

Антигеннеспецифическая хелперная и супрессорная активность Т-лимфоцитов крови кроликов в динамике развития иммунного ответа на гетероэритроциты

В поддержании иммунного гомеостаза организма в норме и в регуляции иммунного ответа на гетероантигены в числе ряда факторов существенная роль принадлежит регуляторным иммунокомпетентным клеткам — антигенспецифическим и антигеннеспецифическим Т-хелперам и Т-супрессорам. Т-хелперы включают В-лимфоциты в пролиферацию и дифференцировку, обеспечивающую накопление клона зрелых антителопродуцентов [14]. Т-супрессоры обеспечивают тонкую регуляцию иммунного ответа [9], активируясь при развитии иммунного ответа по механизму обратной связи и поддерживая гомеостаз в условиях антигенного раздражения [5]. Они являются также хранителями толерантности организма к собственным антигенам [6]. Считают, что Т-супрессоры блокируют образование антител за счет либо прямого действия на В-клетки, либо опосредованного — через инактивацию Т-хелперов [3, 17, 19]. Т-хелперы и Т-супрессоры считаются отдельными клеточными популяциями, имеющими специфические маркеры. Однако в последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что одни и те же Т-клетки могут обладать двойным иммунорегуляторным потенциалом [8], проявление которого зависит, в частности, от соотношения Т- и В-лимфоцитов [18].

В развитии иммунного ответа на тимусзависимые антигены от баланса антигеннеспецифических Т-хелперов и Т-супрессоров могут в значительной мере зависеть сила и длительность иммунного ответа, а также особенности развития вторичного иммунного ответа по сравнению с первичным. Вопрос этот изучен недостаточно.

Цель наших исследований — определение активности антигеннеспецифических Т-хелперов и Т-супрессоров крови кроликов в динамике первичного и вторичного иммунных ответов на эритроциты барана (ЭБ).

Методика

Работа выполнена на 24 кроликах породы шиншилла массой 2—3 кг. Первичный иммунный ответ вызывали однократным внутривенным введением ЭБ ($1,5 \cdot 10^{10}$ кг). Для получения вторичного иммунного ответа ЭБ в такой же дозе вводили повторно через 30 сут после первичной иммунизации. До иммунизации, а затем на 2-, 9-, 16- и 30-е сутки после первичного и вторичного введений ЭБ в сыворотке крови кроликов определяли титр гемолизина [15], а также хелперную и супрессорную активность Т-лимфоцитов крови в реакции бласттрансформации (РБТ) на поликлональные митогены — конканавалин А (Кон А) и фитогемагглютинин (ФГА) [7]. Источником лимфоцитов служила цельная кровь, взятая из ушной вены кролика. При постановке реакции использовали короткоживущую смешанную культуру аллогенных клеток. Низкая активность смешанной культуры [11] — характерная особенность лимфоцитов периферической крови кроликов, которую использовали для решения поставленной задачи. Согласно данным литературы [12], культивирование Т-лимфоцитов с Кон А различной концентрации (низкой или высокой) в течение 48 ч приводит к активации Т-хелперов или Т-супрессоров соответственно. На первом этапе реакции для стимуляции Т-супрессоров в культуре клеток применяли Кон А (фирма «Serva») в дозе 60 μ /мл [16], для стимуляции Т-хелперов — в дозе 8 μ /мл питательной среды. Стимулирующая доза для хелперов подобрана нами экспериментально и явилась оптимальной для стимуляции Т-хелперов крови кроликов. После окончания первого этапа реакции клетки, культивированные с Кон А (опытные пробы), и клетки, культивированные без митогена (кон-

трольные пробы), обрабатывали митомицином С (фирма «Sigma») в дозе 25 μ /мл питательной среды, инкубировали в течение 45 мин при температуре 37 °С, после чего трехкратно отмывали средой 199, приготовленной на растворе Хенкса (рН 7,2). Отмытые «стимулирующие» клетки соединяли с интактными аутологичными лимфоцитами («отвечающие» клетки) в соотношении 1:1. На втором этапе реакции для индукции пролиферации «отвечающих» клеток тест-культуры применяли ФГА (фирма «Difco») в дозе 2 μ /мл [1]. Исследования проводили в трех параллельных пробах. Уровень пролиферации клеток определяли по включению ^3H -тимидина, который вносили в культуры за 4 ч до окончания инкубации. Осаждение клеток, меченных ^3H -тимидином, проводили по методике, описанной Назаровым и Пуриным [13], количество включенной метки (имп/мин) подсчитывали на стинцилляционно-жидкостном счетчике «Rackbeta-1217» (фирма «ЛКВ», Швеция). Функциональную активность иммунорегуляторных клеток оценивали по угнетению (индекс супрессии — ИС) или активации (индекс активации — ИА) пролиферации лимфоцитов в тест-культуре. Расчет производили по следующей формуле [2]: ИС или ИА = $(1 - \frac{0}{K}) \cdot 100\%$, где 0 — число импульсов в минуту в опытных пробах, K — число импульсов в минуту в контрольных пробах.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что при использовании низкой и высокой доз Кон А в части случаев наблюдается двоякий эффект: супрессия бласттрансформации клеток в тест-системе при дозе митогена, индуцирующей Т-хелперы, и активация — при дозе Кон А, индуцирующей Т-супрессоры. Поэтому при анализе результатов мы учитывали ИА и ИС в опытах с применением каждой дозы Кон А, а также относительное число (%) животных, ответивших стимуляцией или супрессией в этих опытах.

Установлено, что у интактных кроликов титр гемолизинов в крови составляет 1:4 — 1:6. Лимфоциты кроликов, индуцированные высокой дозой Кон А (60 μ /мл), вызывали торможение пролиферации лимфоцитов в тест-культуре в 100 % случаев, ИС составил 48 %. В опытах с использованием низких доз Кон А (8 μ /мл) активация клеток в тест-культуре наблюдалась также в 100 %, ИА составил 30 %.

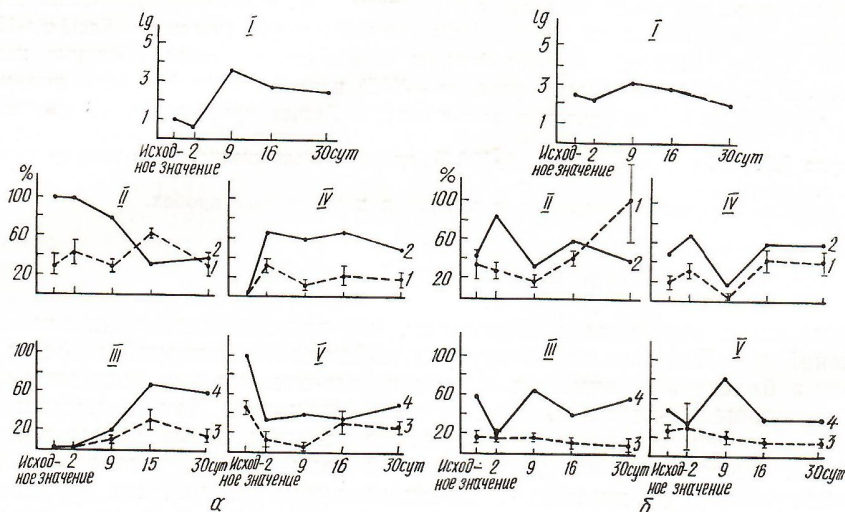
Изменения титра гемолизинов и функциональной активности Т-хелперов и Т-супрессоров в динамике первичного иммунного ответа (1-я серия исследований) представлены на рисунке, а. На 2-е сутки после иммунизации ЭБ (латентный период развития иммунного ответа) титр гемолизинов в сыворотке крови несколько снизился по сравнению с таковым контрольных исследований (1:2 — 1:4). Это обусловлено, по-видимому, тем, что нормальные антитела связались с введенным антигеном. В реакции РБТ наблюдался следующий эффект: в опытах с Кон А в дозе 8 μ /мл в 100 % случаев возросла хелперная активность, ИА повысился до 43 %. При использовании Кон А в дозе 60 μ /мл ранее единый супрессорный эффект разделился: в 67 % случаев отмечалась активация (ИА — 32 %) и в 33 % — супрессия (ИС — 14 %). Очевидно, общая тенденция поведения регуляторных иммунокомпетентных клеток при иммунном ответе в ранние сроки, до нарастания титра антител, характеризуется повышением активности хелперов и снижением — супрессоров.

На высоте иммунного ответа (9-е сутки), когда титр гемолизинов возрос до 1:800 — 1:6400, хелперная и супрессорная активность лимфоцитов снизилась по сравнению с таковой на 2-е сутки исследования. При этом ИА (Кон А — 8 μ /мл) достиг исходного (контрольного) значения, а ИС (Кон А — 60 μ /мл) стал в 3—5 раз ниже по сравнению с таковым в предыдущие сроки исследования (2-е сутки, исходные значения). В этот период впервые при индуцировании хелперной активности (Кон А — 8 μ /мл) не наблюдали однозначного ответа: в 80 % случаев отмечали активацию лимфоцитов в тест-культуре, а в 20 % — регистрировали супрессорный эффект. При стимулировании супрессо-

ров (Кон А — 60 γ/мл) только в 40 % случаев регистрировали подавление пролиферации клеток в тест-культурах, а в остальных случаях преобладала активация.

Таким образом, на высоте иммунного ответа хелперная активность снижается по сравнению с таковой в ранние сроки после введения антигена (ИА соответствует исходному), а супрессорная — проявляет тенденцию к повышению, хотя находится еще на низком уровне.

К 16-м суткам исследования титр гемолизинов снизился в 5—8 раз (1 : 200 — 1 : 800). В это же время отмечали повышение супрессорной



Изменение титра гемолизинов, хелперной и супрессорной активности Т-лимфоцитов крови кроликов в динамике первичного (а) и вторичного (б) иммунных ответов на эритроциты барана:

I — титр (lg) гемолизинов крови; II — активация, III — супрессия лимфоцитов при дозе Кон А 8 γ/мл; IV — активация, V — супрессия лимфоцитов при дозе Кон А 60 γ/мл. 1 — индекс активации, %; 2 — относительное число животных, ответивших активацией, %; 3 — индекс супрессии, %; 4 — относительное число животных, ответивших супрессией, %.

активности при использовании Кон А в дозе 60 γ/мл, ИС (32 %) приближался к исходному и превышал таковой во все остальные сроки исследования в 2 и более раз. Преобладание супрессорного эффекта наблюдали и при использовании низких доз Кон А: в 67 % случаев регистрировали супрессорный ответ с ИС — 32 %, т. е. таким же, как и при использовании Кон А в дозе 60 γ/мл. ИА при этом увеличивался в 2 раза (64 %) по сравнению с таковым на 9-е сутки, но регистрировался только в 33 % случаев.

В более отдаленные сроки исследования (30-е сутки) титр гемолизинов снизился до 1 : 100 — 1 : 400. При этом хелперная активность лимфоцитов снизилась вдвое по сравнению с таковой в предыдущий срок исследования, а супрессорная активность почти не изменилась.

Таким образом, при развитии первичного иммунного ответа на ЭБ нарастанию титра антител в крови предшествует повышение хелперной и снижение супрессорной активности Т-лимфоцитов. На высоте иммунного ответа хелперная активность снижается до исходной, а супрессорная — начинает проявлять тенденцию к повышению. В дальнейшем при снижении титра антител супрессорная активность увеличивается. В эти сроки наблюдается также повышение ранее сниженной хелперной активности лимфоцитов, однако в общем балансе преобладает супрессорная активность.

На рисунке, б представлены результаты изменения титра гемолизинов, хелперной и супрессорной активности лимфоцитов в динамике вторичного иммунного ответа на ЭБ. Исходным фоном служили 30-е сутки после первичной иммунизации ЭБ. Установлено, что перед вторичной иммунизацией титр гемолизинов в сыворотке крови кроликов

составлял 1:100 — 1:400. При индуцировании хелперного эффекта (Кон А — 8 γ/мл) в 40 % случаев отмечали активацию (ИА — 32 %). При использовании высоких доз Кон А только в 50 % случаев наблюдался супрессорный эффект (ИС — 28 %), а в остальных 50 % — хелперный (ИА — 20 %).

На 2-е сутки, после повторного введения ЭБ, так же, как и при первичном введении ЭБ, титр гемолизинов снижался (1:50 — 1:100). Хелперная активность в этот период при использовании и высоких, и низких доз Кон А преобладала по числу случаев, хотя ИА при индуцировании хелперного эффекта (Кон А — 8 γ/мл) был несколько ниже исходного (87,5 %). При этом, в отличие от первичного иммунного ответа, наблюдали и одновременное повышение активности супрессорных клеток: при использовании Кон А в дозе 60 γ/мл ИС составил 114 % исходного. Однако хелперная активность преобладала: в 83 % случаев при дозе Кон А 8 γ/мл и в 67 % при дозе Кон А 60 γ/мл наблюдали хелперный эффект.

На 9-е сутки вторичного иммунного ответа титр гемолизинов составил 1:1000 — 1:2000. При этом в тест-культуре с использованием низкой дозы Кон А наблюдали резкое снижение хелперной активности лимфоцитов по числу случаев и по ИА. Супрессоры же преобладали в опытах с использованием и высоких, и низких доз Кон А. Известно, что при вторичном иммунном ответе пик антителообразования наступает быстрее, чем при первичном, но при этом и дольше сохраняется на высоком уровне [4]. Поэтому 9-е сутки исследования при вторичном иммунном ответе еще можно считать максимумом образования антител. Более низкий титр антител, наблюдавшийся в наших опытах при вторичном иммунном ответе по сравнению с таковым при первичном, по-видимому, зависит от ряда факторов: это и использование корпускулярного (а не растворимого) антигена, и достаточно высокая доза антигена при первичном введении, вызвавшая очень высокий первичный иммунный ответ, и другие факторы, которые могут обусловить развитие частичной иммунологической толерантности [5, 10].

В более отдаленные сроки исследования титр гемолизинов снижался до 1:500 — 1:1000 (16-е сутки), 1:100 — 1:400 (30-е сутки). В эти же сроки индуцированная хелперная активность лимфоцитов крови кроликов, судя по ИА, нарастала, а супрессорная, при использовании Кон А в дозе 60 γ/мл, несколько снижалась по сравнению с таковой в предыдущие сроки исследования. Таким образом, в эти сроки в отличие от первичного иммунного ответа преобладала хелперная активность.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что в динамике первичного и вторичного иммунных ответов у кроликов на тимусзависимый антиген (ЭБ) изменения активности антигеннеспецифических Т-хелперов и Т-супрессоров и, главное, их баланса в значительной мере определяют уровень гуморального ответа — образование антител. И при первичном, и при вторичном иммунных ответах в индуктивную фазу антителогенеза повышается и преобладает хелперная активность лимфоцитов. Что же касается супрессоров, то при первичном иммунном ответе в эту фазу их активность снижена, а при вторичном — несколько повышена. Последнее обстоятельство обусловило, по-видимому, в наших условиях эксперимента более низкое содержание антител крови в последующем. В период максимального образования антител при первичном и вторичном иммунных ответах наблюдается снижение хелперной и повышение супрессорной активности Т-лимфоцитов, что отражает, по всей вероятности, начало ограничения иммунной реакции, осуществляемого по типу обратной связи и направленного на поддержание иммунного гомеостаза. В наших опытах эта реакция более выражена при вторичном иммунном ответе. В отдаленные сроки развития иммунной реакции, когда титры антител в крови снижаются, при вторичном иммунном ответе наблюдается новое повышение хелперной активности, что обеспечивает, по всей вероятности, большую его продолжитель-

ность по сравнению с первичным. Таким образом, баланс активности антигеннеспецифических Т-хелперов и Т-супрессоров можно отнести к числу факторов, определяющих высоту и продолжительность иммунного ответа, а также особенности вторичного иммунного ответа по сравнению с первичным.

ANTIGEN-SPECIFIC HELPER AND SUPPRESSOR ACTIVITY OF T-LYMPHOCYTES FROM THE RABBIT BLOOD IN DYNAMICS OF THE DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE TO HETEROERYTHROCYTES

T. M. Bryzgina, T. V. Martynova, I. N. Alekseeva

A titre of hemolysins in blood serum, helper and suppressor activity of blood T-lymphocytes in response of blasttransformation to Con A in different doses (8 and 60 ml) and was determined in rabbits after single and two-fold (with an interval of 30 days) immunization of the ram erythrocytes. Examinations were conducted 2, 9, 16 and 30 days after antigen introduction. Peculiarities of changes in antigen-specific helper and suppressor activity of lymphocytes and their balance in dynamics of primary and secondary immune responses are determined.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ант А. С., Мороз А. М., Абрамова З. П. и др. Воздействие специфической аллоантисыворотки против Т-супрессоров при экспериментальном туберкулезе у мышей // Иммунология.— 1984.— № 5.— С. 26—28.
2. Атанадзе С. Н., Хомак В. Я., Вейн А. М., Семенов Б. Ф. Динамика активности неспецифических супрессоров у больных рассеянным склерозом // Там же.— 1982.— № 5.— С. 79—81.
3. Брондз Б. Д. Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании.— М.: Наука, 1987.— 471 с.
4. Вершигора А. Е. Основы иммунологии.— Киев: Вища шк., 1980.— 503 с.
5. Гауриовиц Ф. Иммунохимия и биосинтез антител.— М.: Мир, 1969.— 416 с.
6. Дозморов И. М. О возможности отождествления субпопуляции лимфоцитов с противоположными функциями // Иммунология.— 1986.— № 3.— С. 94—96.
7. Дранник Г. Н., Лысенко Г. И., Монтаг Т. С. и др. Изучение функциональной активности неспецифических Т-лимфоцитов-супрессоров у здоровых людей и у больных системной красной волчанкой // Врачеб. дело.— 1980.— № 1.— С. 88—90.
8. Кульберг А. Я. Регуляция иммунного ответа.— М.: Медицина, 1986.— 220 с.
9. Клеточные факторы регуляции иммуногенеза // Под ред. В. А. Труфакина.— Новосибирск: Наука, 1985.— 128 с.
10. Клиническая иммунология и аллергология // Под ред. Л. Йегера.— М.: Медицина, 1986.— Т. 1.— 486 с.
11. Линг Н. Р. Стимуляция лимфоцитов.— М.: Медицина, 1971.— 288 с.
12. Моргунов И. Н., Дранник Г. Н., Бордонос В. А. и др. Функциональная активность Т-хелперов и супрессоров при локализованных формах стафилококковой инфекции // Иммунология.— 1984.— № 3.— С. 57—60.
13. Назаров П. Г., Пуринь В. И. Реакция бласттрансформации лимфоцитов в культурах цельной крови. Количественная оценка с помощью стинцилляционного счетчика // Лаб. дело.— 1975.— № 4.— С. 195—197.
14. Петров Р. В. Иммунология.— М.: Медицина, 1987.— 415 с.
15. Руководство по иммунологии // Под ред. О. Е. Вязова, Ш. Х. Ходжаева.— М.: Медицина, 1973.— С. 293—302.
16. Dosch H. M., Schuurman R. K., Gelfand E. W. Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro-II. Reappraisal of T and B cell-specific mitogens 3 // J. Immunol.— 1980.— 125, N 2.— P. 827—832.
17. Merrenberg L. A., Kumura K. O., Metrber C. M. Regulation of immunoglobulin and antibody production by allotype suppressor T-cells in mice // Transplant. Rev.— 1975.— 27, N 1.— P. 57—61.
18. Rothermel A. L., Calkins C. E. Rapid loss of feedback suppressor T-cell activity after priming in vivo // Immunology.— 1986.— 57, N 4.— P. 539—543.
19. Tada J., Taniguchi M., Takemori T. Properties of primed suppressor T-cell and their products // Transpl. Rev.— 1975.— 26, N 11.— P. 1106—1291.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Материал поступил в редакцию 06.09.88