ДК содержали 96, 86, 13 и 45% клеток, позитивных по МНС-II, CD11c, CD80 и CD86, соответственно. После добавления S3 количество позитивных по этим маркерам клеток составило 94, 83, 51 и 96%. Увеличение числа CD80- и CD86-позитивных клеток более чем в 2 раза свидетельствует об активации ДК.

Созревание ДК при нагрузке ПВП-360 было менее значительным (рис. 1В); число CD80- и CD86-позитивных клеток не превышало 31% и 57% соответственно. Таким образом, сколь угодно существенной активации ДК при культивировании их с ПВП-360 не происходило

Индукция иммунного ответа *in vitro* ДК, нагруженными ТН-2 АГ

Для определения иммуногенных свойств ДК, нагруженных S3 или ПВП, клетки смешивали с нормальными спленоцитами мышей в соотношении 1:5 и культивировали в полной среде RPMI-1640 в течение 4 дней. Культуры, содержащие только спленоциты, спленоциты и ТН-2 АГ, ненагруженные ДК и спленоциты, и ДК, активированные ЛПС, использовали в качестве контролей. Иммуногенные свойства ДК, нагруженных ТН-2 АГ, определяли, сравнивая количества АОК и ИГОК на 10^6 спленоцитов в опытных и контрольных пробах (рис. 2).

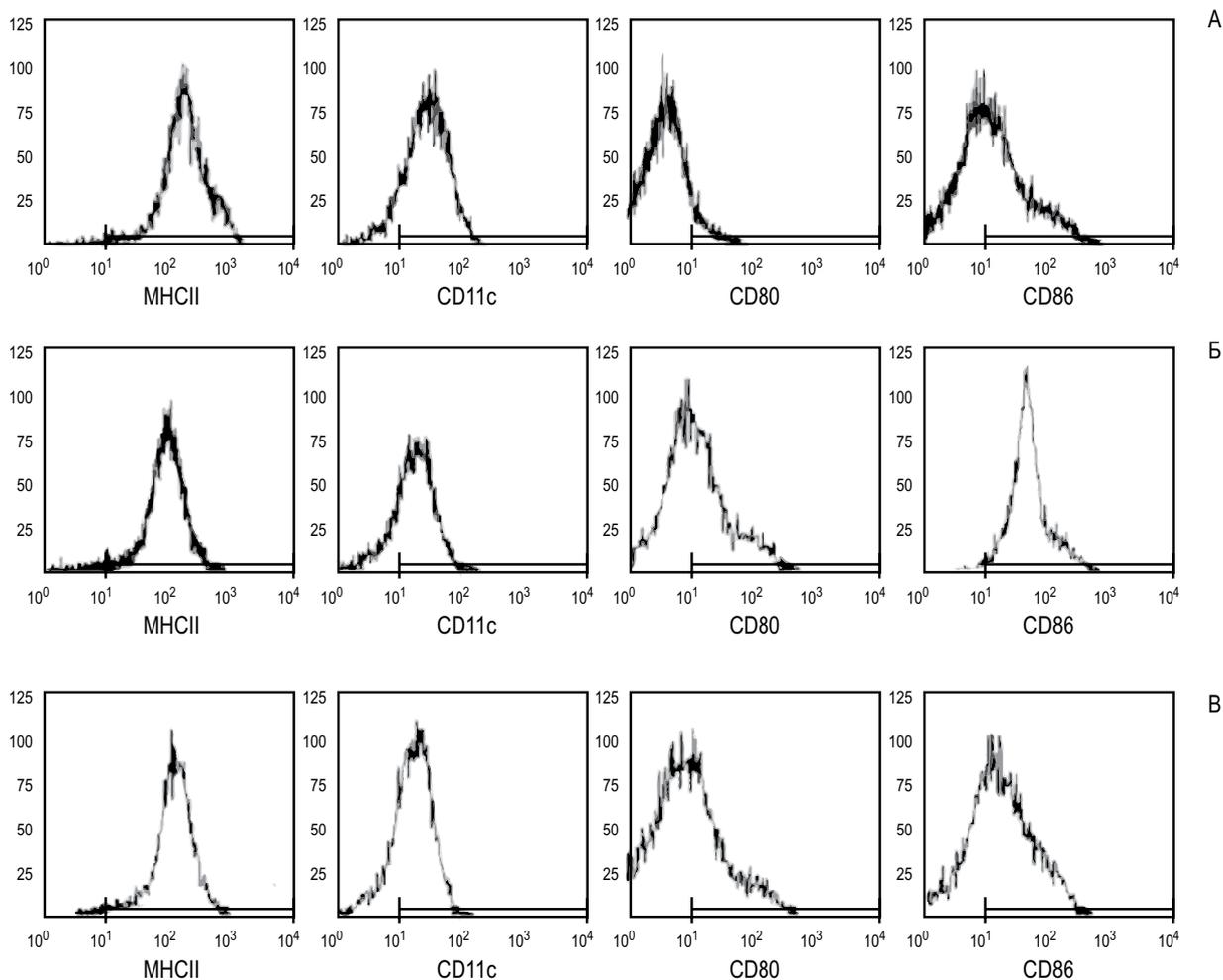


Рисунок 1. Активация ДК под действием ТН-2 Аг. Экспрессия поверхностных маркеров: на ненагруженных ДК (А), на ДК, нагруженных S3 (Б), на ДК, нагруженных ПВП-360 (В)

Приведенные на рисунке 2 данные свидетельствуют о том, что ДК, нагруженные S3 в концентрации 100 мкг/10⁶ ДК, вызывают образование АОК: их количество возрастало в 2,7 раза (с 73±10 до 196±9 на 10⁶ спленоцитов) по сравнению с нормой (рис. 2А). Ненагруженные ДК дают незначительное (103±18 на 10⁶ спленоцитов) увеличение числа АОК. ДК, активированные классическим активатором – ЛПС, вызывают поликлональную активацию В лимфоцитов и увеличивают количе-

ство АОК к разным АГ, в том числе и к S3 (Число АОК достигает 133±27 на 10⁶ клеток). Разделение спленоцитов и нагруженных S3 ДК полупроницаемой мембраной значительно снижает количество образующихся АОК (112±20) по сравнению с таковым при совместном культивировании ДК и спленоцитов.

Поликлональная активация спленоцитов под действием ДК, нагруженных S3, была незначительной – увеличение количества ИГОК не пре-

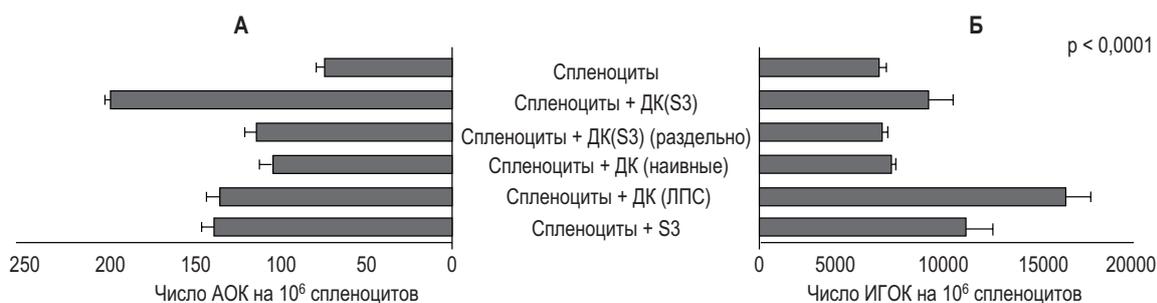


Рисунок 2. Образование АОК (А) и ИГОК (Б) дендритными клетками, нагруженными S3 (M±SD)

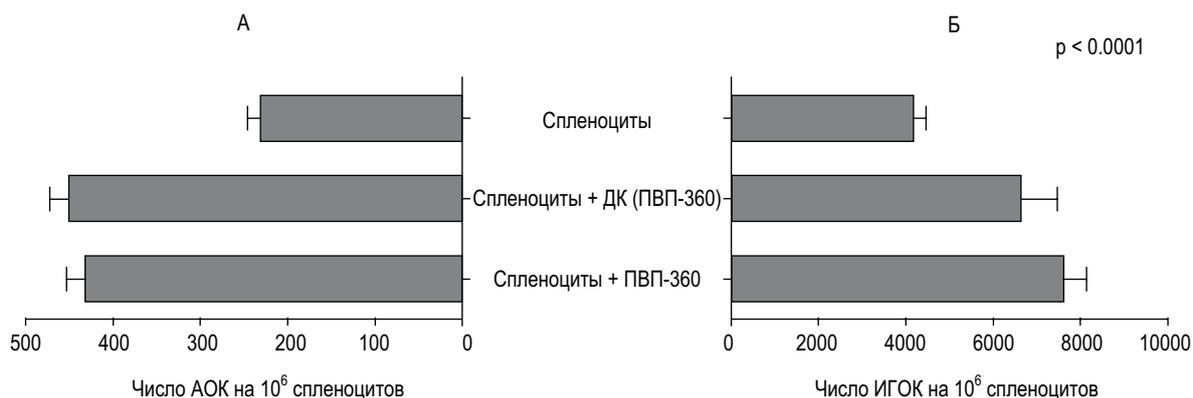


Рисунок 3. Стимуляция образования АОК (А) и ИГОК (Б) дендритными клетками, нагруженными ПВП-360 ($M \pm SD$)

вышло 40% (9140 ± 1284 против 6440 ± 512 на 10^6 спленоцитов в норме). Удивительно, что ненагруженные ДК практически не индуцировали увеличения числа ИГОК, при том, что просто добавление S3 или добавление нагруженных S3 ДК к суспензии спленоцитов такое увеличение вызывали. ДК, стимулированные при помощи ЛПС, вызывали увеличение числа ИГОК более чем в 2,5 раза (до 16400 ± 1350).

ДК, нагруженные ПВП-360 в концентрации $100 \text{ мкг}/10^6$ клеток также индуцировали образование АОК (рис. 3); их количество возрастало примерно в 2 раза (451 ± 22 против 230 ± 16 на 10^6 спленоцитов) и было сходно с таковым при прямой стимуляции спленоцитов ПВП-360. Число ИГОК при этом возрастало на 60% (6672 ± 798 против 4200 ± 275).

Как и в опытах с ДК (S3), стимуляция спленоцитов ДК (ПВП-360) индуцировала немного меньший поликлональный ответ, чем стимуляция их просто ПВП-360.

ТН-2 АГ обычно имеют очень большой молекулярный вес, более 100 кДа. Молекулы меньшего размера значительно менее иммуногены. Известно, однако, что ДК могут увеличивать иммуногенность небольших полимерных молекул. Мы сравнили иммуногенность ДК, нагруженных ПВП-360 и ПВП-10 (мол. вес 360 кДа и 10 кДа). Спленоциты, культивированные со свободными АГ использовались в качестве контроля. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

Из представленных на рисунке 4 данных видно, что по сравнению со свободным ПВП-10, практически не вызывающим иммунного ответа, ДК, нагруженные ПВП-10 индуцируют ответ, сравнимый с ответом на ПВП-360. Это означает, что иммуногенность небольших ТН-2 АГ может увеличиваться за счет иммуностимулирующего действия ДК.

Взаимодействие ДК с В-1 и В-2 клетками

В предыдущем разделе были представлены опыты по индукции образования АТ и ИГ ДК,

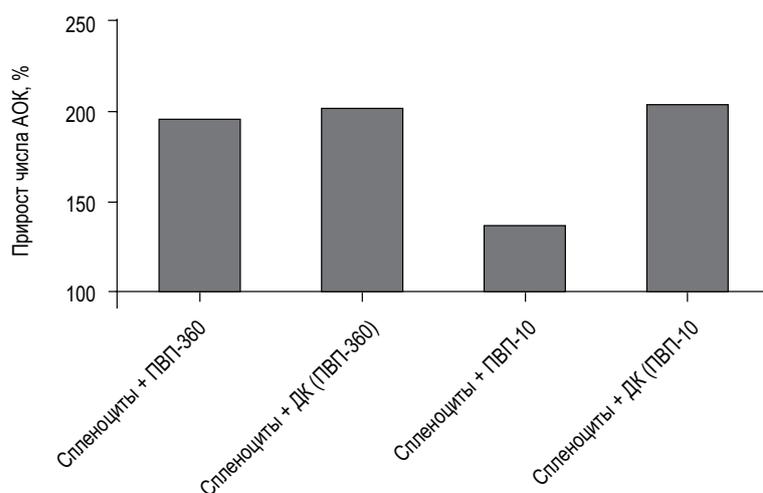


Рисунок 4. Относительный прирост числа АОК, индуцированный ПВП-10 и ПВП-360, и ДК, нагруженными ПВП-10 или ПВП-360

Примечание. Число нормальных спленоцитов принято за 100%.

нагруженными ТН-2 АГ, в спленоцитах мышей СВА. В то же время спленоциты представляют смесь клеток, продуцентами АГ в которой являются В клетки. Основной субпопуляцией В лимфоцитов в селезенке являются В-2 клетки (около 95% В-лимфоцитов). В-1 клетки составляют минорную субпопуляцию, не превышающую 2%.

Перитонеальные клетки мышей СВА представлены и теми, и другими типами В клеток с преобладанием В-1 лимфоцитов. Ранее было показано, что основную роль в иммунном ответе на ТН-2 АГ играют CD5⁺ В-1 клетки селезенки [12, 13]. Чтобы выяснить, какая субпопуляция В клеток мышей СВА участвует в ответе при индукции ответа ДК, нагруженными S3, их смешивали с В-1 и В-2 клетками в соотношении 1:5 и культивировали в полной среде в течение 4 дней. Иммунный ответ на S3 представлен на рисунке 5.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что под влиянием ДК, нагруженных S3, в культурах В-1 клеток число АОК увеличивается в 2,8 раза (с 116 ± 20 в норме до 327 ± 52 на 10^6 В клеток); в культурах В-2 клеток, напротив, прирост АОК был незначителен – на 18% (с 76 ± 11 в норме до 90 ± 14 на 10^6 В клеток), Число ИГОК при совместном культивировании увеличивалось в обоих случаях: на 17% для В-1 клеток и на 37% для В-2 клеток.

Обсуждение

Согласно современным представлениям, незрелые ДК, обладающие высокой способностью к эндоцитозу, при поглощении АГ индуцируются к созреванию. На поверхности ДК появляются костимулирующие молекулы: CD40, CD80 и CD86, и ДК превращаются в эффективные антиген-презентирующие клетки, продуцирующие необходимые для активации наивных Т-лимфоцитов цитокины. Участие ДК в ответе на ТН-АГ детально не исследовано. Использование S3 и ПВП в проведенных нами опытах прямо

показало, что ТН-2 АГ также активируют ДК, что подтверждается увеличением экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86.

Иммуногенная активность ДК, связывающих разные ТН-2 АГ, неодинакова. Так, примированные S3 ДК индуцируют появление АОК, число которых по сравнению с нормой возрастает примерно в 2,7 раза, а примированные ПВП-360 ДК индуцируют не более двукратного увеличение количества АОК.

Данные опытов с ДК, активированными ЛПС (поликлональный активатор) свидетельствуют о том, что часть АОК к ТН-2 АГ появляется в результате неспецифической стимуляции В клеток цитокинами активированных ДК. Однако, во всех случаях количества АОК, индуцированных ДК, связавшими ТН-2 АГ, была выше, чем их число, появившееся в результате поликлональной (неспецифической) активации или под действием просто добавленных к спленоцитам ТН-2 АГ. Полученные данные подтверждают результаты проведенных ранее опытов с декстраном [2]. Можно предположить, что связывание ДК ТН-2 АГ, повышает их иммуногенность.

Одной из причин более низкого ответа в присутствии ДК, нагруженных ПВП-360, по сравнению с таковым на ДК, сенсibilизированные полисахаридами, может являться отсутствие на ДК специфических рецепторов к ПВП-360. Как известно, на ДК имеется ряд рецепторов к полисахаридам, представленных семейством лектинов С-типа (включая маннозный рецептор) [8]. Захват АГ, посредством рецепторов, происходит более эффективно по сравнению с неспецифическим эндоцитозом. Это подтверждается данными по связыванию конъюгата овальбумина (ОА) и моноклональных АГ к лектино-подобному рецептору DEC-205 (CD205). Иммунизация таким конъюгатом приводила к в 100-1000 раз более эффективному захвату и презентации ОА, чем иммунизация раство-римым ОА [5]. Возможно, в случаях с полисахаридными ТН-2 АГ захват АГ

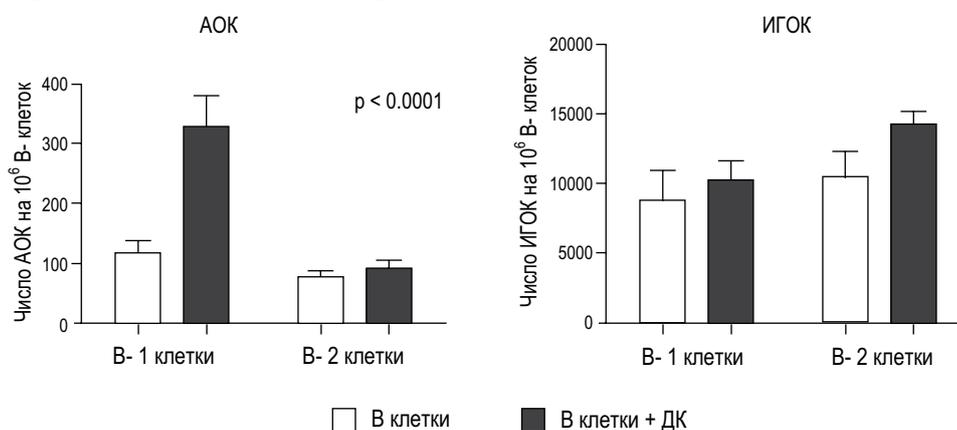


Рисунок 5. Иммунный ответ В клеток мышей СВА на S3 *in vitro* (M±SD)

происходит с помощью рецепторов, а в случае с ПВП-360 он осуществляется посредством неспецифического эндоцитоза. К сожалению, проверить предположение о различных механизмах захвата полисахаридов и ПВП-360 в отсутствие меченного флуорохромом ПВП не удастся, а способы получения такого конъюгата не описаны.

В опытах с ПВП выявился еще один интересный факт. Уже говорилось, что одним из свойств, определяющих иммуногенность ТН-2 АГ, является размер молекулы; низкомолекулярные АГ, как правило, менее иммуногенны. В нашем случае полимеры ПВП-10 и ПВП-360 состояли из олигомеров одинаковой структуры и различались только по молекулярной массе. Внесение в культуру спленоцитов ПВП-10 увеличивало число АОК по сравнению с нормальными спленоцитами не более, чем на 40%, в то время как при иммунизации ПВП-360 это увеличение было двукратным. В то же время при культивировании спленоцитов с ДК, нагруженными ПВП-10, увеличение числа АОК оказалось, таким же, как при нагрузке ДК ПВП-360, т.е. также двукратным. Это свидетельствует о том, что ДК могут увеличивать иммуногенность низкомолекулярного АГ. Механизм этого пока неясен.

Ранее было показано, что фолликулярные ДК могут имитировать действие ТН-2 АГ, содержащихся в иммунных комплексах моноклональных АТ и АГ. Связывая такие комплексы через рецепторы к Fc-фрагментам АТ и «выстраивая» таким образом, решетку из повторяющихся поверхностных детерминант, ДК имитируют ТН-2 АГ и вызывают к ним иммунный ответ [7]. Если предположить, что в культурах спленоцитов содержатся нормальные АТ к низкомолекулярному ПВП-10, то вклад в иммунный ответ на этот АГ может осуществляться и за счет связывания таких гипотетических комплексов с ДК и их активации.

Обсуждаемые выше результаты были получены при использовании в качестве «модели» спленоцитов мыши. Известно, однако, что в селезенке присутствуют три субпопуляции В-клеток – В-1, В-2 и МZ-В, отличающиеся по своим свойствам и спектру специфичностей [1]. В-2 лимфоциты составляют при этом ~ 95% всех В-клеток, а В-1 и МZ-В клетки – не более 5%. В перитонеальной области преобладают В-1 клетки (примерно 35-70% всех В-лимфоцитов).

Установлено, что основными продуцентами АТ к ТН-2 АГ являются В-1 клетки [12, 13]. В настоящих опытах были получены сходные данные: внесение в культуру В-1 клеток ДК, нагруженных S3, увеличивало число АОК (в 2,8 раза), в то время как добавление их к В-2 клеткам, увеличивало число АОК незначительно (на 18%) по сравне-

нию с нормальными В-1 и В-2 клетками, соответственно.

ДК, примированные ТН-2 АГ, индуцировали в культурах спленоцитов не только появление специфических АОК, но и поликлональный ответ 9140 ± 1284 против 6440 ± 512 на 10^6 спленоцитов в норме). По сравнению с поликлональной активацией, вызываемой свободными ТН-2 АГ *in vitro* или при стимуляции спленоцитов ДК, нагруженными ЛПС, ответ, индуцируемый сенсibilизированными ТН-2 АГ ДК, оказался ниже. Это свидетельствует о том, что стимуляция В-клеток нагруженными ДК является более специфической, чем стимуляция свободными ТН-2 АГ или ЛПС.

Индукция иммунного ответа ДК, нагруженными ТН-2 АГ, требует непосредственного контакта с В-клетками. Разделение ДК и В-клеток полупроницаемой мембраной приводит к снижению числа АОК и ИГОК в культурах, по сравнению с числом АОК и ИГОК при непосредственном взаимодействии нагруженных ДК и спленоцитов.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что ДК, нагруженные различными ТН-2 АГ вызывают иммунный ответ спленоцитов при непосредственном контакте с ними. При взаимодействии с ДК, нагруженными ТН-2, В-1 клетки подвергаются более сильной активации по сравнению с В-2 клетками.

Благодарности

Авторы сердечно благодарят проф. Е.В. Сидорову за обсуждение и помощь при написании статьи.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 08-04-00233-а).

Список литературы

1. Сидорова Е.В. Субпопуляции В-лимфоцитов и их функциональная роль // Успехи современной биологии. – 2002. – Т. 122, № 5. – С. 467-479.
2. Хоченков Дм. А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2 // Биол. Мембраны. – 2010. – Т. 27. – С. 1-6.
3. Bachmann M.F., Zinkernagel R.M. Neutralizing antiviral B cell responses // Annu. Rev. Immunol. – 1997. – Vol. 15. – P. 235-270.
4. Balazs M., Martin F., Zhou T., Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses // Immunity. – 2002. – Vol. 17. – P. 341-352.

5. Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196. – P. 1627-1638.
 6. Colino J., Shen Y., Snapper C.M. Dendritic cells pulsed with intact streptococcus pneumoniae elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses *in vivo* through distinct mechanisms // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 195. – P. 1-13.
 7. El Shikh M.E., El Sayed R.M., Sukumar S., Szakal A.K., Tew J.G. Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells // *Trends Immunol.* – 2010. – Vol. 31. – P. 205-211.
 8. Engering A.J., Cella M., Fluitsma D., Brockhaus M., Hoefsmit E.C., Lanzavecchia A., Pieters J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* 1997. – Vol. 27. – P. 2417-2425.
 9. Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rssner 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. – P. 77-92.
 10. Mond J.J., Lees A., Snapper C. T cell-independent antigens type 2 // *Annu. Rev. Immunol.* – 1995. – Vol. 13. – P. 655-692.
 11. Mond J.J., Scher I., Mosier D.E., Baese M., Paul W.E. T independent responses in B cell defective CBA/N mice to Brucella abortus and to trinitrophenyl (TNP) conjugates of Brucella abortus // *Eur. J. Immunol.* – 1978. – Vol. 8. – P. 459-463.
 12. 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 // 2003. *Immunol. Lett.* – Vol. 88. – P. 37-42.
 13. Whitmore A.C., Neely H.R., Diz R., Flood P.M. Rapid induction of splenic and peritoneal B-1a cells in adult mice by thymus independent type 2 antigen. *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 173. – P. 5406-5414.
 14. Wykes M., Pombo A., Jenkins C., MacPherson G.G. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T dependent response // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 1313-1319.
- поступила в редакцию 21.05.2011*
отправлена на доработку 06.06.2011
принята к печати 09.06.2011