

М.І. Лісяний, А.І. Ключникова

Розвиток імунної відповіді на алогенні клітини ембріонів і дорослих мишей при внутрішньомозковій імунізації

Вивчали цитотоксичну активність лімфоцитів селезінки та клітин лімфатичних вузлів, накопичення антитіл у сироватці крові реципієнта у відповідь на внутрішньомозкове введення антигена. Клітинна та гуморальна імунна відповідь у мишей розвивалася при введенні алогенних клітин селезінки як дорослих тварин, так і на ембріональні клітини, проте в останньому випадку реакція була менш інтенсивною. Це дає змогу говорити про те, що ізоляції головного мозку немає, оскільки антигени, введені в мозок, здатні індукувати реакцію імунної відповіді, а ембріональні клітини вже на 13–15-ту добу гестації експресують достатню для індукції імунної відповіді кількість молекул головного комплексу гістосумісності.

Ключові слова: імунна відповідь у мозку, алогенні клітини, внутрішньомозкова імунізація.

ВСТУП

Відомо, що головний мозок відноситься до імунологічно ізольованих тканин організму завдяки наявності гематоенцефалічного бар'єра та відсутності лімфатичних судин, що передбачає особливості розвитку імунної відповіді на різні антигени при їх потраплянні в мозок, у тому числі на алогенні клітини [2, 5, 7, 8].

Недостатньо вивченою є роль клітин головного мозку в індукції та регуляції клітинної, а також гуморальної імунної відповіді – процесу, який розвивається після взаємодії різних типів клітин (Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, дендритних клітин) [1, 9–11]. Суперечливим є питання про приживлення та відторгнення алогенних ембріональних клітин, оскільки не до кінця досліджена експресія антигенів нейротрансплантатів, оскільки в мозку запускається специфічна імунна відповідь, гістосумісності цих клітин [6, 12, 13].

Для з'ясування можливості розвитку імунної відповіді організму на внутрішньомозкове введення суспензії алогенних клітин

дорослих тварин та ембріонів були проведені дослідження клітинної та гуморальної імунної відповіді при введенні алогенних клітин селезінки дорослих тварин або селезінки чи клітин головного мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації.

Метою нашої роботи було дослідження розвитку імунної відповіді на 6, 12 та 18-ту добу при внутрішньомозковому введенні алоантигенів – свіжевиділених алогенних спленоцитів дорослих мишей і спленоцитів і суспензії клітин головного мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на безпородних мишах масою 13–15 г, яким у праву скроневу ділянку мозку, за 1–2 мм від брегми, на глибину 1,5–2 мм вводили 0,05 мл суспензії клітини у концентрації $1 \cdot 10^6$. Тваринам першої групи – суспензію спленоцитів дорослих мишей лінії C₅₇BL, другої – суспензію спленоцитів ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації, третьої групи – суспензію клітин

мозку ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації. На 6, 12 та 18-ту добу досліджували розвиток імунної відповіді.

Усі експерименти над тваринами проводили відповідно до норм Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин при їх використанні в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р. ETS N 123).

У мишей під ефірним наркозом видаляли селезінку, у вагітних мишей 13–15-ї доби гестації – ембріони, в яких вилучали мозок і селезінку. Суспензії клітин отримували гомогенізацією та відмиванням за допомогою дворазового центрифугування і наступним підрахунком у камері Горяєва з 3%-ю оцтовою кислотою.

Цитотоксичну активність (ЦА) імунно-компетентних клітин визначали колориметричним методом із застосуванням барвника – нейтрального червоного. Ефекторами були лімфоцити лімфовузлів мишей-реципієнтів (не лінійних мишей). Як клітини-мішені використовували лімфоцити лімфовузлів мишей-донорів лінії C₅₇BL. Цитотоксичний тест проводили за протоколом [3]. Метод визначення цитотоксичності за вивільненням із клітин вітального барвника, нейтрального червоного, як відомо з багатьох джерел, оснований на тому, що сенсibiliзована цитотоксична клітина викликає руйнування цитоплазматичної мембрани клітини-мішені, що призводить до виходу вітального барвника із клітини. Чим більше руйнується клітин-мішеней, тим більше виходить барвника, і відповідно вища цитотоксична дія клітин ефекторів, а саме цитотоксичних лімфоцитів і макрофагів. При цьому реєструють як природне пошкодження мішеней, так і примусовий лізис. Цитотоксичність натуральних кілерів виражали цитотоксичним індексом (ЦІ) у відсотках :

$$\text{ЦІ} = \frac{(T_d - T_k \cdot 100)}{T_d} \%,$$

де T_d – значення оптичної густини в дослідних лунках ефектори і мішені; T_k – значення оптичної густини в контрольних лунках з мішенями.

Рівень алоантитіл у сироватці крові оцінювали в мікролімфоцитотоксичному тесті [4] з лімфоцитами селезінки донорів і комплементом морської свинки при забарвленні загиблих клітин розчином трипанового синього (“Merk”, Німеччина) через 1,5 год після реакції, визначали ЦА лімфоцитів за різницею кількості мертвих клітин у сироватці крові реципієнтів і таких при дії сироватки на алогенні клітини донора.

Обробку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 97 SR-2 (© Microsoft Corporation, США) на персональному комп’ютері з процесором Intel® Pentium® Pro з операційною системою Microsoft Windows 98 (© Microsoft Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні ЦА лімфоцитів у тесті з нейтральним червоним імунна відповідь розвивалась з 6-ї по 18-ту добу, пік якої спостерігався на 12-ту добу. Так, при введенні спленоцитів дорослих мишей ЦА клітин селезінки на 6-ту добу становила 32,3 ум.од. ± 4,65 ум.од., на 12-ту добу зросла до 54,3 ум.од. ± 9,1 ум.од., на 18-ту добу знизилася до 34,4 ум.од. ± 7,01 ум.од. ЦА клітин лімфовузлів мала аналогічну тенденцію підвищення на 12-ту добу до 56,2 ум.од. ± 11,6 ум.од., і на 18-ту добу стрімко знижувалася до 33,0 ум.од. ± 4,08 ум.од.

При введенні суспензії клітин селезінки ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації імунна відповідь була менш інтенсивною порівнянно з дорослими мишами. Так, ЦА лімфоцитів селезінки на 6-ту добу становила 33,4 ум.од. ± 2,6 ум.од., на 12-ту зростала до 39,5 ум.од. ± 9,1 ум.од., на 18-ту добу знизилася до 28,9 ум.од. ± 8,0 ум.од. ЦА клітин лімфовузлів на 6-ту добу після введення в мозок ембріональних спленоцитів становила 32,8 ум.од. ± 1,6 ум.од., на 12-ту добу підвищувалася до 40,0 ум.од. ± 7,2 ум.од., і на 18-ту її значення було 36,0 ум.од. ± 2,0 ум.од.

Тоді як при введенні суспензії клітин

мозку ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації ЦА була значно меншою. Так, ЦА лімфоцитів селезінки на 6-ту добу становила $24,0 \text{ ум.од.} \pm 6,2 \text{ ум.од.}$, на 12-ту добу підвищувалася до $29,4 \text{ ум.од.} \pm 2,03 \text{ ум.од.}$, і на 18-ту добу знизилася до $22,6 \text{ ум.од.} \pm 4,2 \text{ ум.од.}$ ЦА клітин лімфовузлів на 6, 12 і 18-ту добу становила $26,0 \pm 1,8$; $32,0 \pm 3,27$ і $28,0 \text{ ум.од.} \pm 2,4 \text{ ум.од.}$ відповідно.

Таким чином, дослідження ефекторної клітинної ланки імунної відповіді на алогенні спленоцити показало: по-перше, спленоцити несумісні за системою гістосумісності антигенів при внутрішньомозковому введенні викликають досить інтенсивну імунну відповідь, динаміка якої проявляється на 6–18-ту добу з найбільшим рівнем цитотоксичності на 12-ту добу. Водночас введення ембріональних клітин мозку індукувало вірогідно менш виражену імунну відповідь.

Клітинна відповідь імунної системи на алоантигени більш значна в лімфоцитах, що збігається з кількістю Т- і В-лімфоцитів у лімфоїдних органах.

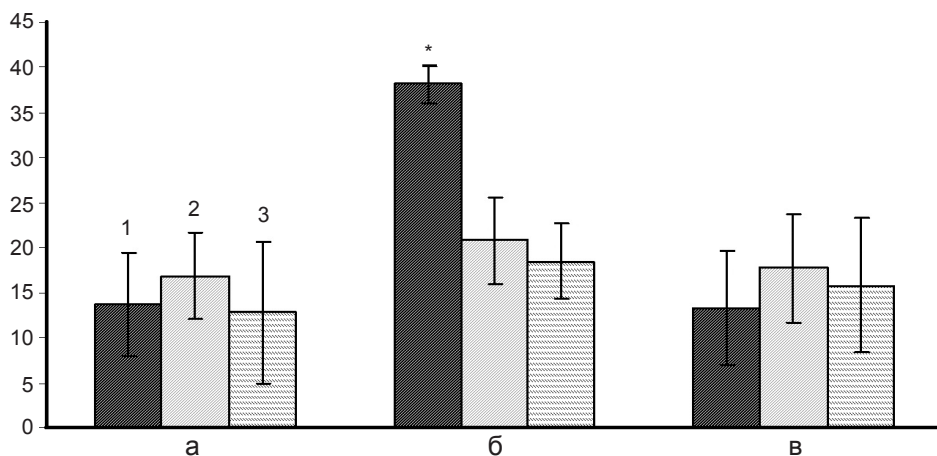
У разі вивчення гуморальної ланки імунної відповіді на алогенні клітини, спостерігалася наступна динаміка розвитку імунної відповіді: вірогідна різниця рівня алоантитіл зафіксована тільки на 12-ту добу після вве-

дення алогенних клітин з різною експресією антигенів гістосумісті. На 6-ту добу ЦА антитіл у сироватці крові мишей-реципієнтів, у розведенні 1: 10, проти алогенних клітин селезінки дорослих мишей при введенні в мозок становила $13,7 \% \pm 5,7 \%$, на 12-ту добу підвищувалася до $38,2 \% \pm 2,1 \%$ і на 18-ту добу знизилася до $13,3 \% \pm 6,3 \%$ (рисунок).

При дослідженні цитотоксичного індексу алоантитіл у сироватці крові мишей-реципієнтів в комплементзалежному тесті з трипановим синім, при введенні суспензії клітин селезінки ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації, максимальний рівень алоантитіл спостерігався на 12-ту добу після імунізації і був вірогідно нижчим, ніж при введенні спленоцитів дорослих мишей.

При введенні суспензії клітин головного мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації, рівень алоантитіл був невисокий і лише на 12-ту добу спостерігалася невірогідне підвищення. На 6-ту добу після імунізації рівень алоантитіл становив $12,8 \% \pm 7,8 \%$, на 12-ту зріс до $18,5 \% \pm 4,2 \%$ і на 18-ту добу знизився до $15,8 \% \pm 7,5 \%$.

Таким чином, ембріональні клітини на 13–15-ту добу гестації мають певні особливості в індукції імунних реакцій, а саме більшу клітинну відповідь і меншу продукцію



Рівень цитотоксичних антитіл у мікролімфоцитотоксичному тесті з трипановим синім при введенні спленоцитів дорослих мишей (1), спленоцитів ембріонів (2) і мозку ембріонів (3): на 6-ту (а), 12-ту (б) і 18-ту (в) добу після імунізації. * $P < 0,05$ різниця достовірна між групами введення спленоцитів дорослих мишей і суспензії спленоцитів, а також клітин мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації

алоантитіл, що можна пояснити як різною експресією алоантигенів, так і спектром цих антигенів.

Наведені результати вказують на те, що імунологічна ізольованість головного мозку є «умовною». Тому при внутрішньомозковому введенні алоантигенної клітин селезінки та нейроклітин спостерігається специфічна імунна відповідь. Це може підтверджувати припущення, що клітинні антигени з мозку потрапляють у загальний кровотік, на що організм реагує активацією гуморальної ланки імунітету.

Виходячи з отриманих результатів, можна припустити, що індукція імунної відповіді в головному мозку мишей-реципієнтів на введення алогенних клітин можлива двома шляхами: активацією клітин місцевої астроглії та мікроглії або прямим потраплянням введеного антигена в кровотік і лікворообіг, що зумовлює розвиток системної імунної відповіді організму цих тварин [7, 11–14].

Динаміка імунної відповіді в наших дослідках мала аналогічну тенденцію розвитку класичної імунної реакції, пік якої спостерігався на 12-ту добу після введення алогенних клітин різного цитогенезу.

ВИСНОВКИ

1. Внутрішньомозкова імунізація мишей-реципієнтів алогенними клітинами селезінки дорослих тварин викликає розвиток як клітинної, так і гуморальної імунної відповіді з появою специфічних цитотоксичних лімфоцитів у тканині селезінки та лімфовузлів і алоантитіл у крові на 6-ту добу після введення із наступним зростанням до 12-ї доби та подальшим (на 18-ту добу) зниженням рівня антитіл і цитотоксичної активності лімфоцитів і спленоцитів.

2. Ембріональні клітини селезінки та мозку мишей 13–15-ї доби гестації також здатні індукувати імунну відповідь організму, на що вказує підвищення цитотоксичної активності лімфоцитів у цитотоксичному тесті, а також невисокі рівні цитотоксичних алоантитіл.

3. Ембріональні клітини селезінки та головного мозку мишей за умов 13–15-ї доби гестації в порівнянні з клітинами селезінки дорослих мишей викликали менш інтенсивну клітинну та низьку гуморальну алоімунну відповіді. Це свідчить про достатню для індукції імунної відповіді експресію алоантигенів на ембріональних клітинах селезінки та головного мозку.

Н.И. Лисяный, А.И. Ключникова

РАЗВИТИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ НА АЛЛОГЕННЫЕ КЛЕТКИ ЭМБРИОНОВ И ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ ПРИ ВНУТРИМОЗГОВОЙ ИММУНИЗАЦИИ

Изучено цитотоксическую активность лимфоцитов селезенки и клеток лимфатических узлов, накопление антител в сыворотке крови реципиента в ответ на внутримозговое введение антигена. Клеточный и общий иммунный ответ у мышей развивался при введении аллогенных клеток селезенки, как взрослых животных, так и на эмбриональные клетки. Хотя в последнем случае реакция была менее интенсивной. Это позволяет говорить о том, что изоляции головного мозга нет, так как антигены, введенные в мозг, способны индуцировать реакцию иммунного ответа, а эмбриональные клетки 13-15-х суток гестации эспрессируют достаточное количество молекул главной системы гистосовместимости.

Ключевые слова: иммунный ответ в мозге, аллогенные клетки, внутримозговая иммунизация.

M.I. Lisyany, A.I. Kluchnikova

IMMUNE ANSWER OF MICE'S IN CASE OF INTRABRAIN INJECTION OF THE ALOHENIC SPLEEN CELLS OR BRAIN

Cytotoxic activity of spleen lymphocytes and lymphatic knots was studied. Accumulation of antibodies in blood serum of recipient in response to intrabrain injection of the antigen was investigated. Cellular and humoral immune response of mice developed with the intrabrain injection of alogenetic cells. The data obtained suggest that there is no isolation of the brain, because antigen injection to the brain is able to induce the immune reaction.

Key words: the immune answer in a brain, a brain, allogenic cells, intrabrain immunization.

A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery NAMN of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кузовкова Н.А. Оценка активности естественных кил-

- леров колориметрическим методом // Иммунология. – 1991. – №4. – С. 59–61.
2. Лісяний Н.І., Любич Л.Д. Особенности развития иммунных реакций при нейротрансплантации клеток фетального мозга // Нейроиммунология. – 2009. – 7, № 3–4. – С. 4–14.
 3. Морозов С.Г., Магаева С.В., Грибова И.Е. Иммунологический надзор в ЦНС // Там же. – 2005. – 3, № 3–4. – С. 5–9.
 4. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Микроцитотоксический метод // Иммунол. методы исследования в клинике. – 1998. – 410 с.
 5. Csern H.F., Knopf P.M. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain : A new view // Immunol. Today. – 1992. – 13. – P. 507–512.
 6. Drukker M., Katz G., Urbach A. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells // PNAS USA. – 2002. – 99, № 15. – P. 9864–9869.
 7. Harling-Berg C.J. Role of cervical lymphatics in the T2-type hierarchy of CNS immune regulation // J. Neuroimmunol. – 1999. – 101. – P. 111–127.
 8. Huang F.P., Plantt N., Wykes M. Discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes // J. Exp. Med. – 2000. – 191. – P. 435–444.
 9. Jonston M. Cerebrospinal fluid transport : a lymphatic perspective // Cerebrospin. Fluid Res. – 2004. – 2. – P. 1–12.
 10. Nagata K., Tanaka K., Ogawa K. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo // J. Immunol. – 1999. – 162. – P. 1278–1286.
 11. Neumann H., Wekerle H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 1998. — 57, № 1. – P. 1–9.
 12. Papaiconomou C., Zakharov A, Azizi N. Reassessment of the pathways responsible for cerebrospinal fluid absorption in the neonate // Child. Nerv. Syst. – 2004. – 20. – P. 29–36.
 13. Schmitt A.B., Brook G.A., Buss A. Dynamics of microglial activation in the spinal cord after cerebral infarction are revealed by expression of MHC class II antigen // Neuropathol. Appl. Neurobiol. – 1998. – 24, № 3. – P. 167–176.

*ДУ «Ін-т нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромаданова
НАМН України», Київ
E-mail: goga-dp@ukr.net*

*Матеріал надійшов
до редакції 24.01.2012*