

М. Г. АГАДЖАНЯН, А. Е. ГУРВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕНСИВНОГО АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ВНЕ ОРГАНИЗМА КЛЕТОК ИММУННОГО ЖИВОТНОГО

Изучалось интенсивное антителообразование при культивировании с антигеном суспензии клеток селезенки иммунного животного вне организма. Установлено, что при этом образуется во много раз большее количество антителообразующих клеток (АОК), чем в организме.

При иммунизации животного наблюдается быстрый рост биосинтеза антител и числа антителообразующих клеток, который после достижения максимума резко падает [1—3]. Имеется большая литература, описывающая восходящую часть этой кривой (взаимодействие Т- и В-клеток, пролиферация клонов АОК) [1, 4, 5]. Значительно менее изучена фаза торможения антителообразования. Она не связана, по-видимому, с нехваткой антигена. В пользу этого говорит тот факт, что повторное введение антигена на пике иммунного ответа приводит к возрастанию интенсивности биосинтеза антител и числа АОК лишь в два раза [6]. С другой стороны, при добавлении антигена к клеткам, извлеченным из организма через четверо суток после иммунизации животного, и культивировании их вне организма наблюдается увеличение числа АОК более чем в 100 раз [6, 7].

В настоящей работе приводятся данные о динамике интенсивного увеличения числа АОК в иммунной суспензии, зависимости этого нарастания от дозы антигена, плотности культивируемых клеток и специфичности этого феномена.

Материал и методика. В работе использовали мышей линии С₅₇В1/6 весом 18—20 г (питомник «Столбовая» АМН СССР). Для иммунизации применяли водорастворимый антиген эритроцитов барана (ВРАБЭ) [8], эритроциты барана (ЭБ) и эритроциты осла (ЭО) в консерванте 7Б.

Животных иммунизировали внутривенно разными дозами ВРАБЭ или эритроцитами по $500 \cdot 10^6$ клеток в объеме 0,2 мл.

В опытах *in vitro* применяли метод Мишель и Даттона [9], модифицированный Кликом с соавт. [10] и Турвичем с соавт. [6]. Культуру инкубировали в силиконированных стеклянных флаконах диаметром 22—24 мм. Селезенки мышей извлекали стерильно, клетки из них вылущивали, суспендировали в среде Игла и дважды отмывали той же средой, центрифугируя при 700 г. Все операции после извлечения селезенки и до начала инкубации проводили стерильно на холоду. Отмытые клетки переводили в среду, описанную Кликом и соавт. [10], к которой добавляли инсулин (0,24 ед/мл) и глюкозу (1 мг/мл) [6]. Суспензию клеток разливали по 1 мл во флаконы, которые затем заполняли газовой смесью (5% CO₂, 10% O₂, 85% N₂).

В качестве ингибиторов митозов использовали винбластин, который добавляли к

культуре в объеме 0,1 мл (фирма «Ели Лилли и К^о», Индианаполис, США). Для определения уровня синтеза ДНК применяли ³H-тимидин (фирмы «Изотоп») с удельной активностью 11 кю/Мм. Для удаления АОК из суспензии использовали комплект морской свинки, сыворотку которой добавляли к культуре в объеме 0,1—0,2 мл.

Во всех случаях определяли количество ИгМ-антителообразующих клеток методом Эрне [3], а количество живых и мертвых клеток—при помощи окраски эозином—трипановым синим [11].

Включение метки в ДНК определяли на счетчике «Марк 11» (США).

Результаты и обсуждение. Динамика образования АОК в иммунной суспензии. Мышей линии С₅₇В1/6 иммунизировали 1000 мкг/мышь ВРАБЭ. Через четверо суток после иммунизации определяли число АОК на 10⁶ живых ядерных клеток селезенки. К суспензии клеток, извлеченных из селезенки, добавляли антиген (50 мкг/мл ВРАБЭ) и определяли АОК на 1, 2, 3, 4, 5-е сутки инкубации.

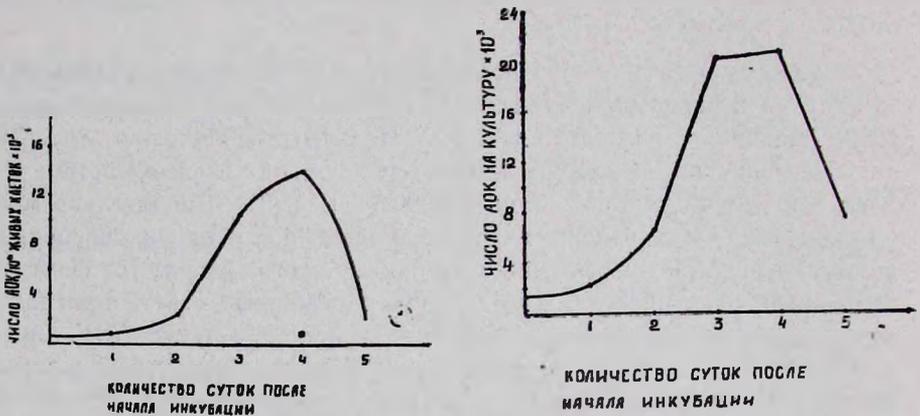


Рис. 1. Динамика чрезвычайно интенсивного нарастания числа АОК при инкубации иммунных клеток селезенки с антигеном: звездочка—максимальное число АОК, образующихся в цельном организме после повторного (на 4 день после первичного) введения антигена. а) Изменение числа АОК при расчете на 10⁶ живых клеток. б) Изменение числа АОК во всей культуре.

Как видно из рис. 1, число АОК во время инкубации резко возросло, достигая максимума на 4-й день, и затем начинало снижаться. Выживаемость клеток в течение всего времени инкубации иммунной суспензии была хорошей (50—20%). Число клеток, синтезирующих 19-S антитела во время максимального ответа, было в 52 раза больше, чем в начале инкубации*. В других опытах КУ колебался в пределах 10—100 и более. За то же самое время в организме после повторного введения антигена число АОК увеличивалось только в 2 раза.

Зависимость изучаемого эффекта от дозы антигена. Мышей иммунизировали различным количеством антигена и на 4-е сутки во всех суспензиях определяли число АОК. В этих условиях уже при введении мышам 150 мкг антигена в их селезенках обнаруживалось по 179 АОК

* Соотношение числа АОК в конце и в начале инкубации в дальнейшем будем обозначать как коэффициент усиления (КУ).

на 10^6 ядерных клеток. Более высокие дозы антигена приводили к дальнейшему, хотя и небольшому, увеличению числа клеток АОК (рис. 2). Суспензии клеток, полученные из селезенок, инкубировали в присутствии 0,25; 50; 100 мкг ВРАБЭ на культуру. Число 19-S АОК определяли на 4-е сутки инкубации. Как видно из рис. 2, максимум АОК обнаруживался при дозе антигена в культуре 25 и 50 мкг. Дополни-

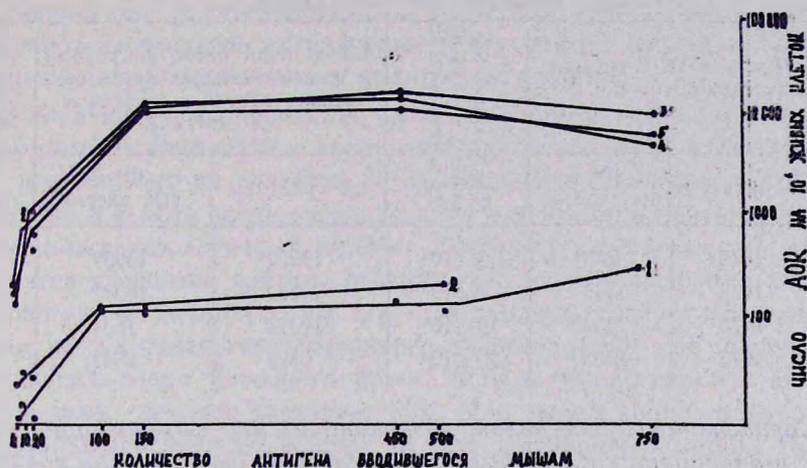


Рис. 2. Зависимость числа АОК образовавшихся при инкубации иммунных клеток *in vitro*, от количества антигена (ВРАБЭ), использовавшегося для иммунизации животных и добавлявшегося к культурам. Кривая 1—число АОК в момент извлечения клеток на 4 день после иммунизации разными дозами антигена. Число АОК в суспензиях иммунных клеток, инкубировавшихся 40 суток *in vitro* без антигена (кривая 2), с добавлением 25 мкг антигена (кривая 3), 50 мкг антигена (кривая 4) и 100 мкг антигена (кривая 5).

ние 100 мкг антигена на культуру приводило к некоторому снижению числа АОК. Коэффициент усиления в зависимости от дозы антигена варьировал в пределах 40—100 и больше. В дальнейшем мы использовали для иммунизации мышей 150—1000 мкг антигена на мышь. В культуру добавляли 25 и 50 мкг ВРАБЭ на 1 мл среды.

Влияние плотности суспензии культивируемых клеток на нарастание числа АОК. Ранее в нашей лаборатории было показано, что нарастание числа АОК в нормальной суспензии селезеночных клеток зависит от плотности суспензии [12]. В связи с этим возник вопрос: не зависит ли различие между развитием антителообразования в организме и культуре клеток от различий в плотности «упаковки» клеток в селезенке и в приготовленной из нее для культивирования суспензии? Для выяснения этого вопроса мы культивировали суспензию иммунных клеток в пробах, содержащих разное количество клеток. Из табл. 1 следует, что в пробах с большей плотностью клеток в конце инкубации образуется в пять раз меньшее число АОК, чем в пробах с «оптимальной» концентрацией клеток. При этом КУ соответственно снижается с 52 до 10. Следовательно, увеличение плотности культивируемых

клеток подавляет антителообразование в иммунной суспензии. Однако, на наш взгляд, разница в плотности клеток селезенки и в суспензии не является единственным фактором, определяющим различия в реакции в организме и в клеточных культурах.

Таблица 1

Зависимость антителообразования от плотности культивируемой суспензии иммуных клеток

№ группы	Число АОК в момент извлечения (на 4-е сут-ки)		Число культивируемых клеток на 10 ⁶ живых клеток	Число АОК после инкубации в течение четырех суток суспензии клеток с антигеном (50 мкг/мл)		% выживших клеток
	на культуру	на 10 ⁶ живых клеток		на культуру	на 10 ⁶ живых клеток	
I	1475	265	2,5×10 ⁶	13250	13059	34
II	1475	265	5×10 ⁶	23000	13687	31
III	1475	265	10×10 ⁶	17312	7831	20
IV	1475	265	20×10 ⁶	6325	2644	11

Специфичность изменений, возникающих при иммунизации в организме и приводящих к интенсивному антителообразованию в культурах. Приведенные выше данные были получены при культивировании суспензии иммуных клеток с гомологичным антигеном.

Представляло интерес изучить развитие реакции клеток с гетерологичным антигеном. С этой целью мы иммунизировали мышей одним из двух не реагирующих перекрестно антигенов [10], ЭБ или ЭО. Через четверо суток после введения мышам антигена из их селезенок готовили суспензию клеток, которую культивировали 4 дня (табл. 2).

Таблица 2

Специфичность чрезвычайно интенсивного антителообразования

Иммунизация		Число АОК в начале инкубации				Иммунизация in vitro начиная с момента извлечения через 4 дня после иммунизации	Число АОК в конце инкубации			
в 0 день	на 3 день	на 10 ⁶ живых клеток		на культуру			на 10 ⁶ живых клеток		на культуру	
		К ЭБ	К ЭО	К ЭБ	К ЭО		К ЭБ	К ЭО	К ЭБ	К ЭО
ЭБ		574	7	2313	34	ЭБ	18205	31	24586	43
ЭБ		574	7	2313	34	ЭО	636	174	725	223
ЭО		11	352	54	1760	ЭО	33	928	47	1321
ЭО		11	352	51	1760	ЭБ	454	280	442	268
ЭБ	ЭО	845	3	4395	15	ЭБ	21934	127	29741	147
ЭБ	ЭО	845	3	4395	15	ЭО	563	327	460	225
ЭО	ЭБ	9	475	45	2565	ЭБ	304	435	253	348
ЭО	ЭБ	9	475	46	2565	ЭО	137	2324	260	2933

Как видно из табл. 2, при добавлении к иммунной суспензии гомологичного антигена число АОК в течение инкубации увеличивалось очень

сильно. Когда же к культуре клеток, иммунизированных против эритроцитов барана, добавляли гетерологичный антиген (ЭО), то число АОК к ЭБ к концу инкубации существенно не менялось. Необходимо отметить, что в этих условиях число АОК к ЭО за время инкубации возросло. Это соответствовало обычной иммунной реакции на антиген, добавленный к суспензии нормальных клеток. Такая же картина наблюдалась в случае, когда суспензию клеток, иммунную против ЭО, культивировали с гетерологичным антигеном (ЭБ). Эти результаты указывают на высокую специфичность изучаемого эффекта и на возможность получить усиление к разным антигенам.

В следующей серии опытов мы попытались изучить темпы развития указанных изменений в организме животного после введения антигена, влияние на их развитие гетерологичного антигена. Для этого мышам на 3-й день после введения антигена вводили повторно гомологичный или гетерологичный антиген. Через сутки сравнивали способность этих суспензий клеток отвечать как на гомологичный, так и на гетерологичный антиген (табл. 2). Из таблицы следует, что введение мышам на 3-и сутки гетерологичного антигена (ЭО) не препятствует образованию очень большого числа АОК к гомологичному антигену (ЭБ) и даже немного повышает его. При этом к концу инкубации к ЭО развивается иммунный ответ по типу первичной реакции. При добавлении к такой же суспензии клеток гетерологичного антигена (ЭО) число АОК к гомологичному антигену (ЭБ) за время инкубации не только не возрастает, но даже падает. В тех же условиях при культивировании в суспензии клеток, полученных от мышей, иммунизированных сначала ЭО, а затем ЭБ, наблюдалась такая же картина.

Попытки выяснения механизма изучаемого эффекта. Нарастание числа АОК при культивировании суспензии иммунных клеток может быть связано со следующими процессами: с быстрой пролиферацией уже существующего клона АОК; за счет стимуляции к пролиферации долгоживущей популяции лимфоцитов—клеток памяти; за счет популяции каких-то недифференцированных клеток, которые после воздействия антигена дифференцируются в АОК без пролиферации («вовлечение») [7]. Можно предположить и комбинации этих трех процессов.

Вопрос о происхождении вновь образовавшихся АОК можно было бы решить удалением перед началом культивирования всех присутствующих АОК из суспензии. Можно было бы думать, что комплемент (С') при взаимодействии с F-с фрагментом антител иммунного комплекса, образовавшегося на поверхности АОК, должен лизировать их. Поэтому 5, 10 и 20% С' добавляли на некоторое время (1; 1,5; 2 и 4 часа) к суспензии необработанных иммунных клеток и иммунных клеток, обработанных предварительно различными способами: ВРАБЭ, сначала ВРАБЭ, а затем антителами против него, и, наконец, комплексом ВРАБЭ—анти-ВРАБЭ.

Однако нам ни в одном случае не удалось освободиться полностью от АОК, присутствующих в иммунной суспензии до обработки. В ряде

случаев наблюдалось уменьшение их числа, но оно сильно варьировало от опыта к опыту.

Более того, некоторое угнетение числа АОК наблюдалось и в контрольных пробах. В некоторых случаях обработка комплементом приводила к парадоксальному результату: наблюдалось увеличение количества АОК. Мы пришли к выводу, что для полного и специфического удаления числа АОК в суспензии иммунных клеток необходимо искать новые подходы.

Для выяснения вопроса о том, связано ли нарастание числа АОК только с пролиферацией или оно связано и с «вовлечением» новых клеток, мы иммунную суспензию клеток инкубировали с винбластином. Ингибирование синтеза ДНК измеряли по включению ^3H -тимидина, добавленного к культуре в концентрации 1 мккюри/мл.

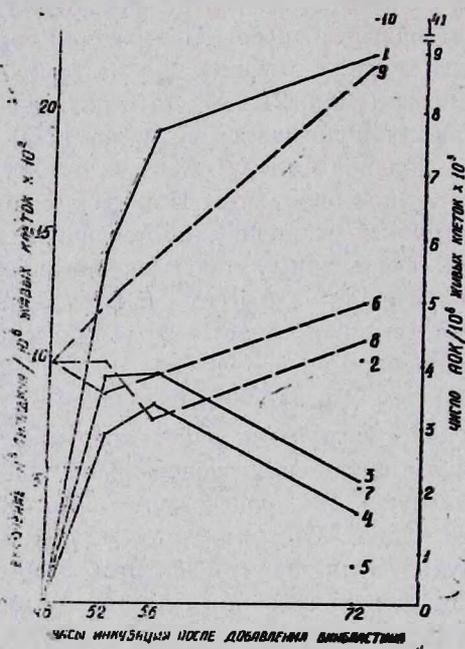


Рис. 3. Действие винбластина, добавленного к иммунным клеткам на 2-е сутки инкубации *in vitro* с антигеном на быстрое нарастание числа АОК и включения H^3 тимидина в ДНК в течение 4, 8 и 24 часов культивирования с ингибитором митозов. Включение метки в ДНК в культурах инкубированных: без винбластина (кривая 1), с 0,2 мкг винбластина (точка* 2), с 1,0 мкг винбластина (кривая 3), с 25 мкг винбластина (кривая 4), с 100 мкг винбластина (точка* 5).

Изменение числа АОК в течение 48—72 часов инкубации: без винбластина (кривая 6 пунктирная), с 0,2 мкг винбластина (точка* 7), с 1 мкг винбластина (кривая 8 пунктирная), с 25 мкг винбластина (кривая 9 пунктирная), с 100 мкг винбластина (точка* 10).

* Точки 2, 5, 7, 10—культура исследовалась только через 24 часа после начала инкубации.

Как видно из рис. 3, добавление винбластина уже через 4 часа полностью ингибирует включение метки в ДНК. Выживаемость при использовании малых доз винбластина в первые 4—8 час. снижается относительно мало. При дальнейшей инкубации клеток с этими дозами ингибитора некротическое действие его выражено сильнее. Большие дозы винбластина оказывают заметное некротическое действие с самого начала инкубации. При малых дозах винбластина нарастание числа АОК сразу же прекращается. Можно заключить, что нарастание числа АОК в списываемых условиях целиком обусловлено пролиферацией клона АОК. При добавлении больших доз винбластина к концу инкубации число АОК резко возрастает (рис. 3). Возможно, под действием винбластина значительно быстрее гибнут клетки, не образующие антитела, чем АОК.

Полученные нами данные, как и результаты некоторых исследований, опубликованных ранее [6, 7], свидетельствуют о том, что введение антигена животному приводит к перестройке, вызывающей резкое усиление нарастания числа АОК при последующей инкубации клеток селезенки вне организма. Представленные здесь данные указывают на специфичность этой перестройки в отношении гомологичного антигена, который вводился животному, и для его развития необходимо более чем 24 часа.

Очевидно, что указанная перестройка связана с размножением или дифференцировкой каких-то клеток под влиянием вводимого в организм антигена. Речь может идти об увеличении числа Т-хелперов, которые при инкубации *in vitro* обуславливают интенсивное нарастание числа АОК. Имеются многочисленные данные, указывающие на усиление пролиферации Т-клеток при иммунизации [13, 14]. Однако, согласно нашим данным, введение ЭБ приводит к перестройке только в отношении данного антигена, но не способствует усилению образования АОК против ЭО при культивировании клеток с этим антигеном. Между тем из литературы известно, что Т-хелперы, стимулирующие нарастание числа АОК к ЭБ, в значительной степени способствуют также нарастанию числа АОК к ЭО [15]. Поэтому можно предположить, что изучаемая нами перестройка не обусловлена пролиферацией Т-хелперов.

Другими клетками, обуславливающими быстрое нарастание АОК при инкубации *in vitro*, могут служить клон АОК против ЭБ, который образовался и пролиферировал после иммунизации. В организме животного клон по каким-то причинам теряет способность к дальнейшей пролиферации. Эта способность восстанавливается после извлечения клеток селезенки и приготовления из нее суспензии.

Третьей группой клеток, которые могут играть роль в изучаемом нами эффекте, могут быть клетки памяти. Не исключаются также какие-то недифференцированные клетки, превращающиеся под действием антигена *in vitro* в АОК. Начатые нами исследования с использовани-

ем разных ингибиторов клеточного метаболизма, возможно, дадут ответ на эти вопросы.

Лаборатория химии и биосинтеза антител ИЭМ им. Гамалеи
АМН СССР, Москва, Лаборатория молекулярных основ
иммуногенеза АН АрмССР, Ереван

Поступило 4.I 1976 г.

Մ. Հ. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Ա. Ե. ԳՈՒՐՎԻՉ

ԱՐՏԱԿԱՐԳ ԻՆՏԵՆՍԻՎ ՀԱԿԱՄԱՐՄՆԱԳՈՅԱՑՄԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՕՐԳԱՆԻԶՄԻՑ ԴՈՒՐՍ ԻՄՈՒՆ
ԿԵՆԴԱՆՈՒ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԿՈՒՂՏԻՎԱՑՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է իմուն կենդանու բջիջների սուսպենզիայում ինտենսիվ հակամարմնազոյացումը անտիգենի հետ կուլտիվացման դեպքում: Հնդ որում ամբողջական օրգանիզմի համեմատությամբ այստեղ առաջանում են մի քանի անգամ ավելի մեծ քանակությամբ հակամարմին առաջացնող բջիջներ: Դիտարկվել է հակամարմին առաջացնող բջիջների քանակի արտակարգ աճման դինամիկան իմուն սուսպենզիայում, այդ աճի կախվածությունը անտիգենի դոզայից և կուլտիվացվող բջիջների խտությունից, ինչպես նաև այդ երևույթի սպեցիֆիկությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бернет М. Клеточная иммунология, М., 1969.
2. Гурвич А. Е. Всесоюзная научно-техническая конференция по применению радиоактивных и стабильных изотопов в народном хозяйстве и науке. М., 1958, с. 55.
3. Jerne N. K., Nordln A. A. Science, 140, 405, 1963.
4. Diener E, and Langman R. E. Progr. Allergy 18, 6, Karger Basel, 1975.
5. Katz D. H. and Benacarraff B. Adv. Immunol., 15, 1, 1972.
6. Гурвич А. Е., Григорьева О. С., Қорукова А. А. Бюлл. экспер. биол. и мед. 78, № 10, 74, 1974.
7. Dutton R. I., Mishell R. W. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 32, 407, 1967.
8. Seman M., Marte I. C., Bussard A. E. Eur. J. Immunol. 2, 387, 1967.
9. Mishel R. I., Dutton R. W. J. Exp Med, 126, 432, 1967.
10. Cline R. E., Benck L., Alter B. I. Cell Immunol. 3, 264, 1972.
11. Бронда Б. Д. Вопросы онкологии, 8, 64, 1964.
12. Gurvitch A. E., Korukova A., Grigoryevu O. Immunol. 28, 271, 1975.
13. Fidler J. M., Daniel E. M. and Golub E. S. Cell Immunol., 4, 1, 29, 1972.
14. Kapter J. M. and Hoffman M. J. of Exp. Med. 137, 6, 1325, 1973.
15. Hoffman M. and Kapter J. W. J. Immunol, 108, 1, 261, 1972.