

Индукция специфического гуморального иммунного ответа к антигенам патогенных бактерий при хроническом декомпенсированном тонзиллите

А.Ц. Серобян, Т.К. Давтян, А.К. Шукурян

Отделение ЛОР болезней МЦ «Эребуни», Исследовательский центр «Арменикум»

375002, Ереван, ул. Шерами, 2

Ключевые слова: тонзиллярные лимфоциты, гуморальный иммунный ответ, антителообразующие клетки, антигены патогенных бактерий

Возможность образования специфических антител в миндалинах впервые обнаружена в 1912 г. [цит. по 4]. В лимфоидной ткани миндалин синтезируются антитела всех основных классов иммуноглобулинов, в частности IgM, IgG и IgA [11,12]. Установлено, что на поверхности тонзиллярных лимфоцитов экспрессируются IgG (15%) и IgM (12,8%) [16]. В небных миндалинах и аденоидах обнаружена также наиболее высокая продукция IgE по сравнению с другими тканями [10].

Различная функциональная активность клеток лимфоидной ткани миндалин выявлена у взрослых и детей, страдающих хроническим тонзиллитом [3]. У детей выявлены преимущественно клетки, продуцирующие IgG, а в миндалинах взрослых – IgA и IgE [5, 11]. Показано, что в миндалинах больных хроническим тонзиллитом нарушен синтез интерлейкина-2 (ИЛ-2) в ответ на стимуляцию митогенами или антигенами *in vitro* [8]. ИЛ-2 также способствует селективному и быстрому росту CD5⁺В-клеток из зародышевых центров миндалин и синтезу IgM, но не IgG или IgA [9]. Наблюдаются четкие различия в процессах синтеза ИЛ-4 в миндалинах и селезенке или периферической крови, что связано с длительной антигенной стимуляцией клеток в этом органе [14, 15]. Миндалины обогащены активированными клетками, синтезирующими больше IgA и IgG, по сравнению с клетками селезенки, в связи с локализацией клеток памяти, способных секретировать определенные цитокины [8,13].

Ранее нами было показано, что выраженность иммунологических нарушений у детей с хроническим декомпенсированным тонзиллитом во многом зависит как от изменения видового и количественного соотношения нормальной микрофлоры кишечника, так и от наличия патогенной или условно-патогенной микрофлоры ротоглотки и кишечника [7]. Причем иммунологические нарушения при наличии одного и того же патогена характеризуются однотипными изменениями – подавлением клеточного иммунитета и усилением

гуморального звена иммунного ответа [7].

С целью выявления корреляции между наличием патогенной или условно-патогенной микрофлоры и индукцией антиген-специфического гуморального иммунного ответа у детей с декомпенсированным тонзиллитом исследована способность тонзиллярных лимфоцитов продуцировать IgG, IgM, IgA, а также антиген-специфические иммуноглобулины при антигенной и/или митогенной стимуляции клеток в культуре.

Материал и методы

Приготовление антигенов. В работе использовали стандартные штаммы *S.aureus* (штамм ИНМИА 5233 из коллекции культур Института микробиологии НАН РА), *Y.enterocolitica* (штамм 03), а также *K.pneumoniae* и *S.flexneri*, выделенные от больных и выращенные на питательных средах. Собранную биомассу трижды отмывали в 0,9% NaCl и фиксировали в формалине. Для этого 10 объемов бактериальной суспензии смешивали с 4 объемами формалина (16,5% раствор в фосфатно-солевом буфере – ФСБ, pH 7,2), смесь инкубировали 2 ч на водяной бане при 37°C, перемешивая через каждые 15 мин, затем бактерии отмывали 6 раз в ФСБ (pH 7,2) [6]. При использовании указанных бактерий в качестве антигенов готовили рабочее разведение (1:200) маточной бактериальной суспензии с ОП₆₂₀=0,7.

Выделение тонзиллярных лимфоцитов. Под нашим наблюдением находился 21 ребенок с хроническим декомпенсированным тонзиллитом с сопутствующим дисбактериозом или патогенной и условно-патогенной микрофлорой кишечника [7]. Небные миндалины больных детей, удаленные хирургическим путем, гомогенизировали в ФСБ. Суспензию клеток отмывали в 50 мл ФСБ 10 мин при 1500 об/мл. Осадок ресуспендировали в 14 мл ФСБ и по 7 мл наслаивали

на 3 мл градиента плотности фиколл-верографин. После 45 мин центрифугирования при 1500 об/мин собирали фракцию мононуклеаров и отмывали в 100 мл ФСБ. Число лимфоцитов подсчитывали в камере Горяева, отмывали в 50 мл ФСБ, после чего клетки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 20% кондционированной среды стимулированных лимфоцитов. В качестве поликлонального активатора использовали митоген лаконоса (МЛ) в конечной концентрации 5 мкг/мл. Индукцию гуморального иммунного ответа и определение выживаемости лимфоцитов (с помощью окрашивания 0,1% раствором трипанового синего) проводили в течение 3 или 6 дней культивирования клеток в концентрации 2.5×10^6 в 1 мл среды.

Выявление отдельных антителообразующих клеток (АОК). Для выявления отдельных АОК в культурах лимфоцитов использовали метод иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозных фильтрах, покрытых антигеном [1,5]. Фильтры активировали смачивая карбонатным буфером (рН 9,4), содержащим 0,25% глутарового альдегида. Бактериальную суспензию (ОП620=1) в карбонатном буфере, содержащем 0,1М глицина, фильтровали через активированный фильтр, который инкубировали 30 мин при 37°C, затем 12 ч при 4°C. После инкубации фильтры отмывали 3 раза в отмывочном буфере (ФСБ, содержащий 0,2% альбумина и 0,02% Tween-20). Культивированные тонзиллярные лимфоциты отмывали в ФСБ, ресуспендировали в 50 мкл полной среды и добавляли дробно на фильтры и инкубировали 4 ч при 37°C 5% CO₂, после чего отмывали в ФСБ. В качестве хромогена использовали 0,1% 4-Cl- α -нафтол (Sigma) в ФСБ, в присутствии 0,3% H₂O₂. При определении числа АОК, синтезирующих антитела различных классов, фильтры покрывали антителами против IgM, IgG или IgA человека.

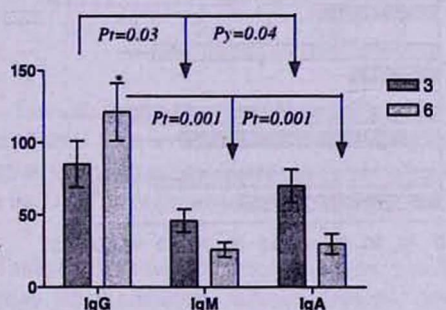
Статистическая обработка данных. При статистическом анализе различий между исследованными группами проводилась проверка вариационных рядов на нормальность распределения и однородность дисперсий (критерий Колмогорова – Смирнова, W и F критерий). В случаях, когда гипотеза нормальности отвергалась, использовались непараметрические критерии Уилкоксона-Манна-Уитни (P_u). В остальных случаях расчет проводился с помощью критерия Стьюдента (P_t), парного T критерия (P_p) и корреляционного анализа.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенных экспериментов, тонзиллярные лимфоциты способны образовывать в культуре АОК, синтезирующие IgM, IgG и IgA как в отсутствие, так и присутствии неспецифического активатора лимфоцитов – МЛ (рис.1). В нестимулированных культурах тонзиллярных лимфоцитов в основном наблюдался синтез IgG (P_t и $P_u < 0,05$) на 3-й и 6-й дни инкубации клеток (число АОК на 3-й день – 85 ± 16 , на 6-й – 121 ± 20). Количество АОК, синтезирующих IgM и IgA, составляло 46 ± 8 и $70 \pm 11,5$ на 3-й и 26 ± 5 и 30 ± 7 на 6-й день соответственно (рис.1).

В культурах МЛ-стимулированных лимфоцитов также был обнаружен преимущественный синтез IgG (число АОК на 3-й день – 127 ± 21 , на 6-й – 95 ± 18), что статистически достоверно выше ($P_t = 0,03$ и $P_u = 0,02$), чем продукция клетками IgM и IgA ($85 \pm 18,9$ и $52 \pm 14,7$, 96 ± 21 и 57 ± 9 соответственно). В культурах МЛ-стимулированных тонзиллярных лимфоцитов на 3-й день наблюдался более интенсивный синтез IgG и IgM ($P_t = 0,03$ и $P_u = 0,02$), чем продукция указанных классов иммуноглобулинов нестимулиро-

Нестимулированные тонзиллярные лимфоциты



МЛ-стимулированные тонзиллярные лимфоциты

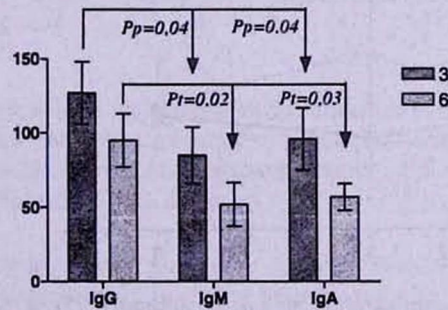


Рис.1. Продукция IgG, IgM и IgA нестимулированными и МЛ-стимулированными тонзиллярными лимфоцитами на 3-й и 6-й дни культивирования; по оси ординат – число АОК в пересчете на 1×10^6 тонзиллярных лимфоцитов.

$P_t \leq 0,05$ между средними $\pm$ SEM значениями продукции IgG нестимулированными тонзиллярными лимфоцитами на 3-й и 6-й дни культивирования

ванными клетками. Усиленная продукция IgG и IgM МЛ-стимулированными тонзиллярными лимфоцитами на 3-й день культивирования может зависеть как от поликлональной активации В-клеток, так и от усиленной пролиферации *in situ* активированных тонзиллярных лимфоцитов. Так как продукция иммуноглобулинов на 6-й день культивирования не выявила статистически достоверных различий между нестимулированными и МЛ-стимулированными лимфоцитами (рис.1), мы исследовали выживаемость тонзиллярных лимфоцитов в 3- и 6-дневных культурах. Как следует из данных, представленных на рис.2, выживаемость лимфоцитов, стимулированных В-клеточным поликлональным активатором – МЛ, на 3-й день культивирования достоверно выше выживаемости нестимулированных лимфоцитов ($P=0,03$). Следовательно, повышенная продукция иммуноглобулинов МЛ-стимулированными тонзиллярными лимфоцитами обусловлена усиленной пролиферацией *in situ* активированных лимфоцитов. На 6-й день культивирования наблюдается гибель незначительного числа клеток как в нестимулированных, так и МЛ-стимулированных культурах (рис.2). Вероятно, МЛ-активированные, как и неактивированные тонзиллярные лимфоциты, при длительной инкубации оказались более чувствительными к активационно-зависимому апоптозу и способны продуцировать сопоставимые количества IgG, IgM и IgA.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов, можно сделать вывод о том, что при хроническом декомпенсированном тонзиллите тонзиллярные лимфоциты в культуре способны как к спонтанному (неиндуцированному), так и митоген-стимулированному синтезу IgG, IgM и IgA.

Для индукции антигенспецифического гуморального иммунного ответа тонзиллярных лимфоцитов в культуре были использованы 4 различных бактериальных (корпускулярных) антигена: *S.aureus*, *K. pneu-*

moniae, *Y.enterocolitica* и *S.flexneri*. Следует отметить, что если для индукции гуморального иммунного ответа лимфоцитов человека в культуре к растворимым антигенам необходимо удаление клеток, супрессирующих антигенспецифическую активацию В-клеток и наличие в среде культивирования факторов роста и дифференцировки, то при использовании корпускулярных антигенов достаточно соблюдать лишь последнее условие [1]. С этой целью при индукции антигенспецифического гуморального иммунного ответа в среду была добавлена кондиционированная среда МЛ-стимулированных лимфоцитов.

Результаты экспериментов по индукции гуморального иммунного ответа к *S.aureus* показали (рис.3), что тонзиллярные лимфоциты способны к образованию *S.aureus*-специфических антител *in vitro* (число АОК на 3-й день было 60 ± 12 , на 6-й – 85 ± 19). Учитывая данные литературы, можно предположить, что эти антитела принадлежат к классу IgG [2–4]. Разработанная модель индукции антиген-специфического гуморального иммунного ответа тонзиллярных лимфоцитов в культуре оказалась приемлемой и при использовании в качестве антигена *K.pneumoniae* (количество АОК к *K.pneumoniae* – 76 ± 18 на 3-й день и 97 ± 13 – на 6-й). Было обнаружено небольшое число АОК, синтезирующих антитела к *Y.enterocolitica* – 24 ± 4 , на 3-й день культивирования (рис.3). По всей вероятности, иммунный ответ на *Y.enterocolitica* является первичным и, следовательно, характеризуется синтезом IgM. На 6-й день культивирования число АОК возросло в 3,2 раза (84 ± 10). Количество АОК к *S.flexneri* так же, как и при *Y.enterocolitica* - индуцированном иммунном ответе, было незначительно на 3-й день и возросло в 2 раза на 6-й день культивирования лимфоцитов ($35 \pm 1,7$ и 73 ± 2 соответственно).

Таким образом, тонзиллярные лимфоциты, иммунизированные в культуре *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *Y.enterocolitica* и *S.flexneri*, способны к индукции ан-

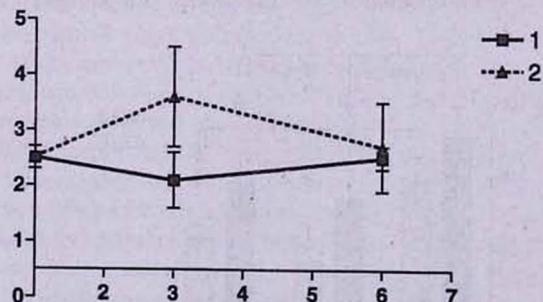


Рис. 2. Выживаемость нестимулированных (1) и МЛ-стимулированных (2) тонзиллярных лимфоцитов на 3-й и 6-й дни культивирования; по оси ординат – число тонзиллярных лимфоцитов $\times 10^6$ в 1 мл среды культивирования; по оси абсцисс – дни культивирования клеток

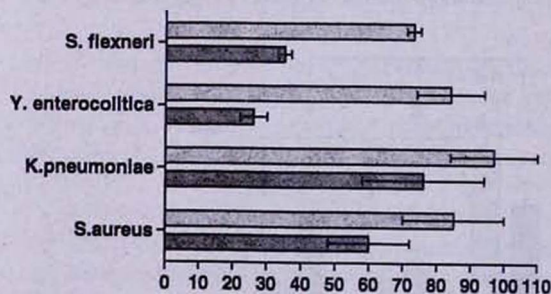


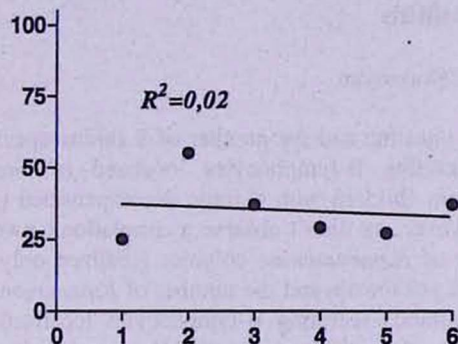
Рис.3. Индукция антигенспецифического гуморального иммунного ответа тонзиллярных лимфоцитов на 3-й и 6-й дни культивирования; по оси абсцисс – число АОК в пересчете на 1×10^6 тонзиллярных лимфоцитов

тиген-специфического гуморального иммунного ответа при хроническом декомпенсированном тонзиллите. При культивировании кусочков миндалин детей, иммунизированных против дифтерии, коклюша и столбняка, в присутствии дифтерийного анатоксина в культуральной среде были обнаружены специфические антитела [13]. В культуральной жидкости тонзиллярных лимфоцитов, культивированных с вирусом полиомиелита, выявлены антигенспецифические антитела [8]. При изучении синтеза IgM, IgG и IgA тонзиллярными лимфоцитами *in vitro* установлена корреляция между продукцией антител в культуре и степенью бласттрансформации лимфоцитов [3]. Установлено, что через 72 ч общее количество синтезируемых антител в культуре тонзиллярных лимфоцитов увеличивалось в 3–4 раза, а IgA – в 7–12 раз. В зависимости от природы антигена выявлен преимущественный синтез определенного класса иммуноглобулинов. Например, при *in vitro* стимуляции тонзиллярных лимфоцитов антигенами стрептококка и стафилококка выявлен преимущественный синтез IgG [1–4]. Однако в литературе отсутствуют данные о корреляции между способностью тонзиллярных лимфоцитов синтезировать антиген-специфические антитела и степенью обсемененности миндалин или кишечника патогенными

бактериями при хроническом декомпенсированном тонзиллите.

С целью выявления корреляционной связи между наличием патогенной или условно-патогенной микрофлоры и антиген-специфического гуморального иммунного ответа у детей с декомпенсированным тонзиллитом мы исследовали группу детей с положительным ростом *S.aureus* в кишечнике, ротоглотке и миндалинах ($n=6$), а также группу детей с положительным ростом *K.pneumoniae* в кишечнике, но не в ротоглотке или миндалинах ($n=6$). Как показали результаты исследований (кривые линейной регрессии представлены на рис.4), у детей с положительным ростом *S.aureus* в кишечнике, ротоглотке и миндалинах выявляется положительная достоверная корреляция ($p=0,002$; $r=0,96$ и $R^2=0,92$) между количеством АОК, синтезирующих антиген-специфические антитела к *S.aureus*, и количеством колоний *S.aureus* в кишечнике и миндалинах. Однако в группе детей с положительным ростом *K.pneumoniae* в кишечнике, но не в ротоглотке или миндалинах, мы не выявили достоверной корреляции ($p=0,7$ и $r=0,16$) между количеством АОК, синтезирующих антиген-специфические антитела к *K.pneumoniae*, и количеством колоний *K.pneumoniae* в кишечнике (рис.4).

Группа детей с положительным ростом *K.pneumoniae* в кишечнике



Группа детей с положительным ростом *S.aureus* в кишечнике и миндалинах

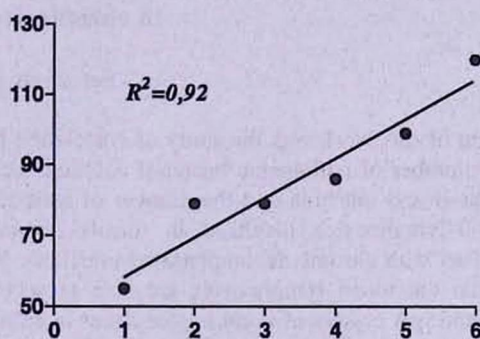


Рис. 4. Корреляционный анализ между степенью обсемененности патогенными бактериями кишечника и миндалин и индукцией антигенспецифического гуморального иммунного ответа культивированных тонзиллярных лимфоцитов. Представлены регрессионные кривые зависимости числа специфических АОК в пересчете на 1×10^6 лимфоцитов (ось ординат) от $\log_{10}$ числа колоний бактерий (ось абсцисс)

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований, можно сделать заключение о том, что способность тонзиллярных лимфоцитов, выделенных у детей с хроническим декомпенсированным тонзиллитом, продуцировать антиген-

специфические антитела, зависит как от активации примированных В-клеток памяти, так и от *in situ* активации недифференцированных В-клеток антигенами бактерий, локализованных в ротоглотке и миндалинах.

Поступила 25.01.06

Պաթոգեն բակտերիաների անտիգենների հանդեպ սպեցիֆիկ հումորալ իմուն պատասխանի հարուցումը խրոնիկական դեկոմպենսացված տոնզիլիտի ժամանակ

Ա.Յ. Սերոբյան, Տ.Կ. Դավթյան, Ա.Կ. Շուկուրյան

Խրոնիկական դեկոմպենսացված տոնզիլիտով երեխաների մոտ պաթոգեն կամ պայմանական պաթոգեն միկրոֆլորայի և անտիգեն-սպեցիֆիկ հումորալ իմուն պատասխանի ինտրակցիայի միջև համահարաբերակցական կապի հայտնաբերման նպատակով ուսումնասիրվել են անջատված տոնզիլյար լիմֆոցիտների հատկությունը կուլտուրայում վերարտադրել IgG, IgM, IgA, ինչպես նաև սպեցիֆիկ իմունագլոբուլիններ՝ անտիգենային կամ միտոգենային խթանման պայմաններում: Կատարված հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ խրոնիկական դեկոմպենսացված տոնզիլիտի ժամանակ տոնզիլյար լիմֆոցիտները կուլտուրայում ընդունակ են սինթեզելու IgG, IgM և IgA, ինչպես սպոնտան, այնպես էլ միտոգենի առկայությամբ: Հայտնաբերվել է նաև, որ խրոնիկական դեկոմպենսացված տոնզիլիտի ժամանակ տոնզիլյար լիմֆոցիտները կուլտուրայում ընդունակ են սինթեզելու անտիգեն-սպեցիֆիկ իմունագլոբուլիններ *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *Y. enterocolitica* և *S.flexneri* անտիգենային խթանման պայմաններում: Ընկալման *S.aureus* բակտերիաների առկայությամբ,

երեխաների նշագեղձերում և աղիներում նկատվում է դրական ուղղակի կապ *S.aureus* բակտերիաների գաղութների թվի և անտիգեն-սպեցիֆիկ իմունագլոբուլինների արտադրող B-բջջերի քանակության միջև ($p=0.002$, $r=0.96$ և $R^2=0.92$): Սակայն այն երեխաների մոտ, որոնք ունեցել են *K. pneumoniae* բակտերիաների աճ միայն աղիներում, բայց ոչ ընկալման և նշագեղձերում, մենք չենք հայտնաբերել ուղղակի համահարաբերակցական կապ բակտերիաների գաղութների թվի և անտիգեն-սպեցիֆիկ իմունագլոբուլինների արտադրող B-բջջերի քանակության միջև ($p=0.7$, $r=0.16$):

Կատարված հետազոտությունների արդյունքներից ելնելով՝ կարելի է եզրակացնել, որ խրոնիկական դեկոմպենսացված տոնզիլիտով երեխաների մոտ տոնզիլյար լիմֆոցիտները ընդունակ են անտիգեն-սպեցիֆիկ հակամարմինների վերարտադրմանը, բերան-ընկալման և քնային նշիկների վրա լոկալիզացված բակտերիալ անտիգենների ներկայությամբ՝ ինչպես հիշողությամբ, այնպես էլ չդիֆերենցված B-բջջերի *in situ* ակտիվացման շնորհիվ:

Antigen-specific humoral immune response induction against pathogenic bacteria antigens in chronic decompensated tonsillitis

A.C. Serobyanyan, T.K. Davtyan, A.K. Shukuryan

The aim of this work was the study of correlation between the number of pathogenic bacterial colonies localized in tonsils and intestine and the number of antibody-secreting B-lymphocytes localized in tonsils obtained from children with chronic decompensated tonsillitis. We showed that the tonsil lymphocytes are able to secrete IgG, IgM and IgA classes of immunoglobulines in culture spontaneously or in the presence of mitogens. Tonsil lymphocytes produce antigen-specific antibody-secreting B-lymphocytes during in vitro stimulation of cells with formalin-fixed *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *Y. enterocolitica* and *S.flexneri* bacteria. We observed direct correlation between the number of *S.aureus* colonies localized in

tonsils and intestine and the number of *S.aureus*-specific antibody-secreting B-lymphocytes localized in tonsils obtained from children with chronic decompensated tonsillitis. However, we didn't observe a correlation between the number of *K.pneumoniae* colonies localized only in intestine but not tonsils and the number of *K.pneumoniae*-specific antibody-secreting B-lymphocytes localized in tonsils. These observations suggested that in chronic decompensated tonsillitis pathogenic bacteria are differentially stimulated either by memory or naïve B-lymphocytes, depending on the localization of pathogenic bacteria in tonsils or intestine.

Литература

1. Алексанян Ю.Т., Давтян Т.К. Иммуный ответ культивируемых лимфоцитов и получение гибридом про-

дуцирующих человеческие моноклональные антитела. Ереван, 1995.

2. Визиренко Л.В., Горшевицкая Э.В. ЖУНГБ, 1972, 2, с.52.
3. Вершигора А.Е. Журн. микробиологии, 1973, 1, с. 31.
4. Вершигора А.Е. Иммунобиология небных миндалин. Киев., 1978, 147 с.
5. Давтян Т.К., Алексанян Ю.Т., Гринчук Т.М., Сорокина Е.А. Иммунология, 1994,5, с.33-37
6. Мальберг К. Иммунологические методы. М., 1987, с. 211.
7. Сербян А.Ц., Геворкян Н.В., Давтян Т.К., Шукурян А.К. Вопросы теоретической и клинической медицины, 2005, 8(37), с.2.
8. Bradley L.O.M., Duncan D.D., Yashimoto K., Swain S.L. J.Immunol., 1993,150, p.3119.
9. Holder M.J., Abbot S.D., Milner A.E. Int. Immunol., 1993, 5, p. 1059.
10. Ikeda M. J. Otolaryngol., 1975, 78, p.623.
11. Ishikawa T., Nicher K., Arbesmann C.E. Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol., 1972, 43, p.801.
12. Muraguchi A., Butler J.L., Kehrl Y.H., Fuachi L. J.Exp.Med., 1983, 157, p.530.
13. Platts M.F., Ishizaka K J. Immunol., 1975,114, p.1058.
14. Secrist H.,Egan M., Peters M.G. J.Immunol.,1994, 152, p.1120.
15. Sloyer J.L. J.Immunol., 1973, 111, p.183.
16. Tabata T., Enomoto T., Kitashoji N. Wakayama Md. Rep., 1974,17,p 29.