

РГБ ОА
13 МАЙ 1996

На правах рукописи

ГУСЕВ
Евгений Юрьевич

**ВЗАИМООТНОШЕНИЯ
КЛЕТОЧНОПОСРЕДОВАННОГО
И ГУМОРАЛЬНОГО
ИММУННОГО ОТВЕТА НА УРОВНЕ
ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА**

14.00.36 - Аллергология и иммунология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

ПЕРМЬ - 1996

Работа выполнена в Пермской государственной медицинской академии Минздравмедпрома Российской Федерации

Научный консультант
доктор медицинских наук, профессор **Н.Н.Кеворков**

Официальные оппоненты:
академик РАЕН, доктор медицинских наук, профессор **А.А. Ярилин**
член.корр.РАМН, доктор медицинских наук, профессор **В.И. Литвинов**
доктор медицинских наук **А.А.Иванов**

Ведущая организация - Научно - исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН

Защита состоится 26 июня 1996 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 074.09.01 при Институте иммунологии Минздравмедпрома РФ по адресу:
115478, г.Москва, Каширское шоссе, д.24, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института иммунологии Минздравмедпрома РФ

Автореферат разослан 7 мая 1996 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Л.С. Сеславина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Как известно, иммунный ответ это интегральный процесс, включающий в себя различные виды специфической реактивности. При этом, основными видами клеточноопосредованного и гуморального иммунного ответа на воздействие ксеноантигена, соответственно, является генерация Т-эффекторов (Тэ) гиперчувствительности замедленного типа и формирование антителообразующих клеток (АОК). Реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) является одним из важнейших механизмов, обеспечивающих устойчивость организма к действию большинства инфекционных возбудителей (Авербах М.М., 1985). В свою очередь, антитела также способны усиливать активность фагоцитирующих клеток, но на фоне выраженного антителогенеза (АТГ) отмечается снижение активности Тэ (Кульберг А.Я., 1986).

В настоящее время считается (Pilarski, Gibney, 1991; Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995), что основным механизмом, определяющим соотношение двух видов иммунной реактивности, являются цитокинопосредованные взаимодействия двух типов Т-хелперов. Однако, данная теория не в полной мере способна объяснить всю гамму неоднозначных эффектов взаимодействия двух видов иммунного ответа, регистрируемую в опытах *in vivo*, а также не рассматривает возможность влияния на данный признак органо- и стадиспецифичных механизмов, ассоциированных со специализированными Т-супрессорами (Тс).

По-видимому, решение этой проблемы невозможно без анализа соотношения двух составляющих иммунного ответа на уровне целостного организма. Последнее позволит выявить и классифицировать типичные варианты соотношения РГЗТ и АТГ в зависимости от влияния генетических и фенотипических факторов; установить основные критерии их характеризующие и уточнить некоторые механизмы, лежащие в их основе.

Цель и задачи исследования. Целью работы является выявление основных закономерностей взаимосвязи клеточноопосредованного и гуморального видов иммунного ответа на уровне целостного организма; расшифровка некоторых определяющих их механизмов.

Подлежат решению следующие задачи:

1. Установить основные количественные критерии, характеризующие взаимоотношение РГЗТ и АТГ у подопытных мышей.

2. Определить органспецифичную роль селезенки и регионарного лимфатического узла в развитии РГЗТ и АТГ на внутрибрюшинное или подкожное введение различных доз эритроцитов барана.

3. Оценить влияние на соотношение двух видов иммунного ответа генетических, половых, возрастных и некоторых средовых факторов.

4. Оценить динамику соотношения АТГ и РГЗТ на фоне изменения активности Тс РГЗТ (Тс-ГЗТ) и развития различных вариантов вторичного иммунного ответа.

5. Выявить и охарактеризовать стадийспецифичные клетки-супрессоры селезенки, контролирующие функцию сформировавшихся АОК в зависимости от активности Тэ.

Научная новизна. В ходе выполнения работы выявлены основные критерии оценки взаимоотношения РГЗТ и АТГ, определяющим из которых является соотношение порогов антигенной чувствительности для их развития. Установлено наличие четкой органспецифичности в характере данного взаимодействия. Впервые выявлены и охарактеризованы два генетически детерминированных типа взаимоотношения двух видов иммунного ответа как на первичное, так и на повторное введение антигена (АГ). Определена зависимость типового подразделения иммунного ответа от определенных гаплотипов используемых мышей. Произведена оценка влияния на соотношение РГЗТ и АТГ половых и возрастных различий, голодания, экзогенного глюкогона; различных вариантов активности фагоцитирующих клеток, фиксируемых в НСТ-тесте; сопутствующего действия АГ золотистого стафилококка и блокады простагландинсинтетазы вольтареном. Обоснована возможность генерации низкодозовых Тс-ГЗТ и показано их опосредованное стимулирующее влияние на АТГ в селезенке. Выявлена и охарактеризована субпопуляция антиидиотипических Т-супрессоров, ограничивающих продуктивную фазу генерализованного АТГ в зависимости от активности Тэ.

Научно-практическое значение. Полученные данные позволяют решить проблему тестирования *in vivo* иммуномодулирующих препаратов, способных направленно изменять соотношение между клеточным и гуморальным видами иммунного ответа. Они будут

полезны для определения оптимальных доз АГ и схем его введения при вакцинациях и ревакцинациях, а также для уточнения состояния иммунного статуса при голодании и некоторых формах эндокринной дисфункции, связанных с гиперглюкагонемией. Результаты исследования могут быть задействованы в учебном процессе на ряде кафедр медико-биологического профиля. Полученные в работе данные неоднократно использовались в докладах и выступлениях на научных кворумах различного уровня.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В зависимости от соотношения порогов антигенной чувствительности АТГ и РГЗТ, а также их выраженностей, первичный иммунный ответ на ЭБ у мышей подразделяется на два оппозитных генетически детерминированных типа. Межтиповые различия усиливаются на фоне селективного вторичного Т-клеточного ответа.

2. Признак не сцеплен с полом, "главные гены" его кодирующие ассоциированы с МНС. Фенотипическое проявление признака зависит от возраста животных и влияния средовых факторов.

3. Взаимоотношения между двумя видами иммунного ответа органспецифичны: в селезёнке они конкурентны, а в регионарном лимфатическом узле - относительно независимы друг от друга.

4. Низкодозовые Т-супрессоры регулируют соотношение АТГ и РГЗТ через подавление формирования и активности Тэ; антиидиотипические Т-супрессоры ограничивают в селезёнке функцию сформировавшихся АОК в прямой зависимости от активности Тэ.

Апробация работы и публикации. Работа апробирована на совместном заседании кафедры биохимии и проблемной комиссии по иммунологии Пермской государственной медицинской академии. По теме диссертации опубликована 31 работа. Основные результаты диссертационной работы были изложены в докладах и тезисах на семи научных съездах, симпозиумах, конференциях республиканского и международного уровня, в том числе: на 1-м Всесоюзном иммунологическом съезде, 1-м съезде иммунологов России, 1-м международном научном конгрессе "Традиционная медицина и питание".

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 200 страницах машинописи и состоит из введения, обзора лите-

ратуры, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения (7 глав), выводов. В диссертации 57 рисунков и 23 таблицы. Прилагаемый список цитированной литературы включает 304 наименования (83 отечественных и 221 иностранных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. Спыты проведены на 5600 мышах линии СВА, СЗН, СС57BR, С57BL/6, DBA/2, BALB/c, гибридах F₁(CBAxС57BL/6) и белых нелинейных мышах (БНЛМ), полученных из питомника РАМН "Рапполово". Мышей содержали в условиях вивария на стационарной диете. Масса животных, кроме особо оговоренных случаев, составляла 18-22 г.

Иммунизировались животные подкожно (п/к) в стопу или внутривенно (в/в) эритроцитами барана (ЭБ), а в некоторых случаях - эритроцитами крысы, кролика, аллогенными эритроцитами и спленоцитами. Дога и кратность введения АГ варьировалась в зависимости от целей эксперимента.

В качестве модификационных факторов иммуотропного действия использовали п/к введение 25 мкг/кг препарата глюкагона (Lilly, США, серия 668), а также двухдневное голодание для моделирования естественной гиперглюкагонемии.

Для индукции АГ-неспецифичной иммуносупрессии использовали введение препарата убитого золотистого стафилококка (Стафилококковый реагент. Предприятие по производству бактериальных препаратов НИИЭМ им. Пастера, серия 5-186). АГ золотистого стафилококка (АГЗС) вводили п/к вместе с ЭБ или за сутки до этого в дозе 0,5 мг/мышь, либо в/в совместно с ЭБ в дозе 1 мг/мышь. В другом случае АГЗС вводили п/к в стопу в эффекторную фазу иммунного ответа - за сутки до забоя животных.

Для блокады продукции простагландинов (ПГ) использовали ингибитор ПГ-синтазы - вольтарен. Данный препарат в дозе 1,5 мг/кг вводили совместно с ЭБ в стопу.

С целью блокады генерации Тс-ГЗТ использовали п/к введение за 2 суток до иммунизации циклофосфана (ЦФ) в дозе 20 мг/кг (Whisler, Stobo, 1978).

Для оценки первичного АТГ у мышей через 5 суток после п/к или в/в иммунизации определяли число М-АОК, соответс-

твенно, в регионарном (подколенном) лимфатическом узле или селезёнке прямым методом локального гемолиза (Jtrne, Nordin, 1963). В некоторых случаях оценивали и число G-AOK непрямым методом локального гемолиза (Sterzl, Riha, 1965) и титр специфичных к ЭБ антител в сыворотке крови методом прямой геммагглютинации (Мальберг К., 1987).

Определение уровня ГЭТ производили, как правило, одновременно с тестированием выраженности АТГ у одних животных. В этих целях, мышам за сутки до забоя п/к в стопу вводили разрешающую дозу АГ и определяли выраженность реакции по степени утолщения стопы (утолщение в 0,1 мм принимали за 1 ед.). Полученный результат всегда сопоставлялся с выраженностью спонтанного отёка стопы (у предварительно не иммунизированных мышей).

Для моделирования гиперфункции Тс-ГЭТ использовали два подхода - традиционную модель (Lief, 1977) и предложенный нами способ оценки низкокодированных Тс-ГЭТ. В первом случае Тс-ГЭТ индуцировали у мышей-доноров в/б введением 10^8 ЭБ, через 14 суток донорские спленоциты внутривенно (в/в) переносили сингенным реципиентам одновременно с введением последним разрешающей дозы ЭБ. Во втором - индукцию Тс-ГЭТ и их оценку производили на одном животном посредством в/б предиммунизации 10^4 ЭБ за 10-14 суток до повторной иммунизации. Контрольные мыши, соответственно, получали спленоциты от интактных доноров или вместо предиммунизации - в/б инъекцию одного физиологического р-ра.

Функциональную активность фагоцитирующих лейкоцитов оценивали по восстановлению ими нитросинего-тетразолия (НСТ) спектрофотометрическим методом (Гордиенко С.М., 1983). Для элиминирования из состава клеточных суспензий Т-лимфоцитов использовали анти-Thy-1 сыворотку в присутствии комплемента (Gobub, 1971). Для удаления прилипающих к пластику клеток - культуру спленоцитов инкубировали в среде 199 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки в стандартных пластиковых чашках Д-90 в течение часа.

Для количественной оценки активности клеток-супрессоров селезёнки (КСС), ответственных за зависимую от Тз супрессию АОК, использовали предложенный нами метод. В этих целях мышей-доноров КСС в/б иммунизировали обычно 10^7 ЭБ, через 4

суток доноров забивали, а их спленоциты переносили п/к (в стопу) сингенным реципиентам за сутки до определения у последних численности АОК в регионарном лимфатическом узле. Мышей-реципиентов иммунизировали одновременно с донорами введением п/к в стопу 10^8 ЭБ. Контрольные мыши получали ту же дозу ядродержащих спленоцитов (5×10^6), но от интактных доноров.

Для удаления из состава спленоцитов, содержащих КСС, идиотипспецифичных клеток их в концентрации 2×10^6 кл/мл р-ра Хенкса дважды по 30 мин при 4° С инкубировали на пластиковых чашках, покрытых специфичными к ЭБ антителами. В группе контроль супрессии подобную инкубацию производили на чашках, обработанных сывороткой, лишенной специфичных к ЭБ, но не к другим АГ, антител.

Полученные данные подвергались математической обработке с использованием t -критерия Стьюдента и критериев корреляционного анализа (Лакин Г.Ф., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние генетических и фенотипических факторов на характер первичного иммунного ответа

В первой серии экспериментов изучалось соотношение АТГ и РГЗТ в локальном и генерализованном иммунном ответе, соответственно, на п/к и в/б введение различных доз ЭБ у мышей 6 линий с тремя различными гаплотипами, а именно: СВА и СЗН ($H-2^k$); С57BL/6 и СС57BR ($H-2^b$); DBA/2 и BALB/c ($H-2^d$). Данные о характере иммунного реагирования у мышей линий СВА, DBA/2, С57BL/6 представлены на рис. 1, а линий СЗН, СС57BR, BALB/c - на рис. 2.

Анализ полученных результатов показывает, наличие общих закономерностей для мышей всех шести линий. Во-первых, это более низкий порог антигенной чувствительности (ПАЧ) локального иммунного ответа (10^3 - 10^4 ЭБ) в сравнении с генерализованным (10^5 - 10^6 ЭБ). Во-вторых, для локального ответа характерно при "доза-эффект" АГ гиперболическое возрастание выраженности РГЗТ и АТГ, а для генерализованного - параболическое; В-третьих, в генерализованном ответе ПАЧ для РГЗТ у всех линий мышей имеет более низкое значение чем для АТГ, в

то время как в локальном - регистрируются различные варианты первоочерёдности "включения" АТГ или РГЗТ.

Наряду с этим, иммунный ответ у линейных мышей можно подразделить на два оппозитных генетически детерминированных типа: первый - с преобладанием РГЗТ, второй - АТГ. Главным дифференцирующим критерием, на наш взгляд, является соотношение их ПАЧ.

Так, у мышей с первым типом реагирования (линии С57ВL/6, СС57ВR, DBA/2, BALB/c) уровень ПАЧ в генерализованном иммунном ответе для развития РГЗТ (10^5 - 10^6 ЭБ) не менее чем на порядок ниже, чем для АТГ (10^6 - 10^7 ЭБ), а у мышей со вторым типом реагирования (линии СВА и СЗН) они имеют сопоставимую величину (10^5 - 10^6 ЭБ).

Ещё более контрастны межлинейные различия в локальном иммунном ответе. Так, у мышей с первым типом реагирования ПАЧ для РГЗТ (10^3 - 10^4 ЭБ) примерно на два порядка ниже, чем для АТГ 10^5 - 10^6 ЭБ), в то время как для мышей линий СВА и СЗН отмечается прямо противоположная тенденция.

Исходя из данного дифференцирующего критерия, мыши с гаплотипом Н-2^b и Н-2^d реагируют по первому типу, а с гаплотипом Н-2^k - по второму.

Другим, дополнительным дифференцирующим критерием является соотношение максимальной выраженности РГЗТ и АТГ в генерализованном иммунном ответе. Однако, явные отличия по данному признаку контрастно отмечаются только между наиболее оппозитно реагирующими линиями мышей - СВА и С57ВL/6. Так, у мышей линии С57ВL/6 определяется существенно более низкий максимальный уровень АТГ в селезёнке в сравнении с другими используемыми животными, при отсутствии заметного снижения развития РГЗТ на соответствующих дозах ЭБ. В свою очередь, особенностью линии СВА является невыраженность развития РГЗТ даже на субоптимальных для АТГ в селезёнке дозах АГ.

Учитывая, что определение РГЗТ и АТГ проводили на одном животном, дополнительную информацию даёт метод прямого корреляционного анализа. При этом, в генерализованном иммунном ответе у всех линий мышей отмечается отрицательная корреляция между АТГ и РГЗТ - у мышей линии С57ВL/6, СС57ВR, DBA/2 и СЗН данный феномен статистически достоверен ($P < 0,05$). Напротив, в локальном иммунном ответе коэффициент корреляции,

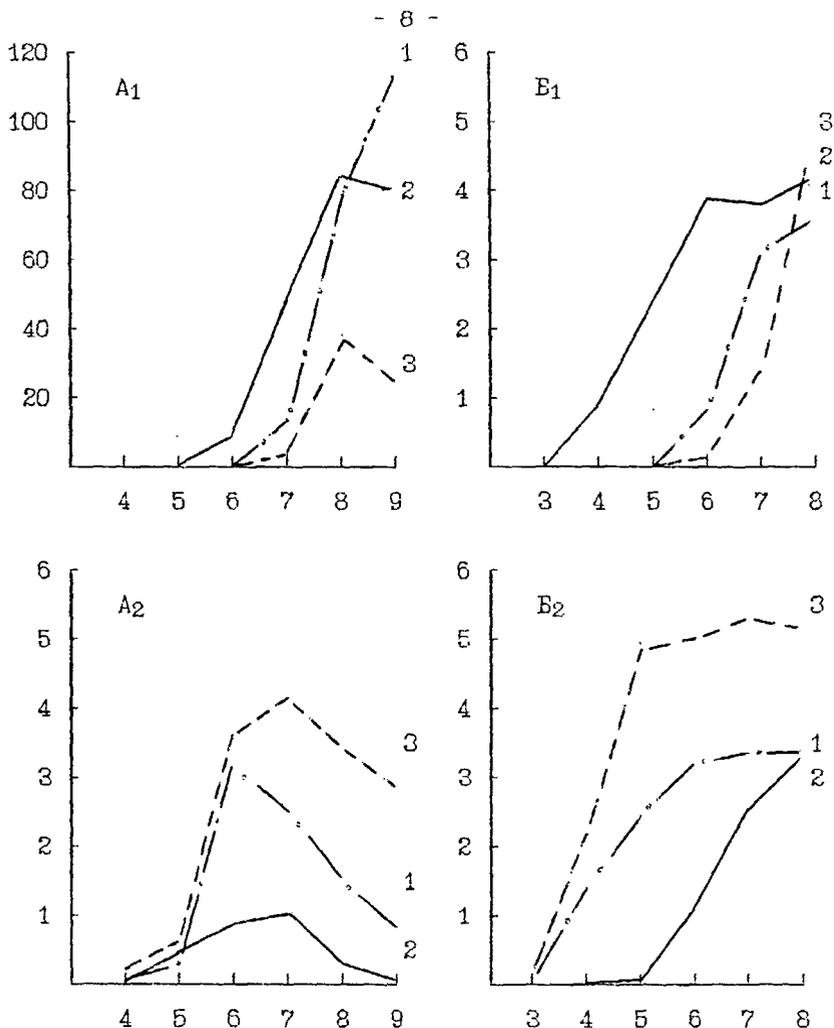


Рис. 1. Соотношение выраженности АТГ и РГЗТ в генерализованном (А) и локальном (В) иммунном ответе у мышей линии DBA/2 (1), CBA (2), C57BL/6 (3) на в/б или п/к введение различных доз ЭБ.

Здесь и на рис. 2, по осям ординат: число АСК ($\times 10^3$) на селезёнку (А₁) и лимфатический узел (В₁) или выраженность РГЗТ в ед (А₂ и В₂); по осям абсцисс - \lg дозы ЭБ. Здесь и далее, за 0 уровень РГЗТ принимали величину спонтанного отёка стопы на первичное введение ЭБ.

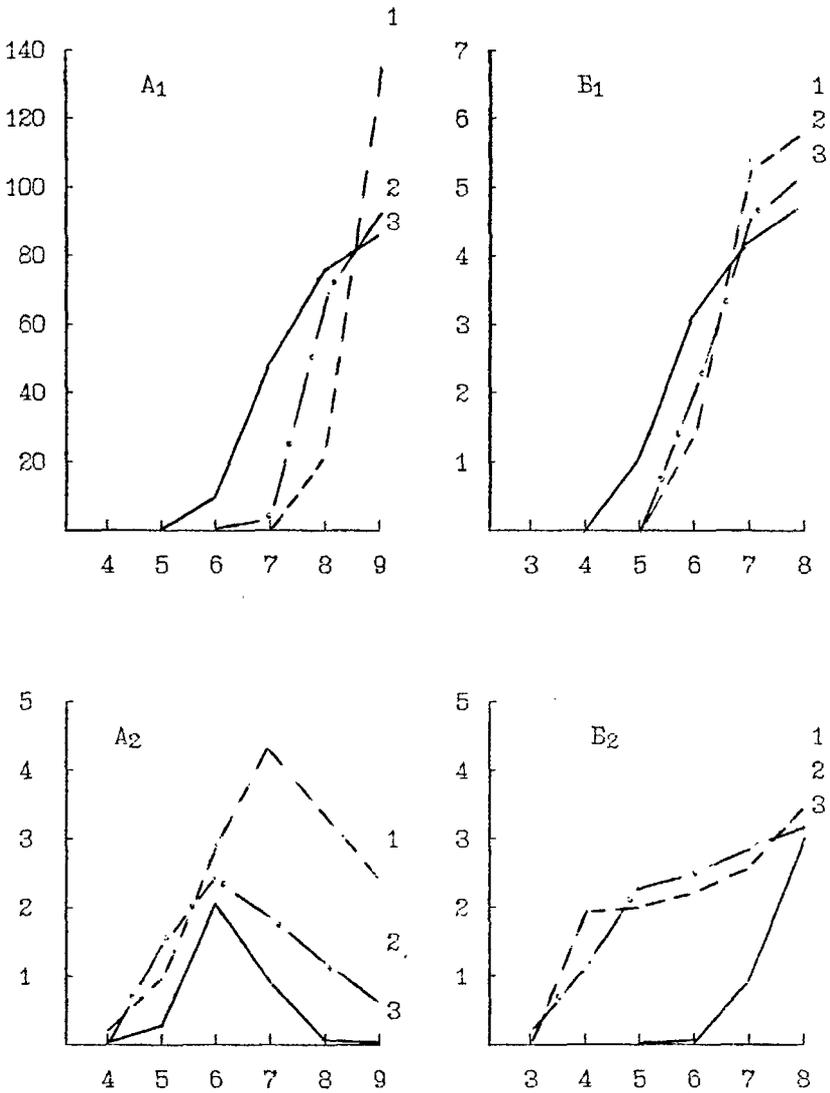


Рис. 2. Соотношение выраженности АТГ и FTGT в генерализованном (А) и локальном (Б) иммунном ответе у мышей линии СС57BR (1), BALB/с (2) и СЗН (3).

во всех случаях, имеет положительную величину, при достоверности результата у мышей линии СВА и СЗН.

Главный критерий, дифференцирующий межтиповые различия иммунного реагирования, можно полуколичественно выразить через величину коэффициента соотношения (КС), определяемого исходя из разницы минимально эффективных доз ЭБ в Ig для индукции РГЗТ с одной стороны и АТГ - с другой. В табл. 1 приведены амплитуды возможных значений КС у мышей различного генотипа при первичном иммунном ответе на ЭБ.

Таблица 1.

Соотношения уровней ПАЧ для РГЗТ и АТГ в локальном и генерализованном первичном иммунном ответе у мышей различного генотипа

Мыши	Генерализованный ответ		Локальный ответ	
	ПАЧ(РГЗТ/АТГ)	КС	ПАЧ(РГЗТ/АТГ)	КС
Линии С57BL/6 (b)	5-6/7	-(1-2)	4/6	-2
Линии СС57BR (b)	6/7-8	-(1-2)	4/6	-2
Линии DBA/2 (d)	6/7	-1	5/6	-1
Линии BALB/c (d)	5-6/7	-(1-2)	4/5-6	-(1-2)
Линии СЗН (k)	6/6	~0	7/5	+2
Линии СВА (k)	6/6	~0	6-7/4-5	+2
БНЛМ	6-7/7	-(0-1)	6/5-6	+(0-1)
F ₁ (СВАхС57BL/6)	6/7	-1	4-7/4-6	(-2)-(+3)

Примечание. Уровень ПАЧ обозначен исходя из Ig минимальной дозы ЭБ, достоверно способной инициировать развитие АТГ или РГЗТ; КС коэффициент соотношения, определяемый исходя из разницы уровней ПАЧ для АТГ и РГЗТ; в скобках обозначен гаплотип линии мышей, используемых в эксперименте.

При этом, у линейных мышей с первым типом реагирования в генерализованном и локальном иммунном ответе величина КС составляет от -2 до -1 (уровень ПАЧ для РГЗТ на один-два порядка ниже чем для АТГ); со вторым - в генерализованном ответе близка к 0, а в локальном - всегда имеет положительное значение обычно равное +2. Иммунный ответ у БНЛМ можно

относить по этому критерию к промежуточному варианту (табл.1).

Весьма переменные значения имеет величина КС (табл.1) у мышей-гибридов F_1 (СВАхС57BL/6), при наличии кодминирования или одновременного гипердоминирования "главных генов" обеих аллелей. Так, у разновозрастных особей (от 3 до 6 мес.) в локальном иммунном ответе она может колебаться от -2 до +3, а именно, более молодые мыши выражено реагируют по первому типу, в то время как более возрастные - по второму. Данный феномен, вероятно, можно объяснить взаимодействием нескольких генов-модификаторов, способных к избирательному эпистазу "главных генов" определенной аллели, в зависимости от конкретной фенотипической ситуации. Об комбинативном типе наследования признака у F_1 свидетельствует наличие промежуточного варианта локального иммунного реагирования (КС = 0). Реальным отражением этого является возможность у мышей F_1 (СВАхС57BL/6) развития не только полярных, но и промежуточных типов иммунного ответа, а также появлением у них нетипичных для обеих родительских линий особенностей иммунного ответа - например, параболическое развитие локального АТГ при разверстке доз АГ.

В генерализованном иммунном ответе кумуляция родительских признаков у мышей-гибридов F_1 (СВАхС57BL/6) проявляется в одновременном доминировании высокой выраженности как АТГ, так и РГЗТ, при существенном совмещении их АГ-ых оптимумов; хотя, по значению КС (-1) генерализованный ответ у этих мышей (3-4 мес.) больше соответствует первому типу.

Во временном диапазоне жизни мышей линии СВА, СС57BR, С57BL/6 от 3 до 8 мес. также последовательно отмечается возрастание "гуморальности" иммунного ответа. В то же время, данные изменения не выходят за рамки определенного генетически детерминированного типа иммунной реактивности, исходя из величины КС.

В опытах на БНДМ и мышках линий СВА, С3Н, С57BL/6 удалось установить константность величины КС у разнополых животных.

У оппозитно реагирующих мышей линий СВА, С57BL/6 и их гибридов F_1 отмечается сопоставимый уровень титра нормальных антител в крови, специфичных к ЭВ и степень функциональной активности фагоцитирующих клеток, регистрируемой в НСТ-тес-

те. Для БНЛМ характерны более низкие значения уровня спонтанных АОК в селезёнке и титра нормальных антител в крови при заметно большей активности фагоцитов в НСТ-тесте. Последнее, по-видимому, объясняет более высокие значения ПАЧ (примерно на порядок) у БНЛМ для развития иммунного ответа в целом, в сравнении с инбредными мышами.

Межитиповое подразделение иммунного ответа не определяется регуляторными факторами очага воспаления РГЗТ, поскольку отмена введения разрешающей дозы ЭБ в ряде экспериментов ни в одном случае не сопровождалась изменением численности АОК в селезёнке или регионарном лимфатическом узле.

При этом, у мышей со вторым типом реагирования отмечается более выраженная спонтанная воспалительная реакция стопы на первичное введение ЭБ, что, вероятно, отчасти компенсирует у них более низкую активность Тз.

При сопоставлении характера локального и генерализованного иммунного ответа необходимо было учитывать возможность развития первого после в/б иммунизации, а второго - после п/к. Проведённые дополнительные исследования показали, что в/б введение даже оптимальных для АТГ в селезёнке доз ЭБ не индуцирует образование АОК у используемых мышей на территории подколенного лимфатического узла. В то же время, п/к иммунизация (в стопу или в область живота) способна инициировать формирование АОК, Тз и Тс-РЗТ в селезёнке в дозах, на два порядка превышающих проводимую в аналогичных целях в/б иммунизацию. При этом, п/к иммунизация максимальной дозой АГ (10^8 ЭБ) у мышей с первым типом реагирования может провоцировать развитие только генерализованного клеточноопосредованного иммунного ответа, а у мышей линии СВА - сопровождается накоплением в селезёнке лишь небольшого количества (до 6000) АОК.

Действие АгЗС (известных поликлональных активаторов Т-лимфоцитов и стимуляторов как эффекторных, так и регуляторных функций макрофагов) у БНЛМ инициирует супрессию выраженности и повышение ПАЧ как для РГЗТ, так и АТГ на ЭБ, преимущественно в локальном иммунном ответе. При этом, эффекты АгЗС не сопровождаются существенными изменениями величин КС. Блокада ПГ-синтазы вольтареном на фоне действия АгЗС полностью восстанавливает выраженность и частично - ПАЧ обоих

видов иммунного ответа.

Более отчётливое влияние (рис.3) на соотношение двух составляющих генерализованного иммунного ответа у БНЛМ оказывает введение экзогенного глюкогона как в индуктивную (ежедневное пятикратное введение гормона, начиная за 2 суток до в/б иммунизации), так и особенно в эффекторную его фазу (однократно за сутки до забоя животных). Действие гормона носит разнонаправленный характер, а именно, усиление АТГ при супрессии РГЗТ на субоптимальных дозах ЭБ сменяется угнетением АТГ на оптимальной дозе АГ.

Двухдневное голодание в эффекторную фазу генерализованного иммунного ответа у БНЛМ действует аналогично экзогенному глюкогону - провоцирует реципрокные изменения выраженности РГЗТ и АТГ в диапазоне "малых" доз ЭБ.

Как показывают наши предыдущие исследования (Кеворков Н.Н. и соав., 1987; Гусев Е.Ю., 1989) основным механизмом действия на иммунную систему экзогенного глюкогона и двухдневного голодания в диапазоне небольших доз ЭБ является активация Тс-ГЗТ. Это, в свою очередь, предопределяет участие этих Тс в развитии конкуренции между РГЗТ и АТГ.

В целом, интегральный анализ вышеприведённых результатов свидетельствует об аддитивном взаимодействии полигенов, кодирующих изучаемый признак. В основе этого утверждения могут лежать следующие доводы. Во-первых, у мышей различного генотипа регистрируются не только полярные варианты иммунного реагирования, но и его промежуточные формы, обуславливающие в совокупности скорее непрерывную, чем дискретную изменчивость признака. Во-вторых, регистрируется существенная амплитуда его модификационной изменчивости. В-третьих, наличие комбинативного типа наследования признака у мышей F₁. При этом, "главные гены" ассоциированные со структурой МНС во многом определяют различия по главному дифференцирующему критерию - значению КС, в то время как гены, не входящие в МНС, больше контролируют соотношение выраженности РГЗТ и АТГ.

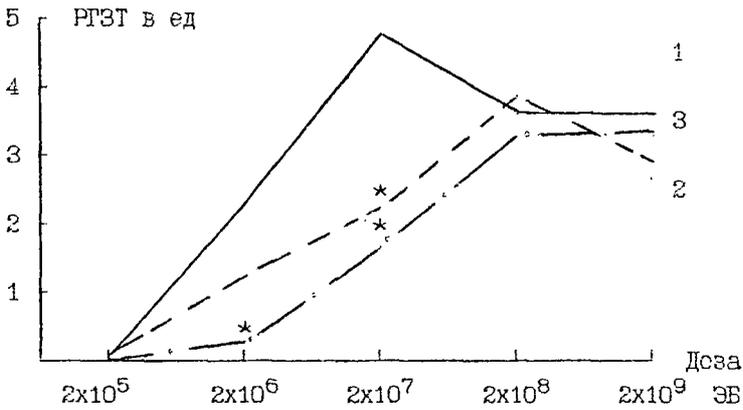
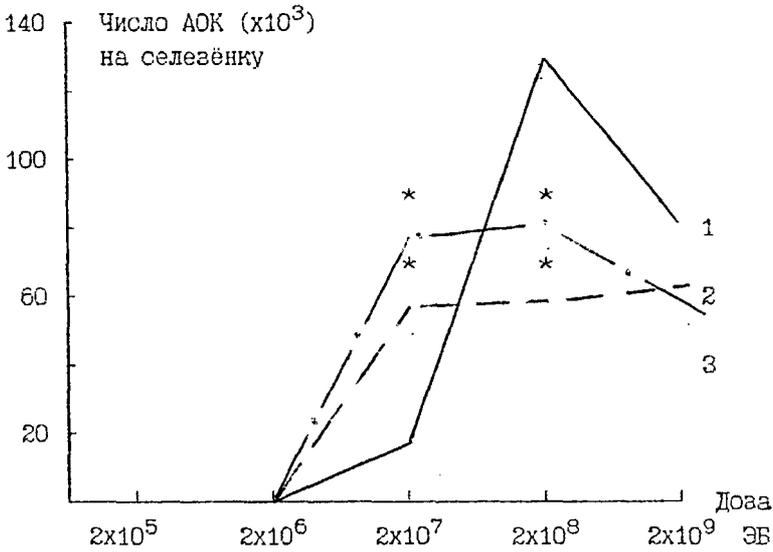


Рис. 3. Влияние глюкагона в индуктивную (2) и эффекторную фазу (3) развития генерализованного иммунного ответа на в/б введение различных доз ЭБ у БНЛМ.

Звёздочкой обозначены данные, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контроля (1).

Влияние Тс-ГЗТ на взаимодействие клеточноопосредованного и гуморального иммунного ответа

На рис. 4 отоброжено влияние блокады генерации Тс-ГЗТ 20 мг/кг ЦФ на развитие генерализованного иммунного ответа у БНЛМ и мышей линии СС57BR. В обоих случаях ЦФ понижают ПАЧ для РГЗТ примерно на один порядок, а именно, $10^5-10^6/10^6-10^7$ ЭБ (опыт/контроль) у БНЛМ и $10^4-10^5/10^5-10^6$ ЭБ у линии СС57BR. Кроме того, у БНЛМ на фоне выраженной стимуляции РГЗТ на дозе 10^7 ЭБ регистрируется четкое реципрокное снижение АТГ (число АОК на селезенку в опытной, но не в контрольной, группе сопоставимо с их спонтанным уровнем). В других экспериментах было выявлено, что у мышей линии С57BL/6, также как и у линии СС57BR, избирательное влияние ЦФ только на РГЗТ проявляется на допороговых для АТГ дозах ЭБ.

Аналогичное введение ЦФ у мышях линии СВА не увеличивает крайне низкую выраженность РГЗТ, но инициирует некоторое понижение ПАЧ для её развития ($2 \times 10^5/4 \times 10^6$ ЭБ). Последний эффект не сопровождается изменением выраженности АТГ в селезенке, поскольку доза 2×10^5 ЭБ является допороговой для его развития (число АОК как в опыте, так и в контроле сопоставимо с их спонтанным уровнем). Вероятно, низкая активность Тс в генерализованном иммунном ответе у мышей СВА не опосредуется Тс-ГЗТ.

Таким образом, в условиях генерализованного иммунного ответа блокада генерации Тс-ГЗТ сопровождается понижением ПАЧ для РГЗТ и стимуляцией выраженности данной реакции на неиммуногенных для АТГ дозах АГ и не изменяет численности АОК в селезенке. Исключением являются БНЛМ, у которых возможна экстраполяция ЦФ-зависимых разнонаправленных изменений РГЗТ и АТГ на дозе 10^7 ЭБ.

В дальнейшем оценивали влияние ЦФ на выраженность АТГ в регионарном лимфатическом узле и РГЗТ на п/к иммунизацию различными дозами ЭБ у мышей: линий С57BL/6, СВА, СС57BR, гибридов F_1 (СВАхС57BL/6) и БНЛМ.

При анализе полученных результатов удалось установить следующие закономерности:

Во-первых, стимулирующее действие ЦФ на выраженность РГЗТ достоверно проявляется не у всех мышей, а только у линии СВА и, в меньшей степени, у БНЛМ. У мышей с первым типом

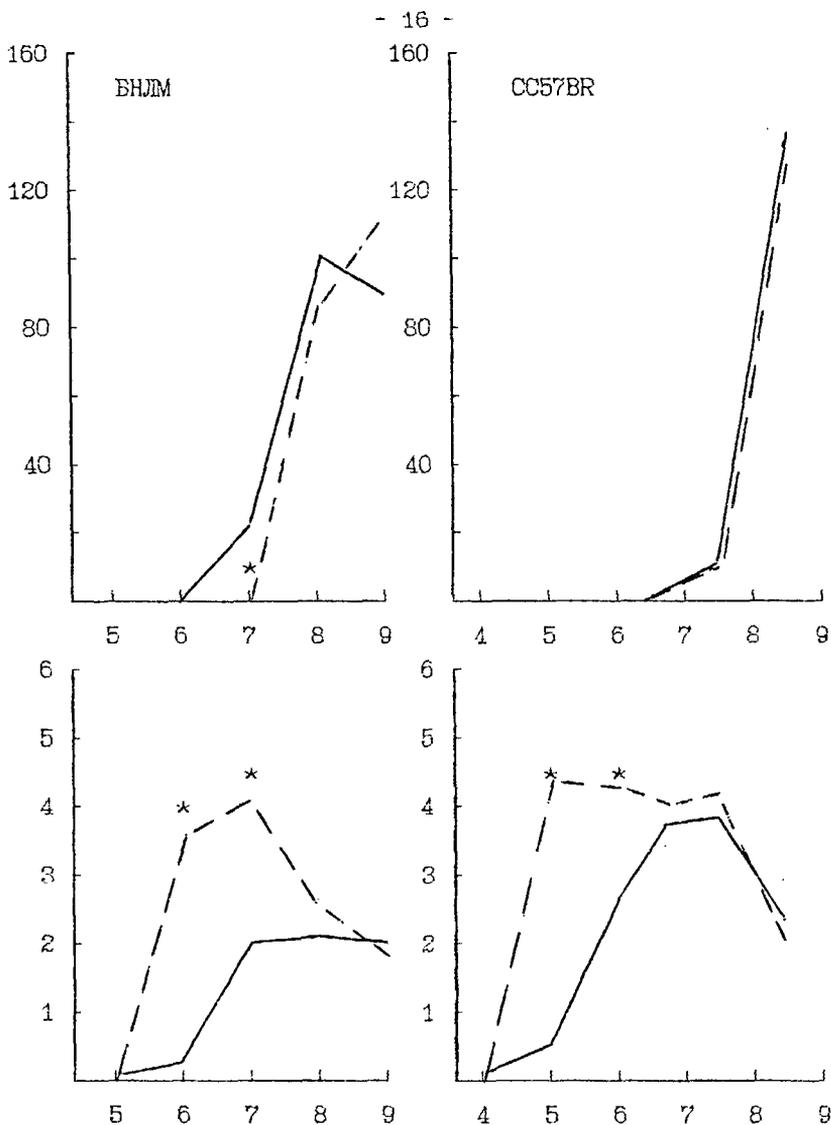


Рис. 4. Влияние ЦФ на характер генерализованного иммунного ответа у БНЛМ и мышей линии СС57ВR.

Здесь и на рис. 5, по осям ординат: вверху - число АОК ($\times 10^3$) на селезёнку, внизу - выраженность РГЭТ в ед; по осям абсцисс - \lg дозы ЭВ, вводимой в/б; сплошная линия - контроль, пунктирная - опыт; звёздочкой обозначены данные, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контроля.

реагирования (линии C57BL/6, CC57BR) и мышей-гибридов F₁(CBAxС57BL/6 влияние ЦФ менее заметно.

Во-вторых, ЦФ-зависимое усиление РГЗТ, в отличие от генерализованного иммунного ответа, проявляется преимущественно на "больших" дозах АГ.

В-третьих, стимуляция выраженности РГЗТ не сопровождается реципрокными изменениями АТТ - число АСК в опыте ни в одном случае существенно не отличается от контрольного показателя.

Далее на рис. 5 представлены данные, отражающие влияние адаптивного переноса содержащих Тс-ГЗТ спленцитов на эффекторную фазу генерализованного иммунного ответа у мышей линии CC57BR и C57BL/6. В обоих случаях, действие Тс-ГЗТ сопровождается ограничением максимального уровня РГЗТ и сдвигом Аг-оптимума для её развития в сторону высоких доз ЭБ. При этом, супрессия РГЗТ у мышей линии CC57BR проявляется только на допороговых или субоптимальных для АТТ дозах АГ. Напротив, у мышей линии C57BL/6 ограничение развития реакции отмечается практически на всех используемых дозах ЭБ. Соответственно, реципрокное увеличение числа АСК в селезёнке, в последнем случае, проявляется не только на субоптимальных, но и оптимальной для АТТ дозе Аг (10^8 ЭБ). Вследствие чего, максимальный уровень АСК у мышей линии C57BL/6 становится сопоставимым с данным показателем у других линий. Таким образом, относительно низкая отвечаемость по гуморальному типу на ЭБ у мышей линии C57BL/6 носит функционально-перераспределительный характер и, по-видимому, связана с гиперпродукцией в селезёнке Тэ.

Очевидно, что действие Тс-ГЗТ в генерализованном ответе преимущественно проявляется в диапазоне "малых" доз АГ и их супрессорное действие в отношении РГЗТ на стадии сформировавшихся эффекторных клеток сопровождается реципрокным усилением выраженности АТТ. Последнее предполагает возможность генерации Тс-ГЗТ в селезёнке при низкодозовом воздействии ЭБ.

Для проверки высказанного предположения, мышей различного генотипа: линий CBA и C57BL/6, гибридов F₁(CBAxС57BL/6), БНЛМ в/б, а в некоторых случаях и п/к в область живота, предиммунизировали за 10 суток до п/к реиммунизации 10^8 ЭБ в стопу различными дозами Аг (от 10^3 до 10^8

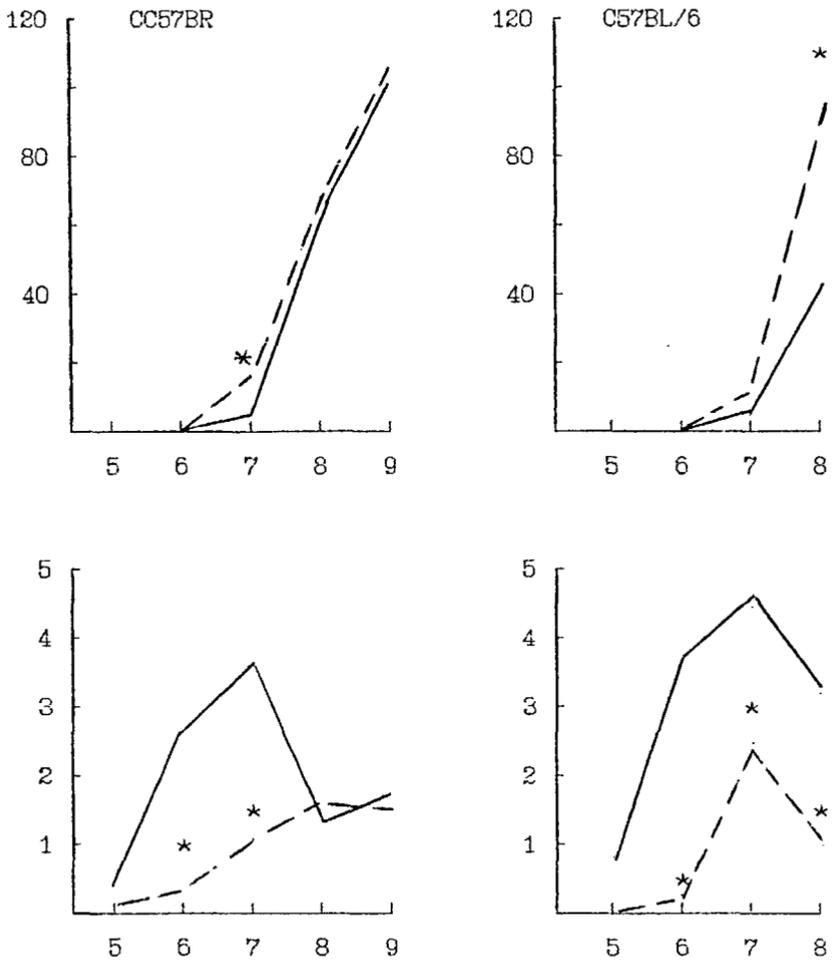


Рис. 5. Влияние адоптивного переноса Тс-Т3Т на эффекторную фазу генерализованного иммунного ответа у мышей линий СС57ВВ и С57ВВ/6 на в/б иммунизацию различными дозами ЭВ.

ЭБ), с последующей оценкой выраженности РГЗТ. Выявлено, что практически у всех животных в/б предиммунизация, начиная с дозы 10^4 ЭБ и выше, оказывает супрессорный эффект на последующее развитие РГЗТ. В условиях же п/к предиммунизации минимальная супрессорогенная доза АГ на два порядка выше (10^6 ЭБ), чем при в/б, что указывает на селезёночное происхождение тестируемых супрессоров. При этом, у всех мышей минимальная супрессорогенная доза ЭБ является допороговой для развития позитивного иммунного ответа в селезёнке. Последнее обстоятельство позволяет использовать низкодозовую предиммунизацию (в/б 10^4 ЭБ) в качестве метода количественной оценки активности низкодозовых супрессоров РГЗТ в опыте, проводимом на одном животном.

В дополнительных экспериментах удалось установить, что низкодозовая предиммунизация ЭБ не ограничивает развитие РГЗТ на алло-АГ, а именно, при реиммунизации мышей линии СВА спленоцитами мышей-гибридов F_1 (СВАхС57BL/6). Продолжительность жизни низкодозовых супрессоров РГЗТ составляет не более месяца (опыты с варьированием временного диапазона между двумя иммунизациями), при максимальной их эффективности с 10 до 25 суток от момента предиммунизации. В опытах с адоптивным в/в переносом супрессорных спленцитов сингенным реципиентам удалось доказать чувствительность генерации рассматриваемых супрессоров РГЗТ к низким дозам (20 мг/кг) ЦФ, возможность инактивации этих клеток анти-Thy-1 сывороткой в присутствии комплемента, их способность ограничивать РГЗТ в эффекторную фазу иммунного ответа.

Эксперименты с адоптивным в/в переносом низкодозовых супрессоров РГЗТ у мышей линии СС57BR (табл. 2) показывают возможность этих клеток не только ограничивать эффекторную фазу генерализованного клеточноспосредованного иммунного ответа, но и одновременно реципрокно усиливать выраженность АГ в селезёнке. Последний феномен, впрочем, не распространяется на изменение ПАЧ для генерации АСК, локализующегося в районе 5×10^6 ЭБ.

Таким образом, функциональной задачей Тс-РГЗТ является не только ограничение максимального уровня РГЗТ, но и повышение уровня ПАЧ для разрешающей и сенсibilизирующей доз АГ. Их активность не лежит в основе типового подразделения им-

Таблица 2.

Влияние адоптивного переноса низкодозовых Тс-ГЗТ на эффекторную фазу генерализованного иммунного ответа у мышей линии СС57ВR, в/б иммунизированных различными дозами ЭВ

Дозы ЭВ	Выраженность РГЗТ в ед		Число АОК ($\times 10^3$) на орган	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
0	1,7 \pm 0,15	1,8 \pm 0,21	0,56 \pm 0,08	0,61 \pm 0,12
2,5 $\times 10^6$	5,2 \pm 0,47	3,9 \pm 0,32*	0,63 \pm 0,09	0,66 \pm 0,11
5 $\times 10^6$	5,4 \pm 0,45	4,3 \pm 0,47	1,2 \pm 0,24	4,5 \pm 0,67*
1 $\times 10^7$	5,3 \pm 0,44	4,2 \pm 0,32	2,9 \pm 0,48	12,5 \pm 1,8*
2 $\times 10^7$	5,5 \pm 0,54	3,7 \pm 0,52*	6,8 \pm 0,93	17 \pm 0,15*
4 $\times 10^7$	4,6 \pm 0,41	4,4 \pm 0,42	49 \pm 6,8	44 \pm 6,2

Примечание. Звездочкой обозначены данные, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контроля. Число мышей в группах по 6-8.

мунного ответа, но в значительной степени определяет величину модификационной вариансы соотношения РГЗТ и АТТ преимущественно в генерализованном иммунном ответе. В последнем случае, Тс-ГЗТ способны спровоцировать реципрокные изменения активности сформировавшихся Тз и АОК.

Индукция Тс-ГЗТ может происходить на дозах АГ, допороговых для развития позитивного иммунного ответа. Последнее позволяет использовать низкодозовую предиммунизацию для избирательного моделирования гиперфункции Тс-ГЗТ.

Соотношение РГЗТ и АТТ при различных вариантах вторичного иммунного ответа

Основной целью настоящего раздела работы являлась дальнейшая дифференцировка двух ранее выявленных, генетически детерминированных типов иммунного ответа, но уже на вторичное введение АГ. Для этого мышей различного генотипа первично и вторично иммунизировали различными способами и дозами ЭВ, с последующей оценкой выраженности РГЗТ и АТТ у каждого животного. Мыши контрольных групп получали вместо первичной иммунизации (предиммунизации) инъекции одного растворителя - физиологического р-ра.

В первом случае использовали в/б предиммунизацию 10^4 ЭБ за 14 суток до повторного введения различных доз того же АГ. При этом, как было показано выше, происходит избирательная генерация Тс-ГЗТ в селезёнке и развитие негативного ответа. Такой способ предиммунизации обозначался как низкодозовый.

Во втором - для моделирования селективного вторичного Т-клеточного ответа использовали при первичной иммунизации дозы ЭБ, иммуногенные для развития РГЗТ, но допороговые для АГ. Данные дозы АГ подбирались для каждой линии мышей индивидуально в зависимости от генетических особенностей величины ПАЧ обоих видов иммунной реактивности и условно обозначались как "средние". В этих случаях, повторную иммунизацию различными дозами ЭБ проводили через 7 суток после первичного введения АГ. Подобный срок между двумя иммунизациями исключал эффект суммации действия первичных и вторичных Тэ, поскольку продолжительность жизни первых, как было определено нами в специальных экспериментах, не превышает 10 суток, а оценку результата опытов производили через 12 суток после первичного введения ЭБ.

С целью индукции классического вторичного иммунного ответа использовали при предиммунизации оптимальную для АГ дозу АГ (обычно, 10^8 ЭБ), с последующей п/к или в/б реиммунизацией различными дозами ЭБ.

Для оценки возможного влияния продуктов генерализованного иммунного ответа на развитие локального, использовали не только в/б предиммунизацию различными дозами АГ, но и одновременное в/б и п/к введение ЭБ, с последующей оценкой выраженности РГЗТ и числа АСК в регионарном лимфатическом узле. В последнем случае у мышей различного гаплотипа было зафиксировано понижение выраженности РГЗТ и локального АГ только на фоне в/б иммунизации 10^8 или большими дозами ЭБ. При этом, у мышей линии СВА отмечается приоритетное угнетение РГЗТ, а линии С57BL/6 - АГ. Эффект супрессии РГЗТ в этих случаях не опосредуется Тс-ГЗТ, поскольку не отменяется предварительным введением 20 мг/кг ЦФ. Обозначенные межлинейные различия усиливаются в условиях в/б предиммунизации (от 5 до 25 суток) 10^8 ЭБ до повторной п/к иммунизации той же дозой АГ.

Влияние низкодозовой предиммунизации (в/б 10^4 ЭБ) на

последующее развитие локального иммунного ответа (на п/к введение 10^4 - 10^8 ЭБ) определяли у мышей линий СВА и С57BL/6. В обоих случаях регистрируется достоверное ($P < 0,05$) ограничение выраженности РГЗТ только на максимальной дозе АГ (10^8 ЭБ), при неизменности локального АТГ и величины КС.

Иная картина отмечается при влиянии низкодозовой предиммунизации на развитие генерализованного иммунного ответа при в/б реиммунизации различными дозами ЭБ. Так, у мышей линии С57BL/6 регистрируются изменения в развитии АТГ и РГЗТ, сопоставимые по своему характеру с действием адаптивного переноса Тс-ГЗТ. За исключением того, что в данном случае реципрокное усиление АТГ на субоптимальной для его развития дозе 10^7 ЭБ носит более отчетливый характер: число АОК ($\times 10^3$) на селезенку в опыте - $24,3 \pm 3,2$; в контроле - $2,1 \pm 0,3$.

У мышей линии СВА и БНЛМ эффект низкодозовой предиммунизации на развитие генерализованного ответа появляется в диапазоне небольших доз АГ и сопровождается снижением уровня РГЗТ, реципрокном усилении выраженности АТГ при понижении ПАЧ для его развития в 2-4 раза.

Таким образом, низкодозовая предиммунизацию моделирует гиперфункцию Тс-ГЗТ и опосредованно, через снижение функциональной активности Тэ, может спровоцировать реципрокные изменения выраженности и ПАЧ для АТГ в генерализованном, но не локальном иммунном ответе.

Среднедозовая предиммунизация у мышей линии СВА (в/б 2×10^5 ЭБ), линии BALB/c (в/б 10^5 ЭБ), линии С57BL/6 (п/к в стопу 10^5 ЭБ) потенцирует развитие локального клеточноопосредованного иммунного ответа. Как видно на рис. 6, у мышей линии BALB/c при этом отмечается стимуляция РГЗТ на всех используемых для п/к реиммунизации дозах АГ и снижением ПАЧ для её развития примерно на порядок. Развитие локального АТГ в последнем случае резистентно к действию предиммунизации. У мышей линии С57BL/6 на фоне местной п/к среднедозовой предиммунизации регистрируются аналогичные проявления вторичного РГЗТ и локального АТГ. В обоих случаях характерно усиление признаков реагирования первого типа, а именно, изменение величины КС с -2 до -3.

Иначе действует среднедозовая предиммунизация у мышей

линии СВА (рис. 6) - стимуляция РГЗТ отмечается только на максимальной дозе АГ (10^8 ЭБ); в диапазоне небольших доз ЭБ характерно приоритетное усиление локального АТГ со сдвигом ПАЧ. В целом, этом случае отмечается усиление "гуморальности" локального иммунного ответа при увеличении КС с +2 до +3.

Ещё более контрастны межлинейные различия на фоне среднедозовой предиммунизации в развитии генерализованного иммунного ответа. Как видно на рис. 7, у мышей линии СВА в этом случае отмечается избирательное усиление АТГ в селезёнке, а именно, возрастание его выраженности при уменьшении уровня ПАЧ на фоне полной депрессии РГЗТ. Напротив, у мышей линии СС57BR (рис. 7) отмечается приоритетное усиление РГЗТ при реципрокных изменениях выраженности и ПАЧ для генерализованного АТГ. В последнем случае величина КС изменяется с -1 до -3. У мышей линии С57B1/6 на фоне среднедозовой предиммунизации (в/б 10^6 ЭБ) были выявлены такие же изменения генерализованного АТГ и РГЗТ как и у линии СС57BR.

У БНЛМ среднедозовая предиммунизация (в/б 10^6 ЭБ) избирательно усиливает развитие РГЗТ в генерализованном иммунном ответе на допороговых для АТГ дозах АГ (величина КС изменяется с -1 до -2), при отсутствии заметного эффекта на более значимых дозах ЭБ. Для развития вторичного локального иммунного ответа при п/к реиммунизации различными дозами ЭБ у БНЛМ характерно низкодозовое усиление как АТГ, так и РГЗТ. В последнем случае динамика уровня ПАЧ (опыт/контроль) для АТГ составляла 10^4 - 10^5 / 10^5 - 10^6 ЭБ, а для РГЗТ, соответственно, 10^3 - 10^4 / 10^6 - 10^7 ЭБ, при изменении КС с +1 до -1. В результате чего, характер вторичного иммунного ответа у БНЛМ приближается к реагированию уже не второго, а первого типа.

Таким образом, как видно из обобщённых данных табл. 3, среднедозовая предиммунизация у линейных мышей усиливает межтипные различия реагирования как в локальном, так и особенно в генерализованном иммунном ответе. В последнем случае регистрируются чёткие реципрокные изменения как выраженности, так и ПАЧ в развитии АТГ и РГЗТ. Напротив, у БНЛМ среднедозовая предиммунизация дополнительно показывает неустойчивый характер соотношения двух видов иммунного ответа в целом.

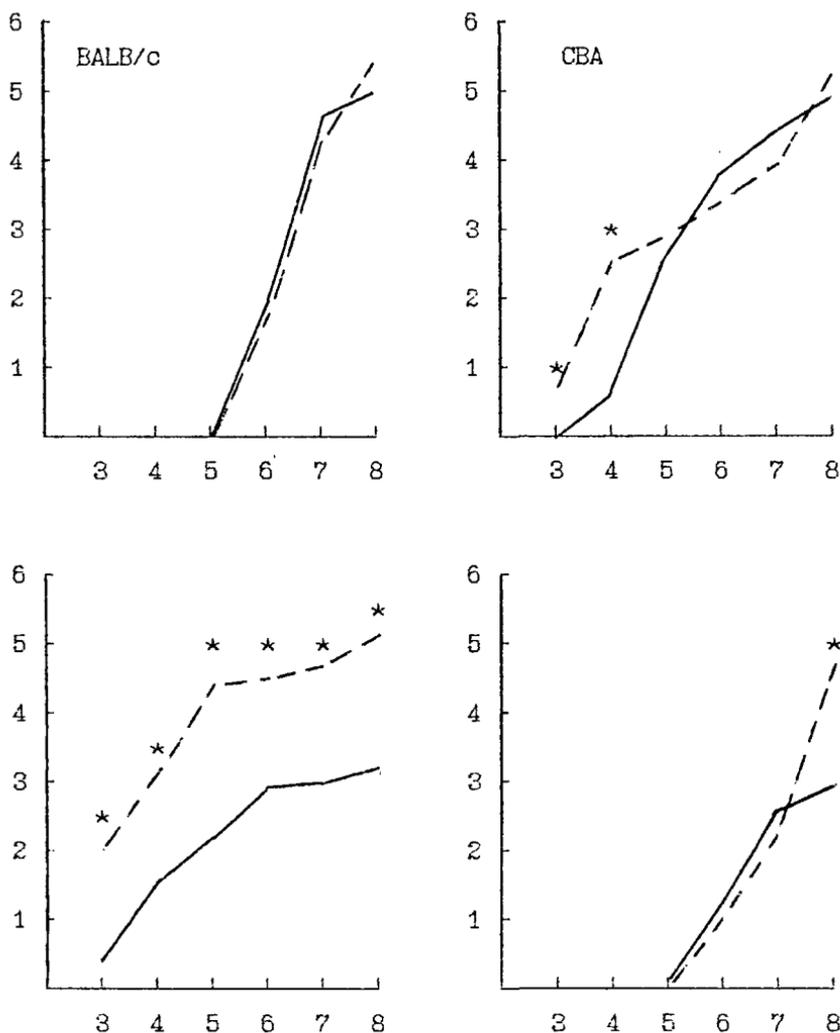


Рис. 6. Влияние среднедозовой предиммунизации на характер локального иммунного ответа у мышей линии BALB/c и CBA.

Здесь и на рис. 7, по оси ординат: вверху - число АОК ($\times 10^3$) на орган, внизу - выраженность РГЭТ в ед; по оси абсцисс - lg дозы ЭВ для повторной иммунизации; сплошные линии отражают величину контрольных показателей, пунктирные - влияние предиммунизации; звёздочкой обозначены данные, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контроля.

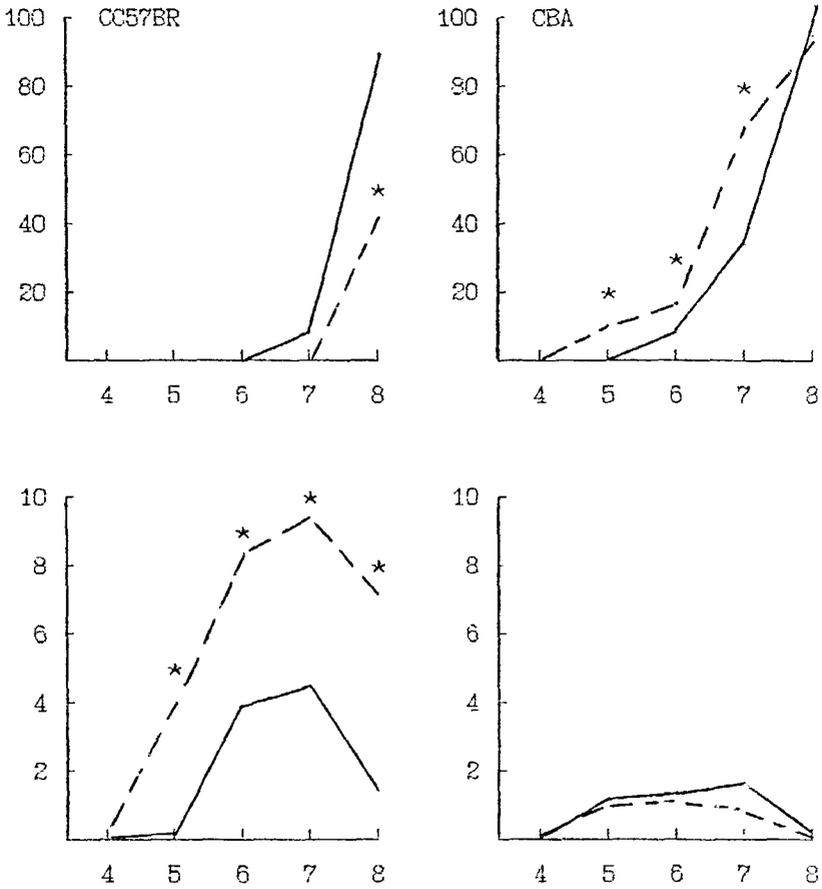


Рис. 7. Влияние среднедозовой предиммунизации на характер генерализованного иммунного ответа у мышей линии CC57BR и CBA.

Таблица 3.

Значения КС при первичном и среднедозовом вторичном иммунном ответе у мышей различного генотипа

Мыши	Локальный ответ		Генерализованный ответ	
	первичный	вторичный	первичный	вторичный
C57BL/6	-2	-3	-1	-3
BALB/c	-2	-3		нет данных
CC57BR		нет данных	-1	-3
CBA	+2	+3	~0	> +1
БНЛМ	+1	-1	-1	-2

Примечание. Сопоставлению подлежали данные только одновременного фиксирования первичного (контроль) и вторичного (опыт) иммунного ответа на мышках одной партии.

Как показывают дополнительные исследования с использованием ЦФ, стимулирующие эффекты среднедозовой предиммунизации развиваются на фоне паралича активности Тс-ГЭТ и носят кратковременный характер - в диапазоне между двумя иммунизациями в 5-8 суток. При 10-ти суточном диапазоне эффект стимуляции ГЭТ исчезает, а при его дальнейшем увеличении - роль Тс-ГЭТ становится доминирующей. Последнее, по-видимому, можно объяснить короткоживучестью Т-клеток "памяти" в отсутствии персистенции АГ (Maskay et al., 1989; Gray, 1991) или кратковременностью механизмов контрсупрессии Тс-ГЭТ.

В условиях классического высокодозового как локального, так и генерализованного иммунного ответа (опыты на мышках линии CBA и C57BL/6) регистрируется доминирование G-AOK при снижении роли Тэ и M-AOK.

Характеристика спленоцитов, ответственных за зависимую от Тэ супрессию сформировавшихся АОК

Наличие реципрокных изменений активности Тэ и сформировавшихся АОК в генерализованном, но не локальном, иммунном ответе предопределяет наличие стадио- и органспецифичных механизмов, их опосредующих. Лежащие в основе данного механизма клетки-супрессоры селезенки (КСС) должны генерироваться

у мышей различного генотипа в ответ на введение широкого диапазона доз АГ и обладать способностью ограничивать численность АОК при резком пороговом усилении активности Тэ, "отключаясь" в противоположном случае.

Для количественной оценки функции КСС использовали специально разработанный метод, который заключался в том, что спленциты от предварительно в/б иммунизированных мышей-доноров переносили п/к в стопу сингенным реципиентам. Эффективность донорских КСС фиксировали по степени ограничения локального АТГ у последних.

Опираясь на вышеизложенный метод, удалось установить, что КСС способны генерироваться в селезёнке мышей-доноров линии СВА, BALB/с гибридов F₁(CBAxС57BL/6) после в/б иммунизации практически всеми иммуногенными для развития генерализованного иммунного ответа дозами АГ (от 10⁵-10⁶ ЭБ и выше). В большинстве последующих экспериментов доноров иммунизировали в/б 10⁷ или 10⁸ ЭБ, поскольку при данных дозах АГ обычно регистрировались реципрокные изменения выраженности генерализованного АТГ и РГЗТ.

В дальнейшем на мышах линии СВА и F₁(CBAxС57BL/6) было установлено, что КСС оказывает своё регуляторное действие только в продуктивную, но не индуктивную, фазу АТГ. По-видимому, КСС не способны через систему кровотока мигрировать из селезёнки на территорию лимфатического узла, поскольку в/в перенос донорских 5x10⁷ спленцитов не оказывает супрессорный эффект на локальный АТГ у их реципиентов, как и в/б иммунизация 10⁸ ЭБ, прсведённая одновременно с п/к иммунизацией той же дозой АГ у одного животного.

Для тестирования зависимости эффективности донорских КСС от активности Тэ реципиентов использовали мышей линии СВА, поскольку у них регистрируется крайне низкая активность Тэ в генерализованном, но не локальном, иммунном ответе. Следовательно, исходя из гипотетических посылок, активность КСС в данном случае будет приоритетно зависеть от Тэ, формирующихся у реципиентов, а не у доноров.

Для моделирования различных вариантов активности Тэ у реципиентов использовали два подхода: первый - п/к иммунизацию этих мышей не только оптимальной, но и субоптимальной или допороговой для развития РГЗТ дозами ЭБ; второй - моде-

лирование у реципиентов гипо- или гиперфункции Тс-ГЭТ. Во всех случаях доноров КСС в/б иммунизировали 10^8 ЭБ.

В первом эксперименте у реципиентов КСС локальный иммунный ответ индуцировали п/к иммунизацией не только 10^8 , но и 10^5 , 10^6 , 10^7 ЭБ. В дополнительной серии опыта, с целью фиксации уровня активности Тэ, мышам вместо спленоцитов п/к вводили разрешающую дозу АГ и определяли выраженность РГЭТ. Как видно на рис. 8, перенос КСС оказывает достоверный ($P < 0,05$) супрессорный эффект на АТГ только при иммунизации реципиентов оптимальной для развития РГЭТ дозой АГ (10^8 ЭБ). При использовании субоптимальной дозы (10^7 ЭБ) - эффект супрессии недостоверен, а на допороговых для РГЭТ его дозах - отсутствует.

В другом опыте (рис. 9) установлено, что блокада формирования Тс-ГЭТ у реципиентов ЦФ сопровождается достоверным усилением действия донорских КСС, в то время как потенцирование функции Тс-ГЭТ (низкодозовой в/б предиммунизацией) - противоположным эффектом.

Таким образом, для реализации супрессорного влияния КСС на АТГ необходима достаточно высокая активность Тэ; Тс-ГЭТ способны выполнять контрсупрессорную функцию в отношении регуляторных эффектов КСС.

Далее на на мышах линии СВА удалось показать, что продолжительность жизни КСС составляет 3-8 суток от момента в/б иммунизации доноров, но их активность в отношении как М-АОК, так и G-АОК проявляется только на пике IgM-ответа (4-5 сутки от момента п/к иммунизации реципиентов). В другом эксперименте было выявлено, что по своей ЦФ-чувствительности (>20 , но <200 мг/кг) КСС дифференцируются как от Тэ (>200 мг/кг), так и Тс-ГЭТ (чувствительных к 20 мг/кг ЦФ). Тестируемые КСС не являются прилипающими к пластинку клетками - инкубация донорских спленоцитов на пластиковых чашках не уменьшает их супрессорные свойства; КСС являются Т-клетками - инкубация донорских спленоцитов с анти-Thy1-сывороткой в присутствии комплемента инактивирует их супрессорную активность.

Действие КСС АГ-специфично, поскольку иммунизация мышей-доноров линии СВА в/б 10^7 эритроцитами кролика, 10^8 эритроцитами крысы или 10^8 аллогенными эритроцитами мышей линии DBA/2 не приводит к ограничению локального АТГ на ЭБ у

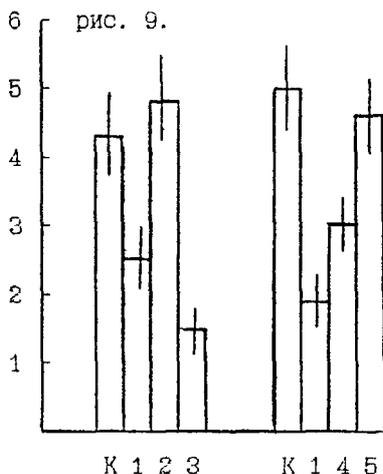
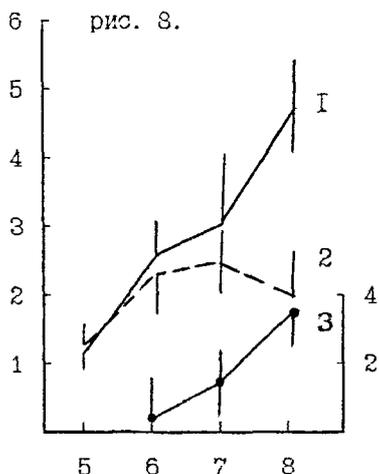


Рис. 8. Влияние КСС на локальный АТФ у реципиентов - мышей линии СВА в условиях их п/к иммунизации различными дозами ЭБ.

По оси ординат: слева (здесь и на рис. 9.) - число АОК ($\times 10^3$) на лимфатический рольных мышей. узел; справа выраженность РТЗТ в ед. По оси абсцисс - lg дозы ЭБ для иммунизации мышей-реципиентов. Линии: 1- контроль; 2- влияние КСС; 3- выраженность РТЗТ.

Рис. 9. Влияние блокады генерации Тс-ГЗТ 20 мг/кг ЦФ и низкодозовой предиммунизации на выраженность эффекта действия КСС у мышей-реципиентов линии СВА.

По оси абсцисс: К- контроль; 1- действие КСС в обычных условиях; 2- обработка ЦФ контрольных мышей; 3- обработка ЦФ мышей, получивших КСС; 4- низкодозовая предиммунизация мышей, получивших КСС; 5- низкодозовая предиммунизация у контрольных мышей.

реципиентов.

Реализация АГ-специфичного действия КСС в продуктивную фазу АТГ, предполагает возможность распознавания данными супрессорами определённого идиотипа мембранных антител на поверхности АОК. С целью проверки высказанного предположения супрессорные спленоциты, от в/б иммунизированных 10^7 ЭБ доноров, сорбировали на пластиковых чашках, покрытых специфичными к ЭБ АГ. Напротив, спленоциты для группы - контроль супрессии инкубировали на чашках, покрытых антителами только другой специфичности. Как видно из результатов опыта (табл. 4), КСС способны вступать во взаимодействие с антителами только специфичного к ЭБ идиотипа.

Таблица 4.

Идиотипспецифичность КСС у мышей линии СВА

Группы мышей реципиентов	Число АОК ($\times 10^3$) на лимфоузел
К о н т р о л ь	3,8 \pm 0,45
Контроль супрессии	2,1 \pm 0,19*
Опыт	3,4 \pm 0,21

Примечание. Звёздочкой обозначены данные, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контроля. Число мышей в группах по 10.

Если контакт КСС с АОК атрибутно не требует дополнительной рестрикции по АГ МНС, то взаимодействие КСС с другими Т-клетками подобного рода контакт предполагает. С целью разрешения данного вопроса, КСС индуцировали в/б введением 10^7 ЭБ у мышей-самок линии СВА (Н-2^k), а переносили их мышам-самкам линии DBA/2 (Н-2^d). При этом, спленоциты как от интактных, так и от в/б иммунизированных мышей линии СВА не оказывают влияния на АТГ у мышей линии DBA/2. В то же время, в условиях сингенного переноса спленоцитов и у мышей-реципиентов линии DBA/2 фиксируется достоверное ($P < 0,05$) снижение числа АОК в лимфатическом узле.

Таким образом, в селезёнке мышей при в/б иммунизации широким диапазоном доз ЭБ формируются КСС, способные ограничивать продуктивную фазу IgM-АТГ в прямой зависимости от вы-

раженности клеточноопосредованного иммунного ответа. Данные супрессоры являются короткоживущими, относительно ЦФ-чувствительными, не прилипающими к пластику Т-лимфоцитами. Действие КСС АГ-, идиотип-, органо- стадиоспецифично и на одном из этапов межклеточного взаимодействия требует рестрикции по АГ МНС.

Учитывая приведённые данные, регуляторное действие КСС в гипотетическом аспекте можно представить себе следующим образом. На первом этапе Т₃ активируют КСС посредством специфического контакта АГ-распознающего рецептора - с одной стороны, (Т₃) и структуры антиидиотип-Ia-белок (КСС) - с другой, что обуславливает необходимость рестрикции по продуктам МНС.

На втором этапе активированные КСС, через взаимодействие структуры антиидиотипа с идиотипом мембранных антител, трансформируют супрессорный сигнал на М-АСК, вероятно, изменяя соотношение Ig-секретирующих и "молчащих" АСК (Р.В.Петров, 1987).

В заключении можно отметить что, высказанные положения предопределяют наличие нескольких независимых механизмов, регулирующих взаимоотношение двух видов иммунного ответа, которые должны определяться характером АГ-го воздействия, а также иметь органо- и стадиоспецифичную природу.

Во-первых, это независимые от Т₃-ГЭТ механизмы индуктивной фазы иммунного ответа, по-видимому, ассоциированные с функцией А-клеток. Учитывая выраженную зависимость величины КС от генов МНС, можно предположить связь этих механизмов с гетерогенностью участвующих в презентации АГ Ia-белков, экспрессированных на однотипных или различных А-клетках (Matsushima et al, 1989; Furutani, 1992). При этом, различным происхождением А-клеток селезёнки и лимфатических узлов (Медуницин Н.В., 1995), вероятно, можно объяснить феномен органспецифичности соотношения ПАЧ для двух видов иммунной реактивности, регистрируемый у всех используемых мышей. По-видимому, от этих механизмов зависит первоочерёдность включения клеточноопосредованного или гуморального иммунного ответа в селезёнке и лимфатических узлах, но не возможность их взаимосвязанных реципрокных изменений. Вероятным отражением активности данных механизмов будет селективная генерация сп-

ределённых субпопуляций Т-хелперов (Тх), в различной степени влияющих на развитие клеточноопосредованного и гуморального иммунного ответа. Не вызывает сомнения задействие на данном этапе Т-клеток "памяти", возможно, посредством цитокинозависимой активации А-клеток (например, через гамма-интерферон) или формирования вторичных гетерогенных Тх/э. Возможность последнего подтверждается выраженными и неоднозначными изменениями на фоне среднетерминальной предиммунизации КС как в локальном, так и генерализованном иммунном ответе.

Органспецифичные регуляторные механизмы более поздних этапов иммуногенеза, напротив, могут опосредовать реципрокные изменения выраженности РГЗТ и АТГ (преимущественно на стадии сформировавшихся эффекторных клеток) или их ПАЧ (на стадии их индукции). По-видимому, данные механизмы определяются регуляторными взаимоотношениями на территории селезёнки различными субпопуляциями Т-лимфоцитов: Тх/э, Тс-РЗТ, КСС и Т-клеток "памяти" (при вторичном реагировании). В основе этих взаимодействий может лежать приоритетность задействия Тх в АТГ или терминальной дифференцировки Тх 1-го типа (Тх1) в Тэ (Орте, 1993).

Участие в развитии данной конкуренции цитокиноопосредованных взаимоотношений между Тх1 и Тх2 не исключается, но не является атрибутивным, учитывая преобладание у мышей в АТГ на ЭВ образования IgG2a, зависимых от Тх1, над IgE и IgG4, зависимых от Тх2 (Telford, Fridman, 1989). Скорее, Тх1 и Тх2 дифференцировано определяют два варианта иммунного ответа, соответственно, ориентированных преимущественно на макрофаги и нейтрофилы или базофилы и эозинофилы, которые включают в обоих случаях как клеточноопосредованный, так и гуморальный его компонент (Romagnani, 1991; Беклемишев Н.Д., 1995).

В отличие от формирования двух типов Тх, во взаимоотношениях клеточного и гуморального иммунного ответа конкуренция носит скорее факультативный, чем антагонистический характер и, в некоторых случаях, требует привлечения специализированных Тс. Кроме того, нельзя исключать гетерогенность Тх (включая Тх1) по другим признакам, а именно: взаимодействию с различными изотипами Ia-белков и, соответственно, по характеру их АГ-специфичных регуляторных сигналов; по направленности терминальной дифференцировки; взаимосвязи с дру-

гими регуляторными факторами и т.д. В целом проблема взаимосвязи различных составляющих иммунного ответа требует для своего решения системного подхода и интегрирования различных экспериментальных исследований, проводимых как в системе *in vitro*, так *in vivo*.

В В В О Д Ы

1. Соотношение клеточного и гуморального иммунного ответа на ЭБ у мышей непостоянно, а зависит от его органной локализации, способа и кратности иммунизации, дозы антигена, влияния генетических, возрастных и средовых факторов.

2. В селезёнке данные процессы взаимосвязаны через реципрокные изменения их выраженностей и уровней порогов антигенной чувствительности; в регионарном лимфатическом узле они развиваются относительно независимо друг от друга.

3. Регуляторные механизмы, обуславливающие реципрокные изменения порогов антигенной чувствительности, приоритетно задействуются в индуктивную фазу иммунного ответа, а выраженности двух его видов - в эффекторную.

4. Первичный иммунный ответ у линейных мышей, исходя из соотношения двух его составляющих, можно подразделить на два оппозитных генетически детерминированных типа; белые нелинейные мыши и мыши-гибриды F_1 имеют промежуточные варианты реагирования; признак не сцеплен с полом и кодируется аддитивно взаимодействующими полигенами.

5. Основным межтиповым дифференцирующим критерием является соотношение порогов антигенной чувствительности для развития РГЭТ и антителогенеза как при местном, так и генерализованном реагировании; он приоритетно контролируется генами МНС, а соотношение их выраженностей - больше генами, не входящими в МНС.

6. При селективном вторичном Т-клеточном иммунном ответе, но не при вторичном антителогенезе, отмечается усиление межтиповых различий иммунного реагирования на фоне понижения порога антигенной чувствительности для его развития в целом.

7. Низкодозовые Т-супрессоры РГЭТ, через ограничение выраженности и повышение порога антигенной чувствительности реакции, во многом определяют диапазон модификационной из-

менчивости соотношения двух видов иммунного ответа.

8. Ингибирующее влияние факторов клеточного иммунного ответа на сформировавшиеся АОК в селезёнке опосредуется особой органо- и стадийспецифичной субпопуляцией Т-супрессоров.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кеворков Н.Н., Князев Ю.А., Гусев Е.Ю. Иммуномодулирующие эффекты глюкагона//Пробл. эндокринологии.-1987.- №5.- С. 68-70.

2. Кеворков Н.Н., Гусев Е.Ю., Созинова Г.М. Гормональная регуляция межклеточных взаимодействий иммуноцитов// Первый Всесоюзный иммунологический съезд.- Сочи, 1989.- С7 49.

3. Кеворков Н.Н., Гусев Е.Ю., Князев Ю.А. Влияние глюкагона на развитие ГЗТ у мышей// Пробл. эндокринологии. - 1989.- №4.- С. 68-71.

4. Гусев Е.Ю. Влияние супрессоров ГЗТ на конкурентные взаимоотношения гуморального и клеточного иммунитета// В кн: Молекулярные и клеточные основы клинической иммунологии. Респ. сб. науч. тр./2 МОЛГМИ.- М., 1989.- С. 229-234.

5. Кеворков Н.Н., Гусев Е.Ю., Созинова Г.М. Глюкагон и инсулинзависимый контроль формирования гуморального иммунного ответа// Взаимосвязь нервной и иммунной систем: Тез. докл. 5- Всесоюзный симпозиум. - Оренбург, 1990.- С. 35.

6. Кеворков Н.Н., Гусев Е.Ю., Поносов В.Л., Павлюк В.Л., Заречнева Н.В., Ульянова Т.Ю. Влияние глюкагона на функцию иммунокомпетентных клеток// Иммунология. №1.- 1990.- С. 34-36.

7. Кеворков Н.Н., Гусев Е.Ю., Князев Ю.А. Влияние глюкагона и голодания на взаимосвязь клеточного и гуморального иммунного ответа// Пробл. эндокринологии.- 1991.- №6.- С. 54-56.

8. Гусев Е.Ю., Поносов В.Л., Кеворков Н.Н. Взаимосвязь клеточного и гуморального иммунного ответа у мышей// Бюл. экпер. биол. -1991.- №9.- С7 271-273.

9. Бахметьев В.А., Ширшёв С.В., Гусев Е.Ю. Статистический анализ дозовой зависимости действия гормонов на иммунный ответ// ВИНТИ, N 8897-В87.

10. Гусев Е.Ю. Влияние двухдневного голодания на первичный иммунный ответ (там же), N 2416-В87.

11. Кеворков Н.Н., Вахметьев Б.А., Гусев Е.Ю., Созинова Г.М. Иммуномодулирующие эффекты тироксина, глюкогона и инсулина// Тез. докл. 2-Всеюз. съезд эндокринологов.- Челябинск, 1991.- С. 20-21.

12. Гусев Е.Ю., Кеворков Н.Н. Межлинейные различия иммунного ответа на введение различных доз эритроцитов барана у мышей// Тез. докл. 1 Съезда иммунологов Чувашии.- Чебоксары, 1991.- С 16.

13. Гусев Е.Ю., Кеворков Н.Н., Поносов В.Л. Некоторые варианты взаимосвязи клеточного и гуморального иммунного ответа// (там же).

14. Гусев Е.Ю. Влияние глюкогона на кооперацию Т- и В-лимфоцитов// ВИНТИ, N 2330-В88.

15. Гусев Е.Ю. Влияние двухдневного голодания на развитие РТЗТ к эритроцитам барана у мышей// (там же), N2417-В88.

16. Гусев Е.Ю. Влияние глюкогона на колониеобразование// (там же), N 2331-В88.

17. Гусев Е.Ю. Влияние глюкогона на развитие РТЗТ// (там же), N 2332-В88.

18. Гусев Е.Ю., Кеворков Н.Н., Поносов В.Л. Межлинейные и межполовые различия иммунного ответа у мышей// Тез. докл. 2-Научной конференции "Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях". - Челябинск, 1992. - С. 26.

19. Гусев Е.Ю., Поносов В.Л. Влияние РТЗТ на антителогенез// Тез. докл. 1-Съезд иммунологов России. - Новороссийск, 1992.- С. 126.

20. Кеворков Н.Н., Вахметьев Б.А., Гусев Е.Ю., Созинова Г.М. Эндокринная регуляция функции иммуноцитов// (там же).- С. 205-206.

21. Гусев Е.Ю., Кеворков Н.Н. Характеристика Т-супрессоров, ответственных за конкуренцию между клеточным и гуморальным иммунным ответом//Бюл. exper. биол.- 1993.- N3-С. 287-288.

22. Гусев Е.Ю. Влияние двухдневного голодания на формирование Т-супрессоров у мышей//ВИНТИ, N1867-В88.

23. Гусев Е.Ю. Влияние возраста и пола на соотношение клеточного и гуморального иммунного ответа//ВИНТИ, N2534-В93.

24. Гусев Е.Ю., Кеворков Н.Н. Генетические и фенотипические аспекты взаимосвязи клеточного и гуморального иммунного ответа//Бюл. exper. биол. -1993.- №3.- С.289-290.
25. Гусев Е.Ю., Поносов В.Л. Индуцированная золотистым стафилококком антигеннеспецифичная иммуносупрессия// Журн. микробиол. -1993.- №2.- С.122-124.
26. Гусев Е.Ю., Поносов В.Л. Влияние возраста и пола на соотношение клеточного и гуморального иммунного ответа// ВИНТИ, N2534-B93.
27. Гусев Е.Ю. Антиидиотипические супрессоры селезёнки у мышей// (там же), N2535-B93.
28. Гусев Е.Ю., Поносов В.Л., Кеворков Н.Н. Регуляторные эффекты супрессоров ГЗТ в локальном и генерализованном иммунном ответе// Пат. физиол.-1993.- №1.- С. 39-41.
29. Гусев Е.Ю., Поносов В.Л., Кеворков Н.Н. Варианты вторичного иммунного ответа у мышей линии СВА и С57BL/6// Бюл. exper. биол. -1994.- №11.- С. 486-488.
30. Гусев Е.Ю., Кеворков Н.Н., Поносов В.Л. Межлинейные особенности вторичного иммунного ответа у мышей// (там же), С. 499-501.
31. Гусев Е.Ю., Поносов В.Л. Влияние голодания и глюкогона на соотношение клеточного и гуморального иммунного ответа у мышей// Тез. докл. 1-Международный научный конгресс "Традиционная медицина и питание".- М., 1994.-№441.- С. 248-249.