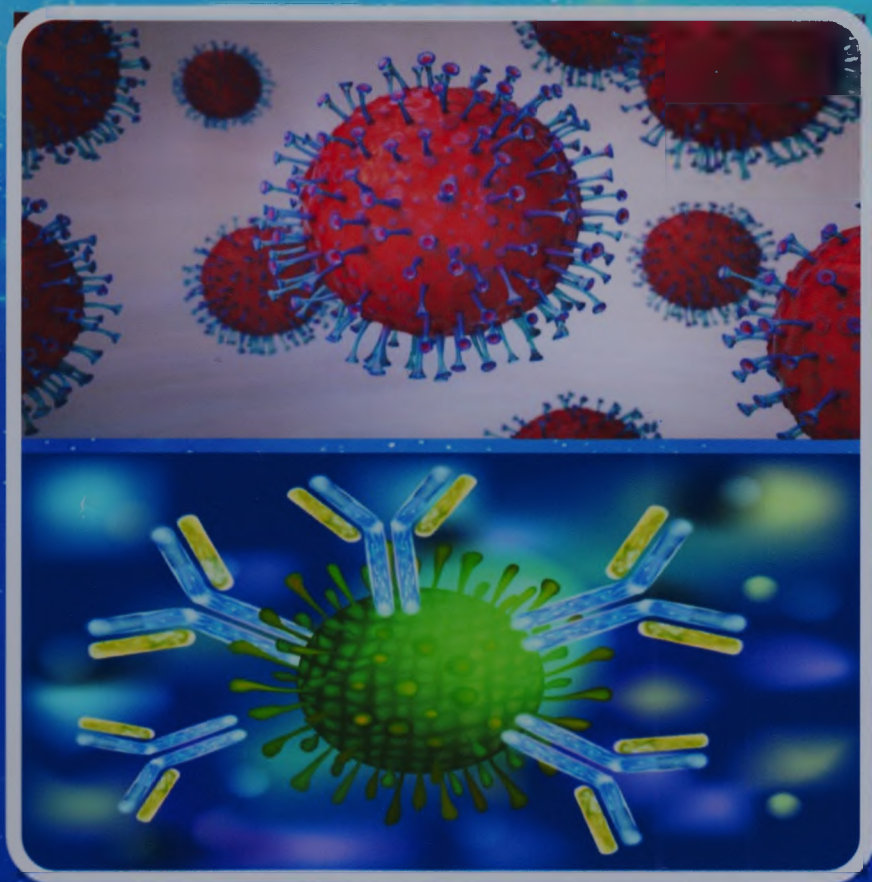


612.017
0 453

**Э.Э.Кобиров, А.Р.Акромов, М.К.Тухтаев,
Д.М.Абдуллаев, Н.М.Тухтаева**

**ОСНОВЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОЛОГИИ
И ИНДУКЦИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ
В - ЛИМФОЦИТОВ
(Экспериментальные основы)**



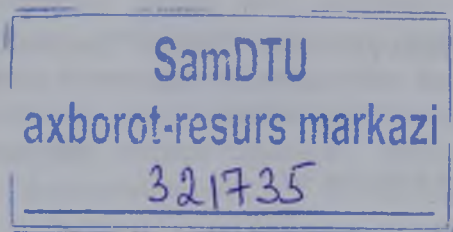
**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ,
НАУКИ И ИННОВАЦИЙ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНА ШАРОФА РАШИДОВА**

**Э.Э. КОБИЛОВ, А.Р. АКРАМОВ, М.К. ТУХТАЕВ, Д.М.
АБДУЛЛАЕВ, Н.М.ТУХТАЕВА**

**ОСНОВЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОЛОГИИ
И ИНДУКЦИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ
В - ЛИМФОЦИТОВ
(Экспериментальные основы)**

Монография



Самарканд – 2025

УДК: 612.0 (075)

КБК: 53/57

Кобилов Э.Э., Акрамов А.Р., Тухтаев М.К., Абдуллаев Д.М., Тухтаева Н.М. Основы фундаментальной иммунологии и индукция иммунорегуляторных В - лимфоцитов (Экспериментальные основы). Монография. – Самарканд: Издательство СамГУ, 2025. - 120 стр.

В последние годы получены многочисленные доказательства способности В-лимфоцитов, регулировать различные типы иммунного ответа. Среди них обнаружены В1, В2, антиген, представляющие клетки, синтезирующие интерлейкин. Значение этих данных в настоящее время выходит за чисто теоретические рамки, поскольку дисбалансы иммунорегуляторных В-клеток, в частности, В1, В2 лимфоцитов наблюдаются при ряде иммунопатологических процессов, таких как аутоиммунные заболевания, опухолевый рост, циррозы печени и других заболеваниях, также при старении. Экспериментальная научная работа выполнена на мышах, введением липополисахаридов. Теоретическое значение полученных результатов заключается в том, что показана способность липополисахаридами, индуцировать формирование иммунорегуляторных В-клеток. Монография предназначена для студентов высших учебных заведений и научных работников.

Рецензенты: **Г.А. Душанова** - доцент, к.б.н. кафедры генетика и биотехнологии Самаркандского государственного университета, им. Шарофа Рашидова.

Ш.М. Уралов - доцент кандидат медицинских наук кафедры пропедевтики детских болезней Самаркандского медицинского университета.

Монография утверждена Советом Самаркандского государственного университета 30.01.2025 года Разрешено к публикации на основании постановления (№7 протокол).

ISBN 978-9910-9792-3-1

Введение

На современном этапе иммунология прочно вошла в каждую практическую специальность, и требует достаточно большого объема новых знаний, которые необходимы для понимания механизмов регуляции иммунного ответа в норме и при патологии.

Иммунитет особое биологическое свойство многоклеточных организмов, направленное на защиту от генетически чужеродных факторов: микроорганизмов (бактерий, вирусов, простейших, грибов), инородных молекул и др. Иммунитет также обеспечивает невосприимчивость организма к инфекции при повторной встрече с патогеном.

Совокупность органных, тканевых, клеточных и молекулярных компонентов, функцией которых является осуществление иммунной защиты, называется иммунной системой. Иммунология - наука о строении и функциях иммунной системы, как в норме, так и при различных патологических состояниях, в том числе и при нарушениях самой иммунной системы - иммунопатологиях.

Иммунную защиту обеспечивают два механизма: врожденный и адаптивный.

Врождённый иммунитет является присущей каждому организму с рождения, генетически закреплённой способностью противостоять инфекции. Это передовая линия обороны организма против патогенов, пытающихся проникнуть или уже проникших в покровные ткани или внутреннюю среду. Врождённый иммунитет срабатывает мгновенно или в течение первых нескольких часов после контакта с патогеном (возбудители, выделяемые ими токсины и другие чужеродные молекулы). Он включает четыре основных уровня защиты: анатомический, физиологический, фагоцитарный и воспалительный — покровные ткани, фагоциты, микробоцидные гуморальные вещества (протеазы, сильные окислители и свободные радикалы, продуцируемые фагоцитами, эндогенные

противомикробные пептиды и др.), сосудистые реакции. Первичные рецепторы врождённого иммунитета — это молекулы многоклеточных, позволяющие «считывать» эволюционную память информацию о том, чем отличаются микроорганизмы от собственных клеток.

Адаптивный (приобретённый) иммунитет формируется в течение жизни индивидуума. Активно приобретённый иммунитет - состояние невосприимчивости к инфекции после перенесённого инфекционного заболевания или после вакцинации (сам организм вырабатывает соответствующие антитела). Пассивно приобретённый иммунитет - состояние невосприимчивости к инфекции в результате поступления в организм уже готовых антител от матери или в результате инъекции (сам организм эти антитела не вырабатывает).

В настоящее время получены многочисленные доказательства способности В-лимфоцитов регулировать различные типы иммунного ответа. В связи с этим возникает проблема моделирования состояний, в которых регуляторами иммунного ответа являются субклассы В-клеток. Одним из экспериментальных подходов может служить индукция различными агентами, из которых уже апробированы различные антигены, иммунные комплексы лектины и поликлональные активаторы иммунной системы. К последним, как известно, относятся липополисахариды (ЛПС), выделенные из грамотрицательных микроорганизмов, причем попытки индуцировать с их помощью иммунорегуляторные В-клетки оказались успешными. Способность ЛПС индуцировать иммуностимулирующие В-клетки до сих пор не была установлена. Вместе с тем, клетки подобного рода могут участвовать в развитии таких патологических состояний, как аутоиммунные процессы. Это предположение следует из недавно полученных данных о дисбактериозе кишечника у аутоиммунных мышей, в которых, как известно, сопровождается постоянно высоким уровнем эндотоксинов (и среди низ ЛПС) в крови, и как следствие,

поликлональной активацией В-клеток с вероятной индукцией иммунорегуляторных В-клеток.

Таким образом, возможность индукции иммунорегуляторных В-клеток с помощью ЛПС можно рассматривать как необходимое звено в решении важной практической задачи, касающейся исследования роли таких клеток в патогенезе некоторых патологических состояний.

ГЛАВА I. ОСНОВЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОЛОГИИ

1.1. Неспецифические факторы защиты организма

Сохранение целостности организма, его выживаемость обеспечиваются совокупностью неспецифических и специфических факторов защиты.

Неспецифические (естественные) факторы защиты обусловлены врожденными биологическими особенностями организма. Они устойчивы, передаются по наследству и не являются результатом развития специфического иммунного ответа. Защита от чужеродных, проникающих в организм молекул при этом зависит от непроницаемости нормальных кожных покровов, бактерицидности секретов, кислотности желудочного сока, температуры тела, присутствия в крови, слюне и других биологических жидкостях таких ферментов, как пропердин, лизоцим, от активности фагоцитирующих клеток и других биологических свойств организма. Роль естественных неспецифических факторов защиты возрастает и становится ведущей при дефектах иммунной системы.

Естественные факторы характеризуются неспецифичностью по отношению к антигену, не сохраняют память от первичного контакта с ним. Их условно можно разделить на гуморальные, клеточные, физические и физиологические (табл. 1).

Антимикробным действием обладают метаболиты жизнедеятельности микроорганизмов, заселяющих кишечник. Нормальная микрофлора кишечника человека помимо прямого антагонистического воздействия на патогенные микроорганизмы обладает стимулирующим влиянием на иммунную систему.

Таблица 1. Неспецифические (естественные) факторы защиты

Факторы	Продукты
Гуморальный	Белки острой фазы (фибриноген, альфа-антитрипсин, фибронектин Р ₂ микроглобулин, СРВ, гаптоглобин и др.). Медиаторы воспаления. Система комплемента. Ферментные системы клеток. Пропердин. Лизоцим. Воспалительные пептиды (фактор, активирующий тромбоциты). Продукты расщепления арахидоновой кислоты (эйкозаноиды: лейкотриены, тромбоксан, простагландины). Система кининов (брадикинин, калликреин). Интерфероны. Факторы свертывающей системы крови (фибриноген, процессы фибринолиза). Медиаторы аллергического воспаления (гистамин, серотонин, гепарин). Бактерицидная активность крови, вирусные ингибиторы - интерферон и другие.
Клеточный	Нейтрофилы. Макрофаги. Моноциты. Естественные (натуральные) киллеры – NK клетки.
Физический, физиологический	Механический барьер: кожные покровы, слизистые дыхательных путей и ЖКТ. Физиологический барьер: температура тела, pH, бактерицидность крови, секретов слезных, слюнных желез и др.

Следует признать, что механизмы защиты общего физиологического характера до конца не изучены, хотя и установлено, что они регулируются нейроэндокринными системами организма.

Схематично первую фазу неспецифической защитной реакции организма можно представить следующей условной последовательностью событий:

- проникновение микроорганизмов;
- усиление кровотока;

- изменение в свертывающей системе крови;
- увеличение проницаемости капилляров;
- активный синтез белков острой фазы.

Выход из кровяного русла фагоцитирующих клеток (прикрепление к эпителию сосудов, проникновение через эпителий сосуда), скопление их в области повреждения, нахождения повреждающего антигена и воспаление:

- синтез медиаторов воспаления;
- опсонизация антигена, непосредственный лизис, или эндоцитоз антигена;
- переработка антигена (так называемый процессинг);
- элиминация антигена.

Воспаление как первая и основная защитная реакция направлено не только на ликвидацию очага повреждения, но и на восстановление нарушенных функций. В воспалении участвуют клетки иммунной и других систем организма (макрофаги тканей, моноциты и нейтрофилы крови, ретикуло-эндотелиальная система) и гуморальные факторы, активно синтезируемые этими клетками.

Известна также защитная роль эозинофилов при паразитарных инфекциях и аллергических реакциях. Эозинофилы особенно богаты катионными белками, обеспечивающими их цитотоксичность. Наибольшее внимание в настоящее время привлекает группа белков воспаления, синтезируемых клетками иммунной системы и активно участвующих в защитных реакциях организма. Это так называемые медиаторы (*лат. mediator* - посредник), или цитокины (*греч. cytos* - клетка, *kinos* - выделять).

В настоящее время известно более 30 цитокинов, но максимальными противовоспалительными свойствами обладают только три из них: ИЛ-1 (альфа - и 3- формы), ФНО-альфа, ИЛ-6 (табл.2).

Таблица 2. Основные противовоспалительные цитокины
[31]

Название	Клетки-продуценты	Участие в воспалительной реакции
ИЛ-1	М, Эн, Эп, СК, ДК, Т, В.	Усиление про коагулянтной активности, расширение сосудов, усиление экспрессии молекул адгезии, активация хемоаттрактантов, усиление образования супероксид - радикалов и оксида азота, монокинов и простагландинов E2, активация Т- и В-клеток, резорбция кости и хряща. Стимуляция миелопоэза (нейтрофильный лейкоцитоз), повышение температуры тела, усиление синтеза белков острой фазы.
ФНО - альфа	М, Эп, Тх, СК	Расширение сосудов, усиление экспрессии молекул адгезии, стимуляция ангиогенеза, усиление катаболизма липидов, активация хемоаттрактантов, усиление выработки монокинов и простагландинов E2, образования супероксид-радикалов и оксида азота, гибель клеток (апоптоз), активация Т-клеток, регуляция миелопоэза. Вызывает септический шок.
ИЛ-6	Ф, Эн, М, Тх, СК, ТК	Усиление синтеза белков острой фазы, активация Т- и В-клеток. Активация хемоаттрактантов, усиление выработки супероксид-радикалов, активация экспрессии молекул адгезии, противовоспалительное действие через подавление выработки провоспалительных монокинов и простагландинов E2.

Примечание: М - моноциты и макрофаги, Т - лимфоциты, Тх - Т-хелперы, В-клетки В-лимфоциты, Эн - эндотелиальные клетки, Эп - эпителиальные клетки, Ф - фибробласты, ТК - тучные клетки, СК - синовиальные клетки, ДК - дендритные клетки.

Большинство медиаторов секретируется макрофагами, которым принадлежит основное решение, каким путем закончится встреча организма с антигеном: здоровьем или болезнью.

Система комплемента. Одно из ведущих мест в реакциях неспецифической защиты принадлежит системе комплемента, связывающей, разрушающей чужеродные агенты или измененные клетки хозяина. Эта система включает более 25 плазмменных и мембранных белков (протеолитических, литических, регулирующих). Обладает высокой цитолитической активностью, опосредованно взаимодействует со многими типами клеток, что ведет к секреции растворимых медиаторов, стимуляции фагоцитоза, иммуномодуляции.

Основными иммунобиологическими функциями системы комплемента являются:

- лизис (цитоллиз - гибель) клеток-мишеней (бактерий, микробов, грибов, соматических и других клеток), хемотаксические действия для клеток фагоцитарной системы (обеспечение быстрого продвижения фагоцитов к микробной клетке);
- некоторые свойства прилипания, усиливающей фагоцитоз;
- стимулирование активности фагоцитов, гранулоцитов, дегрануляция клеток, высвобождение лизосомных ферментов.

Белки системы комплемента принимают участие в регуляции воспалительных процессов, в регуляции гуморального ответа.

Система не автономна, кооперативно взаимодействует с другими гуморальными и клеточными защитными механизмами. Иными словами: система комплемента - сложный комплекс протеолитических ферментов, регуляторных белков, способных вызывать:

- 1) образование медиаторов воспаления;
- 2) лизис клеток.

В норме система комплемента находится в неактивной форме. Активация происходит при появлении в организме генетически чужеродных клеток. Различают два пути активации системы комплемента:

1. Классический;
2. Альтернативный.

Быстрый, эффективный **классический путь** активации требует организации комплекса антиген - антитело (АГ-АТ). Медленный, малоэффективный альтернативный путь может быть запущен некоторыми полисахаридами, липополисахаридами (ЛПС) бактерий без участия антител.

Таким образом, основные факторы, активирующие систему комплемента классическим путем - комплекс антиген-антитело, некоторые вирусы, агрегированные миеломные белки; **альтернативным путем** - полисахариды, липополисахариды, иммуноглобулины классов А и Е.

Ключевыми компонентами реакции - С1-протеазная активность, С3-конвертаза, С3в-мембранно связанный белок. Конечным событием в процессе служит образование мембрано атакующего комплекса (МАК), представляющего собой трансмембранный канал, проницаемый для воды, в результате чего клетка набухает (присутствие натрия) и лизируется. Система комплемента облегчает фагоцитоз (С3в-рецептор фагоцитов), способствует выбросу медиаторов воспаления из тучных клеток и базофилов (С3а и С5а).

Фагоцитоз. Следующим мощным неспецифическим фактором защиты организма является фагоцитоз - комплекс взаимоотношений фагоцитирующей клетки с антигеном или измененной клеткой хозяина, в результате которых осуществляется их адгезия (*лат. adhesio* - прикрепление) на поверхности фагоцита, поглощение, переработка чужеродной клетки.

К фагоцитирующим клеткам относятся: гранулоциты, или полиморфно ядерные лейкоциты (ПМЯЛ); моноциты крови, макрофаги ткани, система мононуклеарных фагоцитов (ретiculoлярная и эндотелиальная ткань).

В печени фагоцитарные функции выполняют клетки Купфера, в легких - альвеолярные макрофаги, в мозге - микроглия;

эндотелиальные клетки кровеносных сосудов лишь в определенных условиях обладают фагоцитарными способностями.

Полиморфно ядерные лейкоциты (ПМЯЛ) - главная фагоцитирующая, короткоживущая клетка крови, часто погибающая в процессе фагоцитоза.

Моноцит - образуется в костном мозге, созревает в тканях до макрофага.

Макрофаг - долгоживущая клетка, способна многократно вступать в процесс фагоцитоза; клетки находятся в свободном состоянии в тканях или прикреплены к стенкам кровеносных сосудов; обладают способностью распознавать чужеродный агент и связанные с ним антитела и или комплемент. Макрофаги секретируют более 40 биологически активных веществ. У макрофага в меньшей степени, чем у ПМЯЛ, выражена активность (качественно и количественно) ферментативных элементов. Благодаря выраженным функциональным свойствам, позволяющим активно участвовать в формировании специфических иммунологических реакций (фагоцитоз, представление антигена другим клеткам иммунной системы, медиаторная активность), макрофаги относятся, как Т- и В-лимфоциты, к иммунокомпетентным клеткам.

Фагоцитоз может завершиться полным гидролизом антигена и выбросом метаболитов из клетки, либо гидролиз становится незавершенным (например, в результате недостаточного количества или качества ферментов или поступления в организм избыточного количества чужеродных клеток). В данной ситуации не полностью разрушенный антиген представляется на клеточной мембране макрофага в форме, способствующей формированию полноценных специфических иммунологических реакций.

Схематически процесс фагоцитоза можно представить в следующей последовательности событий:

1) хемотаксис (*лат.* хемо - химический, таксис - движение) - движение клеток ПМЯЛ или других фагоцитов в направлении антигена под действием медиаторов;

2) пиноцитоз - поглощение клеткой растворимых веществ (диаметр не более 1 мкм), или узнавание антигена макрофагом либо другой клеткой через фагоцитирующей специфические или неспецифические рецепторы;

3) адгезия (прилипание) антигена на поверхности фагоцитирующей клетки, образование псевдоподий фагоцита;

4) захват антигена, образование фагосомы - вакуоли;

5) активация метаболизма глюкозы в фагоците, образование фаголизосомы - вакуоли при слиянии фагосомы и лизосомы, содержащей блок гидролитических ферментов;

6) образование свободных радикалов с резким возрастанием потребления кислорода («дыхательный взрыв» или кислород зависимый гидролиз);

7) активация кислородонезависимых механизмов бактерицидности клеток;

8) повреждение мембраны фагоцитируемых антигенов;

9) полный гидролиз антигена, выброс из клетки метаболитов или неполный гидролиз антигена с представлением его фрагментов на мембране фагоцитов (макрофага).

Фагоцитоз может оказаться дефектным на разных этапах процесса: в результате угнетения большим количеством антигенного материала, при генетических нарушениях в системе ферментов, молекул адгезии и др. Вследствие этого возможно развитие хронической инфекции, хронического воспаления. Оценка фагоцитоза имеет большое практическое значение в диагностике патологии человека, особенно при хронических формах заболевания.

Критерии полноценности фагоцитоза определяются не только количественным соотношением фагоцитирующих клеток, но и активностью лизоцима, миелопероксидазы, кислой фосфатазы, бета - глюкоуридазы, катепсинов и других секретов макрофага - фагоцита.

Естественные (натуральные) киллеры (NK). Эти клетки реализуют защитные факторы через прямой цитотоксический

эффект на опухолевые и инфицированные вирусом клетки. Эта группа клеток (лимфоциты, моноциты) не имеет четко выраженных маркеров. *NK* участвуют в противовирусном и противоопухолевом иммунитете. Отнесение этих клеток к естественным факторам защиты не однозначно, поскольку, с одной стороны, естественные киллеры представляют собой лимфоциты, синтезирующие ряд медиаторов и выполняющие ряд специфических регуляторных эффектов в формировании иммунного ответа. С другой стороны, естественные киллеры в отличие от специфических лимфоцитов не имеют антиген распознающих рецепторов, и активация их происходит под действием ряда цитокинов. Естественные киллеры - довольно гетерогенная группа лимфоцитов: незрелые лимфоциты, недифференцированные лимфоциты, составляющие до 5 % лейкоцитов периферической крови. Морфологически - это большие гранулярные лимфоциты, плотность ядра которых ниже, чем у лимфоцитов. Максимальное количество *NK* находится в селезенке, лимфоузлах, лимфоидной системе кишечника.

Цитотоксический эффект *NK* реализуется через адгезию, распознавание клеток - мишеней. Последнее делает их похожими на фагоцитирующие клетки, но с внеклеточным лизисом антигенов. Особенностью естественных киллеров является их полиспецифичность и отсутствие формирования памяти на антиген. Основная роль *NK* - лизис клеток-мишеней (опухолевых или измененных вирусом клеток хозяина). *NK* играют важную роль в отторжении трансплантатов.

Фагоцитарные киллерные функции присущи и другим клеткам крови: эозинофилам, базофилам. При этом взаимодействие с антигеном или измененной собственной клеткой хозяина происходит как в крови, так и в тканях.

Последовательность событий при функционировании *NK* :

1) распознавание объекта через неспецифические рецепторы (к углеводным остаткам); рецепторы к интерферону, к трансферрину и др.;

2) контакт с клеткой-мишенью, организация комплекса «*NK* +

мишень» с участием молекул адгезии, магния (Mg);

3) активация *NK* (секреция интерферонов, интерлейкинов, хемотаксических факторов) с активацией цитоплазмических гранул, высвобождением биологически активных веществ - перфоринов;

4) процесс лизиса клетки-мишени (внедрение перфоринов в мембрану клетки, его полимеризация, формирование перфориновых пор в мембране клетки-мишени, проникновение в нее сериновых протеаз);

5) лизис (цитоллиз) клетки.

Функция *NK* угнетается ингибиторами протеаз, кортикостероидами, адреналином, эстрадиолом, прогестероном, циркулирующими иммунными комплексами (ЦИК), активированными макрофагами и гранулоцитами. Лейкотриен и тромбоцитарные факторы усиливают действие *NK*. ИЛ-2, усиливают созревание и пролиферацию *NK*. При дефиците *NK* возможны тяжелые формы вирусных инфекций и развитие опухолей.

Таким образом, до начала и проявления специфических иммунологических реакций в борьбу с антигенами включаются механизмы так называемой неспецифической защиты, без которых практически невозможно функционирование иммунной системы. Это гуморальные факторы: белки острой фазы, цитокины воспаления, система комплемента, клеточные факторы в виде естественных киллеров и фагоцитирующих клеток.

1.2. Органно - циркуляторный принцип организации иммунной системы. Компоненты иммунной системы

Иммунная система состоит из различных компонентов — органов, тканей и клеток, отнесённых к этой системе по функциональному критерию (выполнение иммунной защиты организма) и анатомофизиологическому принципу организации (органно-циркуляторный принцип). В иммунной системе выделяют: первичные органы (костный мозг и тимус), вторичные

органы (селезёнка, лимфатические узлы, пейеровы бляшки и др.), а также диффузно расположенную лимфоидную ткань - отдельные лимфоидные фолликулы и их скопления. Особо выделяют лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистыми оболочками (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue* - MALT).

Лимфоидная система - совокупность лимфоидных клеток и органов. Часто лимфоидную систему упоминают как анатомический эквивалент и синоним иммунной системы, однако это не вполне верно. Лимфоидная система является лишь частью иммунной системы: по лимфатическим сосудам клетки иммунной системы мигрируют к лимфоидным органам - месту индукции и формирования иммунного ответа. Кроме того, лимфоидную систему не следует путать с лимфатической - системой лимфатических сосудов, по которым происходит циркуляция лимфы в организме. Лимфоидная система тесно связана с кровеносной и эндокринной системами, а также с покровными тканями - слизистыми оболочками и кожей. Названные системы - основные партнеры, на которые в своей работе опирается иммунная система.

В организме взрослого здорового человека содержится около 10^{13} лимфоцитов, примерно каждая десятая клетка тела - лимфоцит. Анатомо-физиологически иммунная система организована по органно- циркуляторному принципу. Это означает, что лимфоциты не являются строго резидентными клетками, а интенсивно рециркулируют между лимфоидными органами и не лимфоидными тканями через лимфатические сосуды и кровь. Так, через каждый лимфатический узел за 1 час проходит $\approx 10^9$ лимфоцитов. Миграцию лимфоцитов обуславливают специфические взаимодействия конкретных молекул на мембранах лимфоцитов и клеток эндотелия стенки сосудов [такие молекулы называют адгезинами, селектинами, интегринами, хоминг - рецепторами (от англ. *home* — дом, место прописки лимфоцита)] В результате каждый орган обладает характерным набором популяций лимфоцитов и их клеток -

партнёров по иммунному ответу.

1.2.2. Состав иммунной системы.

По типу организации выделяют различные органы и ткани иммунной системы.

- **Кроветворный костный мозг** место локализации стволовых кроветворных клеток (СК4К).

- **Инкапсулированные органы:** тимус, селезёнка, лимфатические узлы.

- **Неинкапсулированная лимфоидная ткань**

- ✓ **Лимфоидная** ткань слизистых оболочек (MALT - *Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*). Независимо от локализации содержит внутри эпителиальные лимфоциты слизистой оболочки, а также специализированные образования:

- Лимфоидная ткань, ассоциированная с пищеварительным трактом (GALT — *Gut-Associated Lymphoid Tissue*). В ней выделяют миндалины, аппендикс, пейеровы бляшки, *lamina propria* («собственная пластинка») кишечника, отдельные лимфоидные фолликулы и их группы;

- Лимфоидная ткань, ассоциированная с бронхами и бронхиолами (BALT — *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*)*.

- Лимфоидная ткань, ассоциированная с женскими половыми путями (VALT — *Vulvovaginal-Associated Lymphoid Tissue*);

- Лимфоидная ткань, ассоциированная с носоглоткой (NALT — *Nose-Associated Lymphoid Tissue*).

- ✓ Особое место в иммунной системе занимает печень. В ней присутствуют субпопуляции лимфоцитов и других клеток иммунной системы, «обслуживающие» в качестве лимфоидного барьера кровь воротной вены, несущей все всасываемые в кишечнике вещества.

- ✓ Лимфоидная подсистема кожи — лимфоидная ткань, ассоциированная с кожей (SALT — *Skin-Associated Lymphoid Tissue*) — диссеминированные внутриэпителиальные лимфоциты

и региональные лимфатические узлы и сосуды лимфодренажа.

- **Периферическая** кровь транспортно-коммуникационный компонент иммунной системы

1.2.3. Центральные и периферические органы иммунной системы

Центральные органы. Кроветворный костный мозг и тимус - центральные органы иммунной системы, именно в них начинается миелопоэз, лимфопоэз, дифференцировка моноцитов и лимфоцитов от СКК до зрелой клетки.

- До рождения плода развитие В-лимфоцитов происходит в фетальной печени. После рождения эта функция передаётся костному мозгу.

- В костном мозге проходят полные «курсы» эритропоэза (образование эритроцитов), миелопоэза (образование нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, базофилов), мегакариопоэза (формирование тромбоцитов), а также проходит дифференцировка ДК, НК-клеток и В-лимфоцитов.

- Предшественники Т-лимфоцитов для прохождения лимфопоэза мигрируют из костного мозга в тимус и слизистую оболочку пищеварительного тракта (вне тимическое развитие).

В тимусе (*thymus*) проходит лимфопоэз значительной части Т-лимфоцитов («Т» происходит от слова «*Thymus*»). Тимус состоит из 2 долей, каждая из которых окружена капсулой из соединительной ткани. Перегородки, идущие от капсулы, разделяют тимус на дольки. В каждой дольке тимуса выделяют 2 зоны: по периферии - корковая (*cortex*), в центре мозговая (*medulla*). Объём органа заполнен эпителиальным каркасом (эпителий), в котором располагаются тимоциты (незрелые Т-лимфоциты тимуса), дендритные клетки и макрофаги. Дендритные клетки расположены преимущественно в зоне, переходной между корковой и мозговой. Макрофаги присутствуют во всех зонах.

- Эпителиальные клетки своими отростками обхватывают

лимфоциты тимуса (тимоциты), поэтому их называют «*nurse cells*» (клетки-«сиделки» или клетки - няньки»). Эти клетки не только поддерживают развивающиеся тимоциты, но также продуцируют цитокины ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-7, LIF, GM-CSF и экспрессируют молекулы адгезии LFA-3 и ICAM-1, комплементарные молекулам адгезии на поверхности тимоцитов (CD-2 и LFA-1). В мозговой зоне долек расположены плотные образования из скрученных эпителиальных клеток - тельца Гассалья (тельца тимуса) - места компактного скопления дегенерирующих эпителиальных клеток.

- **Тимоциты** дифференцируются из костно мозговых СКК. Из тимопоитов в процессе дифференцировки образуются Т-лимфоциты, способные распознавать антигены в комплексе с МНС. Однако большинство Т-лимфоцитов либо не сможет обладать этим свойством, либо будет распознавать ауто антигены. Для предотвращения выхода таких клеток на периферию в тимусе инициируется их элиминация путем индукции апоптоза. Таким образом в норме в циркуляцию из тимуса выходят только клетки, способные распознавать антигены в комплексе со «своими» МНС, но при этом не индуцирующие развитие аутоиммунных реакций.

- **Гематотимический барьер** Тимус сильно васкуляризован. Стенки капилляров и венул образуют гематотимический барьер на входе в тимус и, возможно, на выходе из него. Зрелые лимфоциты выходят из тимуса либо свободно, так как каждая долька имеет эфферентный лимфатический сосуд, выносящий лимфу в лимфатические узлы средостения, либо путём экстравазации через стенку пост капиллярных венул с высоким эндотелием в корково-мозговой области и/или через стенку обычных кровеносных капилляров.

- **Возрастные изменения.** К моменту рождения тимус полностью сформирован. Он густо заселён тимоцитами в течение всего детства и до момента полового созревания. После пубертата тимус начинает уменьшаться в размерах. Тимэктомия

у взрослых не приводит к серьёзным нарушениям иммунитета, поскольку в детстве и подростковом возрасте создаётся необходимый и достаточный пул периферических Т-лимфоцитов на всю оставшуюся жизнь.

❖ **Периферические органы.** В периферических лимфоидных органах (селезёнка, лимфатические узлы, не инкапсулированная лимфоидная ткань) зрелые наивные лимфоциты контактируют с антигеном и АПК. Если антиген распознающий рецептор лимфоцита связывает комплементарный антиген в периферическом лимфоидном органе, то лимфоцит вступает на путь дальнейшей дифференцировки. В режиме иммунного ответа, т. е. начинает пролиферировать и продуцировать эффекторные молекулы — цитокины, перфорин, гранзимы и др. Такую додифференцировку лимфоцитов на периферии называют иммуногенезом. В результате иммуногенеза формируются клоны эффекторных лимфоцитов, распознающих антиген и организующих деструкцию как его самого, так и периферических тканей организма, где этот антиген присутствует.

А. Лимфатические узлы множественные, симметрично расположенные, инкапсулированные периферические лимфоидные органы бобовидной формы, размером от 0,5 до 1,5 см в длину (при отсутствии воспаления). Лимфатические узлы через афферентные (приносящие) лимфатические сосуды (их несколько на каждый узел) дренируют тканевую жидкость. Таким образом, лимфатические узлы - «таможня» для всех веществ, в том числе для антигенов. Из анатомических ворот узла вместе с артерией и веной выходит единственный эфферентный (выносящий) сосуд. В итоге лимфа попадает в грудной лимфатический проток. Паренхима лимфатического узла состоит из Т - клеточной, В - клеточной зон и мозговых тяжей.

• **В - клеточная зона.** Коровое вещество разделено соединительнотканью трабекулами на радиальные секторы и содержит лимфоидные фолликулы, это В - лимфоцитарная зона.

Строма фолликулов содержит фолликулярные дендритные клетки (ФДК), формирующие особое микроокружение, в котором происходит уникальный для В-лимфоцитов процесс соматического гипер мутагенеза вариабельных сегментов генов иммуноглобулинов и отбор наиболее аффинных вариантов антител («созревание аффинности антител»). Лимфоидные фолликулы проходят 3 стадии развития. Первичный фолликул — мелкий фолликул, содержащий наивные В-лимфоциты. После того как В - лимфоциты вступают в иммуногенез, в лимфоидном фолликуле появляется герминативный (зародышевый) центр, содержащий интенсивно пролиферирующие В-клетки (это происходит примерно через 4-5 дней после активной иммунизации). Это вторичный фолликул. По завершении иммуногенеза лимфоидный фолликул существенно уменьшается в размере.

- **Т-клеточная зона.** В паракортикальной (Т зависимой) зоне лимфатического узла расположены Т-лимфоциты и интердигитальные дендритные клетки (они отличаются от ФДК) костномозгового происхождения, которые презентруют антигены Т-лимфоцитам. Через стенку посткапиллярных венул с высоким эндотелием происходит миграция лимфоцитов из крови в лимфатический узел.

- **Мозговые тяжи.** Под паракортикальной зоной расположены содержащие макрофаги мозговые тяжи. При активном иммунном ответе в этих тяжах можно видеть множество зрелых В - лимфоцитов — плазматические клетки. Тяжи впадают в синус мозгового вещества, из которого выходит эфферентный лимфатический сосуд.

Б. Селезёнка непарный орган массой около 150гр. Лимфоидная ткань селезёнки белая пульпа. Селезёнка лимфоцитарная «таможня» для антигенов, попавших в кровь. Лимфоциты селезёнки накапливаются вокруг артериол в виде так называемых периартериоллярных муфт.

Т - зависимая зона муфты непосредственно окружает

артериолу. В-клеточные фолликулы расположены ближе к краю муфты. Артериолы селезёнки впадают в синусоиды (это уже красная пульпа). Синусоиды заканчиваются венулами, собирающимися в селезёночную вену, несущую кровь в воротную вену печени. Красную и белую пульпу разделяет диффузная маргинальная зона, населенная популяцией В – лимфоцитов (В-клетки маргинальной зоны) и особыми макрофагами. Клетки маргинальной зоны являются важным связующим звеном между врождённым и приобретённым иммунитетом. Здесь происходит самый первый контакт организованной лимфоидной ткани с возможными патогенами, циркулирующими в крови.

В. Лимфоидная ткань слизистых оболочек и кожи.

Не инкапсулированная лимфоидная ткань слизистых оболочек представлена глоточным лимфоидным кольцом Пирогова - Вальдейера, пейеровыми бляшками тонкой кишки, лимфоидными фолликулами аппендикса, лимфоидной тканью слизистых оболочек желудка, кишечника, бронхов и бронхиол, органов мочеполовой системы и других слизистых оболочек.

• **Пейеровы бляшки.** Групповые лимфатические фолликулы, расположенные в lamina propria тонкой кишки. Фолликулы, точнее Т-клетки фолликулов, примыкают к кишечному эпителию под так называемыми М-клетками («М» от *Membranous*), являющимися «входными воротами» пейеровой бляшки. Основная масса лимфоцитов расположена в В - клеточных фолликулах с зародышевыми центрами. Т-клеточные зоны окружают фолликул ближе к эпителию. В - лимфоциты составляют 50-70%, Т-лимфоциты 10-30% всех клеток пейеровой бляшки. Основная функция пейеровых бляшек поддержание иммуногенеза В-лимфоцитов и их дифференцировка в плазматические клетки, продуцирующие антитела - преимущественно секреторные IgA. Продукции IgA в слизистой оболочке кишки составляет, более 70% общей, ежедневной продукции иммуноглобулинов в организме у взрослого человека

около 3гр IgA каждый день. Более 90% всего синтезируемого организмом иммуноглобулина А (IgA) экскретируется через слизистую оболочку в просвет кишки.

• **Внутриэпителиальные лимфоциты.** Помимо организованной лимфоидной ткани в слизистых оболочках есть и одиночные внутри эпителиальные Т-лимфоциты, диссеминированные среди эпителиальных клеток. На их поверхности экспрессирована особая молекула, обеспечивающая адгезию этих лимфоцитов к энтероцитам, — интегрин альфа, (CD - 103). Порядка 10—50% внутри эпителиальных лимфоцитов составляют Т-клеточный рецептор (TCR) CD-8 Т-лимфоциты.

1.3. Иммунный ответ

Врождённая и адаптивная системы защиты организма включают клеточный и гуморальный компоненты и активно взаимодействуют друг с другом в процессе иммунного ответа. Иммунный ответ - многоэтапный процесс, заключающийся в распознавании и деструкции патогена и разрушенных им тканей. В его основе лежит уникальное свойство иммунной системы отличать «свое» от «чужого» и применять по отношению к «чужому» механизмы нейтрализации и уничтожения, а именно - иммунные реакции. Распознавание множества чужеродных антигенов происходит благодаря наличию в организме огромного разнообразия образующихся в тимусе клонов Т-лимфоцитов (отбор клонов) и при помощи комплекса генов главного комплекса гисто совместимости (МНС) классов I и II. Нейтрализацию «чужого» осуществляют циркулирующие в жидкостях организма антитела (гуморальный иммунитет) и цитотоксические лимфоциты (клеточный иммунитет).

Таким образом, основными характеристиками адаптивного иммунного ответа являются умение различать собственные антигены от чужеродных, специфичность и иммунная память.

Различение своего и «чужого» выражается в дифференциации компонентов собственных тканей организма и

чужеродных молекул. Специфическую не отвечаемость организма на собственные антигены обозначают как иммунную толерантность. Если же организм воспринимает собственные компоненты как чужеродные, развивается аутоиммунный ответ.

- Специфичность иммунного ответа проявляется в том, что иммунитет, сформировавшийся в результате контакта с определённым антигеном, будет обеспечивать защиту только против этого антигена.

- Иммунная память формируется в результате адаптивного иммунного ответа против конкретного возбудителя и сохраняется, как правило, в течение всей последующей жизни организма, защищая его от повторной инфекции, вызываемой этим же возбудителем. Такой механизм обеспечивается способностью иммунной системы к «запоминанию» антигенных детерминант патогена за счёт образования клеток иммунной памяти. Наличие иммунной памяти обуславливает развитие ускоренного и усиленного ответа (вторичный иммунный ответ) при повторном контакте с антигеном. Формирование иммунной памяти является основной целью вакцинации, т.е. процесса естественного или искусственного формирования иммунной защиты против определённой инфекции.

Отдельные этапы иммунного ответа:

- **Воспаление:** участвуют клетки, поглощающие антигены. Фагоциты, антиген презентующие клетки в частности, дендритные клетки (ДК), макрофаги, эндотелиальные и другие клетки. Выделяются противовоспалительные цитокины и хемокины

- **Переработка антигена (процессинг).** После поглощения антигена антиген презентующей клеткой (АПК) происходит его процессинг (расщепление и встраивание в молекулы МНС) и презентация на поверхности клетки. Это необходимо для распознавания антигена Т-лимфоцитами.

- **Распознавание антигена** происходит в периферических лимфоидных органах. Начало специфического иммунного ответа

— пролиферация и дифференцировка эффекторных и регуляторных лимфоцитов.

- **Деструкция антигена и повреждённых патогеном тканей.**

При этом одни лимфоциты (помощники — хелперы) «нанимают» для выполнения эффекторных функций другие лимфоциты и или воспалительные лейкоциты (нейтрофилы, моноциты, базофилы, эозинофилы), тучные клетки, а также гуморальные литические системы типа комплемента.

- **Выведение продуктов распада** происходит с участием известных систем выделения.

1.3.1. Клетки иммунной системы

В состав иммунной системы входят клетки различного происхождения: мезенхимного, эктодермального и энтодермального.

Клетки мезенхимного генеза. К ним относят клетки, дифференцировавшиеся из предшественников лимфогематопоза. Разновидости лимфоцитов - Т, В и НК, которые в процессе иммунного ответа кооперируются с различными лейкоцитами - моноцитами макрофагами, нейтрофилами, эозинофилами, базофилами, а также дендритными, тучными клетками и эндотелиоцитами сосудов. Даже эритроциты вносят свой вклад в реализацию иммунного ответа: транспортируют иммунные комплексы «антиген—антитело—комплемент» в печень и селезёнку для фагоцитоза и разрушения.

Эпителий. В состав некоторых лимфоидных органов (тимус, некоторые не инкапсулированные лимфоидные ткани) входят эпителиальные клетки эктодермального и энтодермального происхождения.

Клетки иммунной системы условно подразделяют на клетки врождённого и адаптивного иммунитета. Главным их различием является специфичность распознавания: низкая у первых и высокая у вторых. Существует и третья группа клеток — промежуточная, несущая черты обеих групп. Наличие этой

группы показывает единство происхождения и способов защиты организма от чужеродных веществ антигенной природы.

В выполнении эффекторных иммунных функций очень важную роль играют АПК, Т- и В - лимфоциты и NK-клетки (от англ. *Natural Killer* — естественный киллер, натуральный киллер).

▪ **Антигенпрезентирующие клетки (АПК).** К АПК относят макрофаги, дендритные клетки (включая клетки Лангерганса эпидермиса, М-клетки лимфатических фолликулов пищеварительного тракта и других слизистых оболочек, дендритные эпителиальные клетки тимуса), а также В-лимфоциты. АПК охватывают антиген, обрабатывают его и презентуют антигенные фрагменты на своей поверхности Т-лимфоцитам.

▪ **Т-лимфоциты** обуславливают клеточный иммунный ответ, а также помогают отвечать на антиген В-лимфоцитам при гуморальном иммунном ответе. Каждый Т-лимфоцит несет на своей поверхности рецептор Т-лимфоцитов (TCR — *T-Cell Receptor*) строю одной специфичности, т.е. взаимодействующий с одним антигеном. Т-клетки по экспрессии маркерных антигенов CD (*Cluster Differentiation*) подразделяют на CD4⁺ и CD8⁺

▪ **CD4⁺ Т-лимфоциты (хелперы).** Среди Т-клеток, экспрессирующих мембранные маркеры CD4, выделяют Т-лимфоциты с эффекторными функциями (Th1, Th2, Th17) и Т - регуляторные клетки (естественные - T_{reg} и индуцированные - Th3, или Tr1).

○ **Рецептор Т-хелпера (TCR)** распознаёт антигенную детерминанту (эпитоп), экспрессированную на поверхности антиген презентирющей клетки вместе с молекулой главного комплекса гисто совместимости класса II (МНС-II). Во взаимодействии участвует маркерная молекула Т-хелпера - CD4. В результате подобного взаимодействия антиген презентирющая клетка секретирует интерлейкин-1 (ИЛ-1), стимулирующий в Т хелпере синтез и секрецию цитокинов, включая ИЛ-2, а также синтез и перенос на плазматическую мембрану Т-хелпера

рецепторов для ИЛ-2 (ИЛ-2 также стимулирует пролиферацию Т-хелперов). Отбор В-лимфоцитов происходит при взаимодействии антигена с вариабельными участками антител (иммуноглобулинов) на поверхности этих клеток. Эпитоп этого антигена в комплексе с молекулой МНС-11 распознают рецептор Т-хелпера, после чего Т-лимфоцит секретирует цитокины, стимулирующие пролиферацию В-лимфоцитов и их дифференцировку в плазматические клетки, синтезирующие антитела к данному антигену. Также показаны некоторые мембранные белки (CD40/CD40L и CD2K/B7), участвующие в проведении костимуляторных сигналов, необходимых для полноценной активации взаимодействующих клеток.

○ **Т-хелперы** при взаимодействии с АПК специфически распознают антигены и начинают вырабатывать определённый набор цитокинов соответственно типу инфекционного агента: Th2 при взаимодействии с В-клетками индуцируют гуморальный иммунный ответ, а Th1 — при взаимодействии с макрофагами и цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) клеточный иммунный ответ. Th17 продуцируют ИЛ-17 мощный индуктор тканевого воспаления, привлекающий и активирующий гранулоциты и макрофаги.

○ **Регуляторные Т-клетки** (Т – супрессоры) контролируют интенсивность иммунного ответа, подавляя активность других субпопуляций Т-лимфоцитов.

▪ **CD8⁺ Т-лимфоциты.** Субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих мембранные молекулы CD-8. Эти клетки выступают в роли цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Они лизируют клетки-мишени, несущие чужеродные или изменённые собственные антигены — аутоантигены: например, клетки опухоли, трансплантата, инфицированные вирусом клетки, несущие поверхностные вирусные антигены. Эффекторные функции ЦТЛ реализуются через индукцию образования в клетках-мишенях пор (под действием особых белков – перфоринов) и секрецию в поры специализированных сериновых

протеаз - гранзимов. Вызванное этим нарушение осмотического баланса с внеклеточной средой приводит к гибели клетки. Под влиянием гранзимов индуцируются процессы запрограммированной гибели клетки - апоптоза.

▪ **Т-клетки памяти** - долгоживущие рециркулирующие малые лимфоциты, формируемые при первичном иммунном ответе. Они «запоминают» особенности детерминант антигенов и при повторном распознавании того же антигена развивают быстрый и усиленный ответ. Т-клетки памяти отличаются от наивных и эффекторных Т-лимфоцитов высоким уровнем экспрессии мембранных маркёров активации, меньшей потребностью в противовоспалительных медиаторах и корцепторных сигналах для развития вторичного иммунного ответа.

▪ **В - лимфоциты** отвечают за гуморальный иммунный ответ. На мембране В-лимфоцитов присутствует рецептор (BCR) для антигена мономер иммуноглобулин М (IgM). Продолжительность жизни большинства В-лимфоцитов (если они не активируются антигеном) не превышает 10 суток.

▪ **Эффекторные В-лимфоциты.** Активированные В-лимфоциты размножаются и дифференцируются в плазматические клетки, вырабатывающие антитела (иммуноглобулины, специфичные к конкретному антигену).

▪ **В-лимфоциты иммунной памяти** — долгоживущие рециркулирующие малые лимфоциты. Они не превращаются в плазматические клетки, но сохраняют иммунную «память» об антигене, с которым когда-то контактировали, за счёт продолжающейся экспрессии рецептора для антигена. Клетки памяти активируются при повторном распознавании того же антигена. В этом случае В-лимфоциты памяти, при обязательном участии Т-хелперов и ряда других факторов, превращаются в плазматические клетки, обеспечивая быстрый синтез большого количества специфичных антител, взаимодействующих с чужеродным антигеном, и развитие эффективного иммунного

ответа.

▪ **НК-клетки** (от англ. *Natural Killer* — естественный киллер) — лимфоциты, лишённые характерных для Т- и В-клеток поверхностных CD-маркеров, а также антигенраспознающих рецепторов — TCR (*T Cell Receptor*) или BCR (*B Cell Receptor*). Эти клетки играют важную роль в механизмах врождённого иммунитета, уничтожают трансформированные, инфицированные вирусами и чужеродные клетки.

Гуморальные факторы. Помимо клеток, иммунная система представлена растворимыми молекулами — гуморальными факторами. Это продукты В-лимфоцитов антитела (они же иммуноглобулины) и растворимые медиаторы межклеточных взаимодействий - цитокины.

1.4. Специфические факторы защиты.

Специфические факторы защиты организма - комплекс гуморальных, клеточных факторов иммунной системы с сетью медиаторов (цитокинов), направленный на уничтожение и удаление из организма чужеродных веществ с формированием памяти на его специфические структуры. Указанные функции осуществляются деятельностью лимфоидных органов, клеток лимфоидной ткани, различные уровни организации и функции которой обеспечивают индивидуальность и целостность организма. Основная характеристика специфических факторов иммунной системы - способность отличать генетически чужеродные структуры от собственных.

Для формирования полноценного специфического иммунного ответа необходимо взаимодействие трех типов иммунокомпетентных клеток:

1) В-лимфоцитов;

2) Т-лимфоцитов;

3) антигенпрезентирующих клеток (АПК), т.е. клеток, представляющих антиген для Т- и В-лимфоцитов. К ним относятся макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки. Наибольшей

активностью и специфичностью в процессе презентации обладают макрофаги.

Предшественники Т- и В-лимфоцитов, образуясь в костном мозге из стволовых кроветворных клеток (СКК), созревают от стадии лимфоидной стволовой клетки до пре-В- или пре-Т-клеток. Процесс протекает под влиянием ростовых факторов, включая цитокины - интерлейкины (ИЛ-1, 4, 6). В центральных органах иммунной системы (ИС) (для В-клеток - костный мозг, для Т-клеток - тимус) лимфоциты проходят дифференцировку до зрелых лимфоцитов. Мигрируя в периферические органы иммунной системы (селезенка, лимфоузлы), лимфоциты заселяют в них соответственно Т-или В-зависимые зоны. Постоянная рециркуляция лимфоцитов (с кровью или лимфой) создает условия для контроля с их стороны за постоянством гомеостаза. В дальнейшем для выполнения эффекторных функций Т- и В-лимфоциты должны активизироваться, т.е. перейти из состояния «покоя» в состояние активации. Активация клеток сопровождается пролиферацией (*лат. proles* - потомство, *ferre* - нести), т.е. размножением. Процесс активации и пролиферации проходит на фоне активации генов, которые контролируют синтез молекул межклеточных взаимодействий, дифференцировочных антигенов, медиаторов и других факторов роста клеток. При отсутствии факторов роста активированная клетка вступает в процесс физиологической запрограммированной гибели (апоптоз).

В - система лимфоцитов. В - первая буква названия органов, в которых В-клетки формируются: *bursa* (*лат.*) у птиц и *bone marrow* (*англ.* костный мозг) у млекопитающих. Это клетки, участвующие в формировании гуморального звена иммунного ответа через продукцию защитных антител различных классов. Продолжительность жизни В-лимфоцитов (зрелых, неиммунных) составляет несколько месяцев. В-лимфоциты слабо рециркулируют, не участвуют в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Содержание В-лимфоцитов составляет (от общих лимфоцитов органа): костный мозг - 10 - 15 %; селезенка - до 65 %; лимфоузлы - 15 - 25 %; периферическая кровь - 15 - 20 %; лимфа грудного протока - 10 %; тимус - менее 3%. В популяции В-лимфоцитов в зависимости от места их дифференцировки подразделяют две основные субпопуляции: В1-лимфоциты, составляющие до 20% периферических лимфоцитов, и В2-лимфоциты [31].

Часть предшественников В-клеток костного мозга в результате циркуляции попадает преимущественно в брюшную, плевральную полости, миндалины, где проходят дифференцировку и существуют независимо от стволовой клетки и костного мозга. Эта группа В-лимфоцитов носит название В1-лимфоциты и выполняет роль быстро реагирующих клеток на проникающие через брюшную и плевральную полости (прибавьерные полости) микроорганизмы. В1-лимфоциты несут на мембране дифференцировочный антиген CD5+ и синтезируют преимущественно IgM-антитела. Важной особенностью В1-лимфоцитов является их способность продуцировать естественные поли специфические иммуноглобулины IgM, в связи с чем эти клетки имеют важное значение в развитии аутоиммунных и лимфопролиферативных процессов.

В2-лимфоциты («обычные») проходят дифференцировку в костном мозге от стволовой клетки до предшественников В-лимфоцитов под влиянием ростовых факторов, интерлейкинов (ИЛ-1, 4, 6), микроокружения.

Ранние, неиммунные В-клетки мигрируют через кровоток в селезенку, лимфатические узлы и другие вторичные лимфоидные органы, где проходят антигензависимую фазу развития. На этой стадии при получении сигналов от генетически чужеродных структур меняется набор поверхностных рецепторов (маркеров), соответствующих фазе активации, пролиферации, дифференцировки. Основной функцией зрелого лимфоцита является синтез большого разнообразия специфических иммуноглобулинов, или антител (стадия плазматической клетки).

Для плазматических клеток костный мозг служит также периферическим лимфоидным органом, так как возвратившийся в костный мозг плазматическая клетка становится источником продукции антител. В табл. 3 представлены основные различия В1- и В2-лимфоцитов.

Таблица 3. Характеристика субпопуляций В1- и В2-лимфоцитов

Субпопуляция В-лимфоцитов	Местодифференцировки	Образуемые антитела	Специфичность антител	Специфический маркер	Аутоактивность
В1	Преобладают в брюшной, плевральной полостях, миндалинах лимфоузлах	IgA IgM	Полиспецифичность	CD5+, ИЛ-5p	Есть
В2	Периферические лимфатические органы, лимфоузлы - 65 - 75 %	IgM IgG IgA JgE IgD	Моноспецифичность	CD5-	Нет

Примечание. ИЛ-5p - рецептор интерлейкина

Все лимфоциты морфологически одинаковы по строению, но различны функционально. Типирование лимфоцитов и других иммунокомпетентных клеток (ИКК) осуществляется с помощью групп (кластеров, *англ.* Claster) моноклональных антител (МкАт), определяющих специфический мембранный антиген (CD). Нумерация CD соответствует нумерации специфических МкАт, с помощью которых была идентифицирована антигенная структура. Следует учесть, что не все антигенные структуры идентифицированы с помощью МкАт и поэтому не имеют

обозначений CD (не кластрированы). На поверхности клеточной мембраны В-лимфоциты имеют различные рецепторы (*лат. recipere* - получать) - молекулярные структуры, принимающие сигналы и распознающие иммунологически значимые субстанции. Они определяют функциональные особенности и могут быть отнесены к общей группе «маркеров» (*фр. marquer* - отмечать). Уникальной особенностью основного антиген распознающего рецептора В-лимфоцитов (ВКР, или BCR-B cell receptor) является его иммуноглобулиновая структура. В-лимфоциты распознают антиген с помощью молекул иммуноглобулинов, встроенных в мембрану (мембранные или поверхностные иммуноглобулины, mIg). В результате распознавания антигена В- лимфоцит дифференцируется в плазматическую клетку и секретирует иммуноглобулины (sIg).

Общее для всей популяции В лимфоцитов - рецепторы для Fc участка иммуноглобулинов, C3 компонента комплемента; характерны для отдельных линий В-лимфоцитов - мембранные и секретируемые иммуноглобулины (IgA, IgM, IgG, IgD, IgE). Все рецепторы равномерно расположены на поверхности клетки, способны перемещаться по поверхности клеточной мембраны. При активации лимфоцита рецепторы концентрируются на одном из полюсов клетки в виде «шапочки» (*англ. cap formation*).

Основной фенотип большинства зрелых В-лимфоцитов мало отличается от фенотипа незрелых. Решающим отличием является экспрессия рецепторов иммуноглобулинов: IgM - у незрелых В-клеток; IgM и IgD - у зрелых В-клеток.

После контакта с антигеном незрелые В-лимфоциты приобретают набор так называемых активационных рецепторов, способствующих передаче сигналов с мембранной поверхности к ядру клетки. Активированные лимфоциты называются премированными (*лат. premia* - первый). Основные признаки активированных В-лимфоцитов:

- изменение пространственных форм (конформации) клеточных рецепторов;

- активация ассоциированных с мембраной внутриклеточных ферментов;

- увеличение в клетке содержания кальция;
- увеличение синтеза белков, включая цитокины;
- увеличение высвобождающихся медиаторов;
- увеличение синтеза ДНК.

Активация В-лимфоцитов сопровождается увеличением поверхности клетки, ее ворсинчатости, содержания мембранных ассоциированных молекул. Конечная форма дифференцировки В-лимфоцитов - плазматическая клетка, отличающаяся от других несколькими основными признаками:

- большим размером клетки с хорошо развитым цитоплазматическим ретикулулом аппарата Гольджи;

- большим количеством продуцируемых (секреторных) иммуноглобулинов в цитоплазме клетки (sIg до 90 %). В сравнении: у зрелого лимфоцита 90% иммуноглобулинов связано с мембраной (mlg);

- высокой способностью переключения синтеза IgM на синтез иммуноглобулинов других классов. Плазматические клетки живут до трех недель, синтезируя за это время тысячи молекул антител.

Часть В-лимфоцитов формирует поколение антигенспецифических клеток (клон), при повторной встрече с антигеном активно и быстро продуцирующих специфические антитела преимущественно IgG класса (клетки памяти). Формирование полноценных иммунологических реакций возможно при наличии качественного и количественного набора структур ВКР, рецепторного аппарата, структур, представляющих антиген Т-лимфоцитам, способности контактировать с другими ИКК. При отсутствии антигена или отсутствии дополнительной информации от других иммунокомпотентных (ИКК), особенно Т-клеток, В-клетки погибают (апоптоз).

Суть полноценной иммунологической реакции (иммунного ответа) - баланс процессов активации клеток и апоптоза.

Апоптоз (греч. апо - без, птоз - разрушение, т.е. гибель без разрушения) - запрограммированная физиологическая гибель клетки, сопровождающаяся деградацией ядерной ДНК и дегенерацией ядра. В последующем деградированная клетка фагоцитируется. Процесс апоптоза обусловлен рядом мембранных и внутриклеточных изменений. На клеточной мембране имеются специфические рецепторы апоптоза, проводящие сигнал от индукторов апоптоза. Схематично апоптоз складывается:

- из сигнала;
- активации рецептора апоптоза CD95 (Fas);
- повышения концентрации индукторов апоптоза (Ca);
- активации эндогенных ферментов гена апоптоза p53;
- фрагментации ДНК (деградации);
- деградации хроматина;
- гибели клетки и ее фагоцитоз.

Иммунофенотип активированного В-лимфоцита фиксируется в виде: CD9⁻, CD10⁻, CD23⁺, CD25⁺, ИЛ-2P⁺, CD71⁺, инсулин P⁺. Основные свойства зрелых В-лимфоцитов - способность распознавать антиген через поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы, взаимодействовать с другими иммунокомпетентными клетками, узнавать свое «рабочее место» (хоминг) посредством рецепторов.

Т-система лимфоцитов. «Т» - первая буква названия вилочковой железы (лат. thymus - тимус), где проходят основные этапы созревания и дифференцировки Т-клеток.

Т-лимфоциты - вторая большая группа иммунокомпетентных клеток, отвечающая преимущественно за формирование клеточного звена иммунной системы. Они способны:

а) разрушать чужеродные субстанции при непосредственном контакте;

б) регулировать формирование полноценного иммунного ответа через продукцию регулирующих медиаторов - цитокинов;

в)формировать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) как вариант специфического иммунного ответа клеточного типа на ряд антигенов.

Группа Т-клеток более многочисленна, чем группа В-клеток. Т-лимфоциты составляют до 65 - 80 % всех лимфоцитов периферической крови. Могут быть как коротко, так и долгоживущими клетками.

Т-лимфоциты обладают выраженной рециркулирующей активностью, что позволяет осуществлять многочисленные иммунологические и иммунопатологические реакции. Т-лимфоциты, как и В-лимфоциты, происходят от стволовых кроветворных клеток костного мозга, но уже на ранних этапах развития Т-клетки покидают костный мозг и мигрируют в тимус.

Основной антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов - ТКР, или TCR (Tcell receptor) - представляет собой сложный комплекс с набором полипептидных цепей (альфа и бетта или гамма и сигма). ТКР включает и другие молекулы, ответственные за передачу сигнала антигена внутрь клетки (CD3 и др.). Т-лимфоциты классифицируются на две субпопуляции: Т - хелперы (помощники) и Т - цитотоксические (киллеры). В свою очередь, Т - хелперные лимфоциты также подразделяются на две субпопуляции: Тх-1 и Тх-2. Т-лимфоцитам разной стадии дифференцировки присущи соответствующие специфические маркеры (табл.4).

Таблица 4. Характеристика основных дифференцировочных антигенных

Структур Т-лимфоцитов

Основные антигенные структуры	Тип клеток	Основные функции антигенных структур
CD2+	Т-общая популяция	Рецептор к эритроцитам барана; маркер ранних Т-лимфоцитов субкапсулярной зоны; проводит импульс для дальнейшей дифференцировки стимулирует пролиферацию, продукцию ИЛ-2

CD3+	Т-общая популяция	Маркер зрелых Т-клеток корковой зоны тимуса, входит в состав ТКР, проводит «информацию» к ядру клетки (пролиферация, дифференцировка)
CD5	Незрелые Т-клетки	Маркер Т-лимфоцитов
ТКР-CD3	Т-общая популяция	Главный антигенраспознающий рецептор
CD4+	Тх-1 - клетка воспаления (Т-индукторы, Т- ГЗТ), Тх-2	Общий маркер для Тх-1 и Тх-2. Входит в состав ТКР (корцептор). Участвует в распознавании ГКГС (МНС II класса), рецептор к ВИЧ-вирус. Распознавание антигенного комплекса на мембране макрофага (МФ); активирует МФ распознавание комплекса «МНС II + антиген»: помощь В-клеткам в синтезе
CD8+	Т-цитотоксические (ЦТЛ), киллеры, супрессорно-	Входит в состав ТКР (корцептор), распознает комплекс антиген + МНС I класса. Лизис клеток-мишеней
CD71+	Активационная	Рецептор для трансферрина
HLA DR, DQ+, DP	Активационная	Рецептор тканевой гистосовместимости (МНС I, МНС II)
CD25+	Активационная	Рецептор для ИЛ-2
CD95		Рецептор апоптоза

Примечание. Корцептор - помощник основного рецептора

При появлении мутаций в клетках сразу же включаются процессы апоптоза. В **корковой зоне** (85% Т-клеток) в процессе созревания Т-лимфоциты приобретают соответствующие маркеры дифференцировки: CD1+, CD2+, CD3+, CD4+, CD8⁻, CD25⁻, CD44⁻. В **медуллярной зоне** происходит окончательное формирование ТКР, дифференцировка на Т-клетки хелперы и цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ) с фенотипами: Т-хелперы - CD1⁻, CD2+, CD3+, CD4⁻,

CD8+, ТКР ав+; Т-цитотоксические - (ЦТЛ) CD1-, CD2+, CD3+, CD4-, CD8+, ТКР ав+.

Мигрирующие из тимуса Т-клетки, не встретившие антиген и не вступившие с ним во взаимодействие, получили название «наивные» [3]. Созревание наивных Т-клеток происходит в периферических лимфоидных органах (в Т-зоне), где антиген распознается Т-клетками лишь в иммуногенной форме через антиген презентующие клетки (АПК).

Для формирования антиген специфических Т-лимфоцитов Т предшественники должны мигрировать из костного мозга в тимус. Этот сложный процесс реализуется через поверхностные структуры клетки с адгезивными свойствами (CD44), распознающие клетки гематотимического барьера и обеспечивающие его преодоление.

Основной особенностью Т-лимфоцитов является способ распознавания генетически чужеродных молекул: Т-клетки распознают их только в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). В зависимости от того, с каким классом ГКГС ассоциирован антиген, антигенраспознающий рецептор может принадлежать к двум разным типам Т-лимфоцитов (субпопуляции).

Тип клеток, распознающий комплекс «антиген + МНС I», относится к цитотоксическим (ЦТЛ), супрессорно-киллерным, или CD8+ клеткам.

Тип клеток, распознающий комплекс «антиген + МНС II», относится к хелперным, или CD4+ Т-лимфоцитам.

В качестве клеток-мишеней для CD8 цитотоксических лимфоцитов служат:

- 1) инфицированные клетки;
- 2) опухолевые клетки;
- 3) клетки трансплантата;
- 4) измененные собственные клетки хозяина.

Все процессы взаимодействия активации и дифференцировки Т-клеток происходят под влиянием растворимых медиаторов - цитокинов и молекул адгезии.

Среди Т-лимфоцитов выделяются функционально различные субпопуляции, тесно взаимосвязанные друг с другом и другими иммунокомпетентными клетками через активно синтезируемые растворимые цитокины и молекулы адгезии. Каждая из функционально отличных субпопуляций Т-клеток характеризуется соответствующей специфичностью, идентифицируемой по комплексу специфических антигенных или рецепторных структур.

1.4.1. Регуляция иммунного ответа

Осуществляется двумя путями:

1) гуморальный - с участием В-лимфоцитов, которые при взаимодействии с антигеном дифференцируются в плазматические клетки, активно продуцирующие защитные антитела;

2) клеточный - с участием Т-лимфоцитов, которые:

а) разрушают антиген при непосредственном контакте (цитотоксические Т-лимфоциты) аналогично НК, но с активацией специфического рецепторного аппарата;

б) реализуют регуляторную функцию Т-лимфоцитов через воздействие на гуморальные и клеточные иммунологические реакции, усиливая или подавляя их.

Таблица. 5 Основные характеристики Т - лимфоцитов

Основные характеристики Т - лимфоцитов
✓ Т-лимфоциты происходят из унипотентной стволовой Т-клетки предшественника костного мозга с последующим созреванием в тимусе; ✓ основные маркеры Т-лимфоцитов CD 2 (рецептор к эритроцитам барана); ТКР - CD3 антиген распознающий рецептор; связанные с мембраной антигены CD3, CD4 и CD8 (рецепторные белки продуктов генов соответственно МНС-I и МНС-II); рецептор к Fc - фрагменту IgG или IgM; ✓ основные субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-помощники (хелперы) и Т-цитотоксические (киллеры); ✓ основные маркеры Т-хелперных лимфоцитов - CD4, CD3, рецепторы к антигенам и Т-клеточным митогенам; ✓ основные субпопуляции Т-хелперных лимфоцитов: Тх-I и Тх-2; ✓ Т-хелперы распознают антиген с помощью антиген распознающего

комплекса ТКР- CD3 и CD4 на мембране в ассоциации с белками 2-го класса главного комплекса тканевой гистосовместимости (МНС II);

- ✓ основной маркер цитотоксических лимфоцитов - CD8;
- ✓ цитотоксические Т-лимфоциты распознают клетки-мишени (антиген) с помощью антиген распознающего рецептора ТКР - CD3 и CD8;
- ✓ фенотипические маркеры активированных Т-лимфоцитов - CD3, CD25 (рецепторы к ИЛ-2);
- ✓ фенотипическая характеристика Т - хелперных лимфоцитов - CD4+, CD8- цитотоксических - CD4-, CD8+.

Таблица 6. Основные характеристики адаптивной специфической защиты

Основные характеристики адаптивной специфической защиты
1) В- и Т-лимфоциты - основные клетки, осуществляющие специфические иммунологические реакции; 2) Т- и В-лимфоциты отличаются по структуре антиген распознающего рецептора; 3) Т- и В-лимфоциты ответственны за проявления своего действия преимущественно: В - в реакциях гуморального типа, Т - в реакциях клеточного типа; 4) для формирования полноценного иммунного ответа необходима кооперация Т- и В-лимфоцитов с макрофагом; 5) формирование иммунного ответа происходит на фоне и с помощью растворимых активных медиаторов (цитокинов), синтезируемых активными иммунокомпетентными; 6) полноценный иммунный ответ сопровождается формированием Т - и В-клеток памяти.

1.5. Главный комплекс гистосовместимости

Изучение разнообразия иммунологических специфических реакций на антиген, особенно активно проводимое в области трансплантации органов и тканей, привело к выводу о наличии системы генов, контролирующей силу и характер ответной реакции организма.

Каждый вид животных и человека имеет свой главный барьер, отвечающий за реакции совместимости. Весь процесс узнавания

«своего» или «чужого» развивается под контролем системы генов, называемой у человека HLA-системой (Human leucocyte antigen), поскольку выяснилось, что основную функциональную роль во взаимоотношениях трансплантата с окружением выполняет лейкоцит.

HLA-система относится к главному комплексу гистосовместимости (ГКГС). Главный комплекс гистосовместимости расположен в хромосоме 17-й мыши, у человека в 6-й хромосоме. HLA - комплекс обеспечивает генетический контроль иммунного ответа и взаимодействие клеточных элементов, обеспечивающих иммунный ответ. HLA включает регионы (локусы) A, B, C, D: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D.

В HLA различают два класса: MHC I и MHC II (Major histocompatibility complex):

- классу MHC I у человека относятся локусы A, B, C;
- классу MHC II - локусы: DK, DP, DC.

Класс I антигенов MHC - это серологически выявляемые антигены, класс II антигенов MHC выявляется в клеточных реакциях (смешанная культура лейкоцитов).

Установлены различия в генах разных индивидуумов так называемой аллели (*греч.* allelon - взаимно, т.е. вариантность, множественность). Для MHC характерно максимальное разнообразие аллелей из всех известных генов человека. Это биологически целесообразно, так как способствует выживаемости популяции в целом. Выживает лишь тот, кто обладает максимальным комплексом воспринимающих и отвечающих вариантов реакций. Варианты MHC закрепляются естественным отбором.

Продукты генов MHC I и MHC II - это мембранные белки, основной функцией которых служит распознавание и связывание с определенными фрагментами (пептидами) антигена, несущие специфическую информацию. Конкретный аллельный вариант MHC связывает только конкретный пептид, представленный АПК.

Антигены МНС отсутствуют на безъядерных зрелых эритроцитах

Один из важных участков генов гистосовместимости - **Ir-ген** (I - Immunity, r - response - ответ), определяющий качество и силу иммунного ответа (D/DR локус). Ir-ген сцеплен с МНС, действие его реализуется через представление фрагментов антигена Т-хелперам, т.е. тимусзависимый ответ. Возможен запуск иммунных реакций и через активацию Ir-гена МНС I В- и С-локусов в результате кооперации иммунокомпетентных клеток: «макрофаг + Т-хелпер» или «Т-хелпер + В-лимфоцит». Существуют Ir-гены, ответственные за переработку антигена. Установлена идентичность продуктов Ir-генов и молекул МНС II класса, что определяет экспрессию Ir-гена на всех антиген презентующих клетках. С Ir-геном ассоциируется регуляция иммунных реакций и их специфичность по отношению к антигену: низкий или высокий уровень ответа. При низком иммунном ответе наблюдается высокая восприимчивость к болезням, при высоком иммунном ответе - наоборот, устойчивость к антигенам. Например, высокий уровень иммунного ответа на стрептококк обусловлен активностью HLA В8-гена, низкий иммунного ответа на столбнячный антиген - HLA-A24, В 32, DЯ2.

Таким образом, МНС комплекс характеризует иммунологическую реакцию на антиген, что определяет роль HLA-системы в поддержании резистентности организма. В связи с этим возможно планирование иммунологической реакции, которая будет ассоциирована с определенным локусом HLA-системы.

В табл.7 дана характеристика свойств генов МНС I и II классов.

**табл. 7 Характеристика свойств мембранных белков МНС
I и МНС II классов**

Класс МНС	Клетки, несущие МНС белки	Зона связывания МНС на клетке	Распо- знающий Т-лимфоцит	Определение защиты от инфекций
МНС I	Все ядросодержащие клетки максимально на лейкоцитах и лимфоцитах	Цитозоль, сообщающийся с ядром, эндоплазматический ретикулум	CD8+	Вирусные, Внутри клеточные, Бактериальн ые
МНС II	Дендритные клетки, В- лимфоциты, моноциты макрофаг, эндотелий сосудов	Внешний, внеклеточный аппарат, экзоплазматический ретикулум, лизосома, фагосома, эндосома	CD4+; CD4+ Txl, синтези рующие ИЛ-2	Внеклеточны е

В связи с изложенным, иммунный статус человека можно охарактеризовать как результат активности генов, кодирующих клеточные и гуморальные факторы иммунного ответа, определяющих однотипную по силе иммунную реакцию на большинство антигенов.

Кроме системы МНС, у человека существует семейство генов, кодирующих мембранные белки, по структуре похожие на белки МНС I. Это молекулы CD1, характеризующиеся антигенсвязывающей областью с рядом антигенов микроорганизмов (микобактерии и др.). Разные варианты CD1 экспрессированы на разных эпителиальных клетках (дендритные, кортикальные лимфоциты, В-лимфоциты, эпителиальные клетки и др.).

Таким образом, в организме человека имеются естественные генетически детерминированные маркеры иммунного статуса, по которым можно тестировать и прогнозировать реактивность

организма. Антигены гистосовместимости являются составными частями клеточных мембран. МНС I присутствует на внутриклеточных мембранах, МНС II - на внешних структурах мембраны. Химическая структура молекул гистосовместимости - гликопротеиды. Основные источники молекул МНС - лейкоциты и лимфоциты. Основная и стабильная функция этих клеток - способность синтезировать антигены МНС-комплекса. Основное значение системы МНС - контроль иммунного ответа, его силы и характера. Биологическая целесообразность формирования системы МНС - контроль постоянства антигенного гомеостаза, удаление преимущественно измененных «своих» клеток, а затем в процессе эволюции приобретение способности участвовать в уничтожении генетически чужеродных веществ.

Знание механизмов контроля деятельности иммунного ответа важно не только для понимания характера формирования патологии, направленности специфического иммунного ответа, но и для коррекции терапевтических мероприятий.

ГЛАВА II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Иммунорегуляторные В-лимфоциты

Регуляторные клетки играют важную роль в поддержании иммунологического гомеостаза. Установлено, что многие реакции гуморального и клеточного иммунитета регулируются субпопуляциями Т-клеток и макрофагов. В настоящее время подробно изучена их свойства, механизм действия и значение при патологических процессах.

Вместе с тем, получены данные о том, что и В-клетки, помимо синтеза антител, выполняют важных иммунологических функций. Они могут «представлять» антиген, синтезировать интерлейкин-1 (37,91). В-стимулирующий фактор – 1 или интерлейкин -4 (39,63), некоторые лимфокины обладают способностью распознавать аллоантигены (10,64).

В – клетки супрессоры

Способность В-клеток подавлять гуморальный иммунный ответ впервые показана Р.В.Петровым, Р.М.Хаитовым с сотрудниками. В дальнейшем основное внимание этой группы исследователей было сосредоточено на В-супрессорах костно-мозгового происхождения и результаты исследований обобщены в нескольких обзорах (22, 23,27,28, 50).

Исследование распределения В-регуляторных клеток в лимфоидных тканях интактных животных показало, что они содержатся преимущественно в костном мозгу, В основе регуляции антителогенеза лежит угнетение клетками – супрессорами костного мозга пролиферации клеток – мишеней, причем мишенями супрессии являются все лимфоциты, делящиеся в результате антигенной или митогенной активации, включая Т- и В-лимфоциты селезенки и лимфатических узлов. В-лимфоциты костного мозга, предшественники антителообразующих клеток (АОК), стволовые кроветворные клетки, а также антителопродуцирующие гибридомы и миеломные клетки (16,28,38,103).

Важную роль В-супрессоры костного мозга играют при старении и при различных патологических состояниях. При старении понижение иммунореактивности совпадают с повышением функции В-супрессоров. Кроме того, повышение функции В-супрессоров наблюдается также при злокачественных заболеваниях. Что касается аутоиммунных процессов, то у мышей линии NZB/NZW и MRL/MpJ – 1рg – 1рg/1рg (MRL/) выявлена сложная кинетика В-супрессоров в костном мозге и селезенке (28), значение которой пока не вполне понятно. С помощью разработанной модели оценки В-супрессоров костного мозга человека (28), показано, что при циррозах печени алкогольной или вирусной природы функциональная активность костномозговых В-супрессоров снижается (15).

Таким образом, биологическое значение костномозговых В-супрессоров неспецифически угнетающих антителогенез при прямом контакте с антиген или митогенстимулированными клетками мишенями, заключается, очевидно, в том, чтобы блокировать иммуногенез в костном мозгу.

Обнаружено, что В-супрессоры не только предшествуют, но их можно индуцировать различными воздействиями: липополисахаридом грамотрицательных бактерий (3,12), пневмококковый полисахаридом III типа (37), динитрофенолом в комплексе с человеческим гамма – глобулином (82), *Candida albicans* (87,93), конканавалином А (59,74), фитогемагглютинином (50), иммунными комплексами (62).

Калинкович А.Г. и соавт. (12) показали, что введение мышам субоптимальной дозы – $5 \cdot 10^7$ эритроцитов барана приводит к образованию в селезенке только В-супрессоров, названных авторами антигениндуцированными В-супрессорами (АИВс). Кинетические исследования АИВс показали, что они появляются в селезенке через 7 дней и сохраняются по меньшей мере до 21 дня (3). Процесс формирования АИВс чувствителен к цитостатикам: метотрексату, 5-фторурацилу, цитозин арабинозиду, винбластину: из этих данных следует, что индукция В-супрессоров нуждаются в

активной пролиферации их предшественников. В этих опытах выявлена высокая чувствительность предшественников АИВс к низким дозам циклофосамида. Индукция этого типа В-супрессоров, вероятно, зависит от метаболизма простагландинов, так как введение их ингибиторов ацетилсалициловой кислоты и индометацина приводит к отмене их формирования (1,2). Попытки определить фенотип В-супрессоров у мышей дали следующие результаты: при иммунизации супраоптимальными дозами эритроцитов барана супрессорами были Ig^+ , FcR^+ , $Thy\ 1,2^-$, $Lyt1^+$ и $Lyt2^-$ клетки, супрессорные клетки индуцированные субоптимальной дозой ЭБ являются $Thy\ 1,2^-$, Ig^+ , FcR^+ и FcR^- - клетками, они имеют следующую лектинную специфичность: PNA^- , SBA^- , HPA^- , WGA^+ , Кон A^+ , а также являются мелкими, медленнооседающими в поле тяжести Ig В-клетками (12,17). Исследование эффектов В-супрессоров в зависимости от наличия на их поверхности Fc рецептора для IgG показало, что FcR^- γ иммунные В-клетки обладают способностью индуцировать Т-супрессоры и действие их антигенспецифично и H-2 рестриктировано. Напротив, $Fc\gamma R^+$ иммунные В-клетки не обладают способностью индуцировать Т-супрессоры. Очевидно, поэтому, их супрессорное действие является антигеннеспецифичными и H-2 нерестриктированным (12).

Исследование влияния Т-активина и В-активина на проявление АИВс своей супрессорной активности показало, что реализуемый ими эффект не зависит от регуляторной активности В-активина, но чувствителен к воздействию Т-активина (6,7).

Механизм действия АИВс, вероятно, связан с угнетением пролиферации предшественников как иммунорегуляторных клеток (В – клеток памяти и Т-хелперов), так и предшественников антителообразования (АОК) (12). Показано, что $FcR^+\gamma$ В – клетки селезенки при взаимодействии с иммунными комплексами выделяют супрессорный фактор (SBF). Действие этого фактора антигеннеспецифично, но H-2 рестриктировано, а его мишенями являются FcR^- В-клетки SBF действует на ранние стадии В-

клеточной активации, ингибируя переход из G_0 в G_1 фазу клеточного цикла (25,27). Помимо гуморального иммунитета, В-клетки могут подавлять реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Таким образом, краткий анализ, представленных в этом разделе обзора данных литературы, позволяет считать, что факт существования особой иммунорегуляторной популяции клеток В-клеток, по видимому, является доказанным. Эти клетки предшествуют в костном мозге, селезенке и лимфатических узлах интактных животных и костном мозге людей. Значение этих клеток, вероятно, сводится к ограничению избыточной пролиферации клеток мишеней. Однако В-супрессоры возникают и при индукции различных типов иммунных реакций. Они могут подавлять иммунный ответ с помощью выработки цитокинов, простагландинов, формирования гидроксильных радикалов, а мишенями их действия могут быть различные популяции иммунокомпетентных клеток. Появившиеся в последнее время данные о дисбалансе костномозговых супрессоров (12) и возможности индукции В-супрессоров среди лимфоцитов периферической крови у людей (56), с одной стороны, переводит проблему В-супрессии из чисто экспериментальных разработок в область практической медицины и, с другой, подчеркивает необходимость их дальнейшего изучения.

2.2. Иммунорегуляторные эффекты липополисахарида

Липополисахариды (ЛПС), составляющие общий компонент наружных мембран грамотрицательных микроорганизмов, широко распространены в природе и отличаются широчайшим спектром биологической активности. Биологические эффекты ЛПС распространяются на различные системы и ткани организма, в том числе и на иммунную. ЛПС, как известно относится к сильнейшим природным иммуномодуляторам и может функционировать как В-клеточный матоген и поликлональный активатор, как иммуноген и толероген, как адъювант и как супрессор иммунологических

процессов. Настоящий обзор рассматривает вопросы, относящиеся к иммуномодулирующему действию ЛПС, выявляемому на уровне пролиферации лимфоидных клеток и секреции и синтеза иммунистел.

Пролиферативные реакции на ЛПС. Первое свидетельство митогенной активности ЛПС (эндотоксинов) было представлено исследованиях Takano T., Mizuno D. *in vivo* изучавших включение в нуклеиновые кислоты селезенки между 24 и 48 часами после внутрибрюшинного введения мыши эндотоксинов и показавших повышение синтеза ДНК и РНК и скорости деления лимфоцитов.

Эти результаты несколько позднее были подтверждены экспериментами *in vivo* в которых спленоциты различных линий мышей реагировали на обработку эндотоксином бластообразованием и повышением синтеза ДНК.

С тех пор получена огромная информация по митотическому действию эндотоксинов и их очищенных препаратов (ЛПС) на лимфоидные клетки (96). При этом одним из главных направлений явилось определение популяций, отвечающих делением на ЛПС. Оказалось, что в пролиферативный ответ на ЛПС вовлекаются В-лимфоциты мышей, это положение доказано и в отношении В-клеток других видов животных. Это было подтверждено, хотя и не сразу и в отношении человеческих лимфоцитов. Обобщение экспериментальных данных, несмотря на их вариабельность, привело иммунологов к общему заключению, что пролиферативный ответ на эндотоксины, ЛПС и липид А является универсальным свойством В-клеточной популяции (62).

В общем виде доказательства могут быть суммированы следующим образом:

1. Селезеночные клетки от летально облученных тимэктопированных мышей, восстановленных костным мозгом, сохраняли способность пролиферировать в ответ на эндотоксин при полной отмене ответа на Т-клеточные активаторы;

2. Обработка нормальных селезеночных клеток антисывороткой с комплементом не оказывала влияния на пролиферацию их в ответ

на эндотоксин;

3. Способность эндотоксина индуцировать пролиферацию селезеночных клеток у конгенитально атимических мышей (nu/nu) исключала потенциальную возможность вклада остаточных Т-лимфоцитов в пролиферативных ответах на ЛПС.

В последующем эти наблюдения были подтверждены в многочисленных исследованиях, показавших, что пролиферация мышинных спленоцитов под влиянием эндотоксинов и ЛПС ограничена субпопуляцией В-лимфоцитов.

Пролиферативные ответы В-клеток на ЛПС характеризуется четкой зависимостью "доза-эффект", выявляемой *in vitro*. Однако высокие дозы ЛПС могут приводить к подавлению митотической реакции.

Поликлональная активация В-лимфоцитов на ЛПС. Пролиферативный ответ В-клеток на ЛПС, как правило сопровождается и дифференцированным ответом, выражающийся в секреции иммуноглобулинов различной специфичности.

Экспериментами было установлено важное обстоятельство - В-клетки, в норме отвечающие на антиген, входят в состав популяции В-клеток, которые отвечают на эндотоксин в отсутствие антигена. ЛПС индуцирует покоящиеся В-клетки к пролиферации и секреции антител, однако это не означает, что все активированные В-клетки и пролиферируют и секретируют антитела.

Кинетика пролиферативного ответа селезеночных клеток мышей, стимулированных ЛПС, изучена довольно хорошо *in vitro* и в меньшей степени *in vivo*.

Так, известно, что уже через 24 часа после стимуляции липополисахаридом 30-50% В-клеток превращаются в лимфобласты (12), которые активно синтезируют ДНК (104). Электронномикроскопические исследования показали, что бластогенная реакция сопровождается созреванием типичных плазматических клеток. Синтез ДНК выявляется *in vitro* через 14-18 часов после стимуляции ЛПС с максимумом к 50-60 час (106).

В экспериментах *in vitro* также установлено, что введение ЛПС

вызывает резкое повышение синтеза ДНК в селезенке в течение последующих 2 суток. Пролиферативная реакция селезенки сопровождается быстрым нарастанием «фоновых» антителообразующих клеток (АОК), достигающих на пике ответа (2-5 день) 3% от всех ядросодержащих клеток селезенки. Эти признаки деления и созревания В-клеток, отвечающих на ЛПС свидетельствуют о том, что большинство В-клеток превращаются в АОК в результате предшествующего синтеза ДНК.

В-клетки, вовлекаемые в ответ на ЛПС чрезвычайно разнообразны в отношении их пролиферативного потенциала. Детальной разработке этого вопроса показало, что существует по крайней мере 3 типа пролиферативных ответов В-клеток на ЛПС *in vitro*.

1. 19-37% В-клеток после первого деления входит в рециклинг, не требующий присутствия ЛПС.

2. 10-17% клеток совершает повторный цикл только в присутствии патогена.

3. 54-64% (то есть большинство В-клеток) производят дочерние клетки, не вступающие в следующий цикл даже в присутствии ЛПС.

Эти результаты свидетельствуют о гетерогенности В-клеточной популяции, отвечающей на ЛПС и соответствуют наблюдениям о различной пролиферативном «поведении» В-клеток, различающихся по поверхностным антигенам.

Гетерогенность В - клеточных популяций, отвечающих на ЛПС. Около 1/3 тотальной популяции В-лимфоцитов может отвечать на ЛПС. Взаимодействие этих клеток с ЛПС может приводить к различным ответам.

Взаимодействие ЛПС с Т-клетками. Способность ЛПС модулировать множество иммунологических реакций взаимодействовать не только с В-клетками, но с клетками других типов: макрофагами, фибробластами, полиморфоядерными лейкоцитами, кровяными пластинками (36), стимулирует исследователей к поиску доказательств прямого действия ЛПС на

Т-клетки. ЛПС оказывает влияние на пролиферацию Т-лимфоцитов при их стимуляции Т-клеточными активаторами. ЛПС может повышать их ответ человеческих лимфоцитов на Кон А и ФГА. Повышение синтеза ДНК наблюдали при внесении эндотоксина в культуру до или одновременно с Кон А. Подобный стимулирующий эффект эндотоксина воспроизводился также на тимоцитах мышей СЗН/Не¹, не отвечающих на ЛПС. Эти данные соответствуют точке зрения, что ЛПС каким-то образом способны реагировать с мембраной Т-клеток и «стабилизировать» ее в процессе взаимодействия с Кон А, приводя к «пусковому» сигналу.

Т-лимфоциты необходимы и в В-клеточных ответах на ЛПС, участия Т-клеток в ответа на эндотоксин: Т-клетки предварительно активированные декстраном *in vitro* усиливали пролиферативный ответ на ЛПС. Лимфоциты от бестимусных мышей *nu/nu* этот эффект утрачивали. Хорошо известно, что ЛПС не является митогеном для В-клеток периферической крови человека (66). Тем не менее ответ таких клеток на митогены может быть получен в присутствии радиорезистентной Т-клеточной популяции. Пролиферация В-клеток периферической крови человека в ответ на ЛПС может быть индуцирована в присутствии Т-хелперов (67).

С расширением исследований эффектов поликлональных активаторов было установлено, что эндотоксины могут вызывать созревание не только В-лимфоцитов, но и пре-Т-клеток. Так, продемонстрирована способность ЛПС вызывать экспрессию Tgy-1 и TL антигенов в культуре пре-Т-клеток, выделенных с помощью метода центрифугирования в градиенте альбумина. Эта активация воспроизводилась и с помощью липида А, что указывал на одинаковые условия активаций Т-клеток и активации В-клеток. Предположение о усилении созревания тимоцитов под влиянием ЛПС нашло подтверждение и в экспериментах *in vivo* (71). В этих работах мышам вводили ЛПС и через 4 дня исследовали их ответ на Т-клеточные стимуляторы: Кон А и ФГА.

Таким образом, в то время как существуют экспериментальные подтверждения о взаимодействии ЛПС и с пре-Т-, и с Т-клетками,

все же следует признать, что эффекты таких взаимодействий выражены значительно менее глубоко в сравнении с В-клеточными взаимодействиями с эндотоксинами.

ЛПС как иммуномодулятор. Известно, что эндотоксины могут изменять гуморальные ответы на антиген от незначительного повышения до полной их отмены, а также модулировать состояние толерантности: предупреждать и снимать это состояние (78).

После классифических экспериментов Morrison D.C., и сотрудников (78,80), обнаруживших адьювантный эффект эндотоксинов в ответах кроликов на белковые антигены, была установлена двойственная природа действия этих природных соединений в зависимости от времени их введения по отношению к антигену (79,81).

В общем виде эта зависимость состоит в том, что когда антиген введен вместе с ЛПС или в течение нескольких часов после ЛПС, то наблюдается повышение синтеза специфически антител, определяемое в течение 4-7 и более дней после этого. Введение антигена через 1-2 дня после ЛПС приводит к глубокому подавлению синтеза антител (73,85).

Ценной моделью для исследования моделирующего действия ЛПС являются ответы на антигены, представляющие собой конъюгаты гаптенa с различными носителями. Такие ответы также чувствительны к действию ЛПС. Так, добавление ЛПС к субоптимальным концентрациям гаптен-ЛПС *in vitro* повышает ответ к гаптenu. Однако предварительная обработка мышей ничтожными количествами ЛПС приводит к супрессии ответа их *in vitro*. Эта супрессия воспроизводилась и на мышaх *pu pu* и следовательно не зависела от Т-клеток.

Интересно отметить, что степень адьювантного эффекта ЛПС повышается при использовании субоптимальных доз антигена. Адьювантный эффект ЛПС зависит и от природы носителя. Так по данным Makela с соавт (73,95) гаптены, конъюгированные с полисахаридами (Т-независимые антигены) дают ответы, резко стимулируемые ЛПС (в 30-40 раз). В то же время отмечается

слабый адьювантный эффект ЛПС в отношении ответов на гаптены, связанные с белковым носителем (Т-зависимые антигены).

Адьювантный эффект ЛПС в отсутствие Т-клеток. Известно, что большинство антигенов относится к тимусзависимым, поскольку при их индукции требуется Т-хелперные клетки. ЛПС в определенных условиях может замещать Т-помощь и превращать Т-зависимые ответы в Т-независимые.

Установлено, например, что тимэктомированные летально облученные мыши, восстановленные костным мозгом приобретают способность отвечать на ЭБ, если последние конъюгированы с ЛПС. В присутствии ЛПС ответ на эритроциты барана воспроизводится и у бестимусных мышей. Способность ЛПС замещать Т-хелперы обнаруживается в различных системах *in vitro* и *in vivo* при использовании растворимых антигенов (19,68). Показано также, что низкомолекулярные гаптены при использовании ЛПС в качестве носителя дают тимуснезависимые ответы (73). Это тестировано и на тимэктомированных облученных восстановленных костным мозгом реципиентах и на мышах *nu/nu*.

ЛПС и тимусзависимые ответы. В настоящее время накоплено множество данных, которые свидетельствуют о том, что эндотоксины способны модулировать специфические иммунные ответы на Т-зависимые антигены через взаимодействие с Т-клетками. На моделях функционального истощения Т-клеток мышей было показано, что ответ на белковые антигены может быть восстановлен с помощью ЛПС, но только в присутствии сингенных тимоцитов (102). С другой стороны, адьювантный эффект ЛПС может быть отменен с помощью анти- *Thy1*-антисыворотка, что свидетельствует о зависимости его от Т-клеток.

Интересно отметить, что в опытах одних и тех же клетках адьювантный эффект ЛПС может проявляться как Т-зависимый, и Т-независимый. Известно, что ЛПС может взаимодействовать с Т-клетками неспецифически, то есть независимо от антигена, что также приводит к стимулирующему или супрессивному эффекту. Эффект ЛПС часто определяется многими факторами, в том числе

и количественным отношением между Т- и В-клетками, а также макрофагами.

Клеточные основы иммуномодулирующего действия ЛПС

Вначале предполагали, что клеточной мишенью для адьювантного эффекта эндотоксинов являются В-клетки (81). Однако оказалось, что в системе сингенного переноса тимоциты, обработанные ЛПС *in vitro* способны повышать ответ реципиентов на ЭБ. За тем удалось показать, что в этой системе ЛПС действует первично через В-клетки (78). Далее было показано, что митогенная активность и адьювантный эффект ЛПС могут быть разобщены, хотя и наблюдается корреляция между ними, позже доказали, что повышение гуморального ответа над действием ЛПС может происходить и в отсутствии митогенного действия. То есть пролиферация, являясь существенным компонентом адьювантного действия ЛПС не является абсолютной необходимостью и, следовательно, действие ЛПС на В-клетки в определенных случаях является лишь отражением конечного результата, а не его объяснением. На самом же деле возможное участие супрессорных и хелперных популяций в реализации адьювантного действия ЛПС изучено весьма недостаточно.

С этих позиций супрессивный феномен охарактеризован значительно лучше, и в настоящее время убедительно показано, что супрессивное действие ЛПС при антиген-зависимых ответах опосредуется В-, Т-клетками и макрофагами.

Во-первых иммуносупрессивный эффект ЛПС может осуществляться активированными В-лимфоцитами. Супрессивное действие ЛПС при одновременном введении его с пневмококковым полисахаридом, наблюдаемое у нормальных мышей, не проявляется у мышей СЗН/Неј, В-клетки которых не чувствительные к ЛПС. Супрессия, однако, воспроизводилась у бестимусных мышей *nu/nu*. Эти данные доказывали, что наблюдаемая супрессия не зависела от наличия Т-клеток. Примечательно, что в этих условиях не было подавления В-клеток

памяти.

Селезеночные клетки от мышей, получивших ЛПС, могут подавлять ответ нормальных селезеночных клеток на ЭБ *in vitro*. При этом супрессорная популяция сохранялась при удалении анти-Thy-1⁺ клеток и макрофагов, и, следовательно, принадлежала к В-лимфоцитам. Далее, (84) удалось определить фенотип В-клеток, генерируемых при подавлении ответа ЛПС. В отношении поверхностных антигенов эти клетки характеризовались как Ig⁺, Ia⁺, CR⁺, Lyb2⁺, PCI⁺ и проявляли ингибиторные свойства в отсутствие Т-клеток и макрофагов. При поликлональной активации селезеночных клеток мышей образуется растворимый фактор, который угнетал гуморальный иммунный ответ *in vitro* (94).

Т-клетки-супрессоры также вовлекаются в иммунонодуляторные эффекты ЛПС, связанные с антиген-специфическими ответами. ЛПС резко подавляет вторичный ответ на растворимые белковые антигены *in vitro* при добавлении ЛПС на 12 часу от начала культивирования селезеночных клеток с антигеном. При этом удаление В-клеток, неспецифичных по отношению к антигену, не отменяло супрессии. Это обстоятельство привело авторов к заключению о том, что наблюдаемое подавление не связано с В-лимфоцитами, и, возможно, осуществляется за счет супрессорных Т-клеток. Селезеночные Т-клетки от обычных мышей подавляли ответ на ТНФ-ЛПС В-клеток, полученных от обычных и безмикробных животных. Т-клетки последних такой эффект утрачивали (98). Авторы заключили, что нормальная грамотрицательная флора кишечника индуцирует продукцию Т-клеток, которые регулируют В-клеточные ответы на эндотоксины. Это предположение нашло подтверждение в исследованиях. Обнаружена, что безмикробные мыши имеют более высокий уровень IgA в сравнении с обычными мышами пришли к выводу, что ЛПС бактерий, содержащихся в кишечнике, индуцирует лимфоидную ткань, связанную с кишечником (Пейеровы бляшки) к генерации Т-клеток-супрессоров (97,98).

Доказательство связи ЛПС микробов кишечника с развитием

супрессорных Т-клеток, индуцируемых при оральном введении мышам эритроцитов барана (ЭБ). В этих условиях у мышей формируется состояние толерантности к ЭБ. В то же время у мышей СЗН/Неj, не отвечающих на ЛПС, отвечаемость на ЭБ в подобных условиях сохраняется. Было показано, что эта толерантность зависит от присутствия супрессорных Т-клеток, генерируемых ЛПС у мышей, чувствительных к эндотоксину. Эти Т-клетки подавляли ответ примированных селезеночных клеток *in vitro*. Такие супрессорные клетки отсутствовали у мышей СЗН/Неj. Иммуносупрессивное действие ЛПС может осуществляться и за счет дефекта Т-хелперного звена иммунитета. У мышей, стимулированных ЛПС, резко снижалась активность Т-хелперов индуцируемая Кон А. (74). Авторы пришли к заключению, что после введения мышам ЛПС формируется дефект Т-хелперного сигнала, необходимого В-клеткам-предшественникам на пути дифференцировки их в направлении синтеза и секреции антител.

Участие макрофагов в регулирующих эффектах ЛПС в настоящее время не вызывает сомнений. Известно, что эндотоксины являются сильными активаторами этих клеток, включая индукцию медиаторов иммуносупрессии. Показано, например, что удаление макрофагов может резко повышать ответ селезеночных клеток, культивируемых с ЛПС и антигеном, включая антигены, зависимые и независимые от тимуса. Эффект этот воспроизводится на клетках мышей СЗН/Ш (реагирующих на ЛПС). При этом адьювантное действие ЛПС угнетали макрофаги отвечающей линии. Напротив макрофаги от мышей СЗН/Неj, не отвечающих на ЛПС, были неактивны. Эти результаты ясно показывают, что макрофаги могут оказывать негативное действие на иммуностимулирующий эффект ЛПС.

В то же время следует подчеркнуть, то участие макрофагов в синтезе антител включает два основных момента - представление антигена антиген-реактивным клеткам и секрецию фактора, активирующего лимфоциты (IL-I). В настоящее время считается доказанной способность ЛПС стимулировать высвобождение IL-I

из макрофагов, с чем связывают вспомогательную функцию макрофагов в адьювантной активности ЛПС. Так, установлена, то IL-1, высвобождаемый макрофагами, может замещать их в гуморальном ответе на антиген. Более того, показано, то В-клетки, стимулированные ЛПС, тоже могут продуцировать IL-1 (41). Известно, что IL-1 обладает множественными биологическими эффектами. IL-1 выполняет функцию почти универсального катализатора иммунной системы. В частности, IL-1 является индуктором IL-2, а также стимулирует экспрессию рецепторов к IL-2 на Т-клетках (41,57,91), что к активации Т-хелперного звена иммунной системы.

В культурах, стимулированных ЛПС, определяются не только интерлейкины, но и интерфероны γ и β , известные как ко-стимуляторы, взаимодействующие с различными медиаторами иммунных реакций (91). Недавно было показано, что ЛПС индуцирует не только продукцию интерферонов макрофагами и В-лимфоцитами, но и продукцию интерферона Т-клетками, который способен модулировать В-клеточные функции, не оказывая прямого действие на В-клетки. Следует отметить, что продукция интерферона зависима от IL-1 и от экспрессии рецепторов к IL-2, что указывают на сложные отношения между цитокинами и другими факторами и медиаторами иммунной системы. Так, ЛПС является очень слабым индуктором IL-2, но синергичен в этом отношении с IL-1. Возможно, с этим связан и тот факт, что ЛПС, сам по себе, не является митогеном для периферических лимфоцитов человека в культуре и, фактически неспособен стимулировать к пролиферации Т-клетки мышей, о чем говорилось выше (41,57,91).

Таким образом, иммуномодулирующее действие ЛПС в отношении гуморального иммунитета, вероятно, осуществляется с помощью прямых и не прямых взаимодействий его с различными субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов. Иммуностимулирующий эффект ЛПС очевидно вовлекает в действие различные факторы: усиление синтеза и продукции IL-1 макрофагами, IL-2 Т-клетками,

Т-хелперные факторы, повышение экспрессии рецепторов на Т-, В-клетках и макрофагах. В то же время под влиянием ЛПС может уменьшаться секреция и синтез растворимых иммунных супрессорных факторов и простагландинов, что также может результативаться в усилении иммунных реакции.

Глава III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материалы исследования

А. Животные

В работе использовали инбредных мышей линии СВА, C57BL и (CBA x C57 BL) E₁. Животных получали из питомника чистопородных лабораторных животных «Столбовая» АМН России. Эксперименты проводили на мышах обоего пола, 2-4 месячного возраста, массой 18-20 г.

Мыши линии MRL/MpJ-1pr/1pr (MRL/1) получены от E.D.Murphy Jackson Laboratory Bar-Harbor, Maine, USA.

Свежий кроличий комплемент получали от кроликов породы «Шиниила», массой 2,5-3,5 кг.

Б. Антигены и липополисахарид

Мышей, от которых получали лимфоидные клетки, иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ). Перед иммунизацией ЭБ 3-5 раза отмывали в растворе Хенкса центрифугированием при 300 g 10 мин. Приготовляли либо 0,5%, либо 2% суспензию и по 0,5 мл вводили внутрибрюшинно мышам.

Липополисахарид (ЛПС), выделенный из *Schigella sonnei* методом Вестфала, штамм 9090, серия 547, любезно предоставлен профессором В.И.Левенсоном (МНИИЭМ имени Г.И.Габричевского). В предварительных опытах показано, что максимальное число анти-ТНФ АОК давало однократное внутрибрюшинное введение 50 мкг ЛПС на мышь. Эта доза была использована во всех экспериментах.

В. Фармакологические и химические вещества, срезы, растворы

Цитозар («Upjohn» Бельгия)

Винбластин сульфат («Гедеон Рихтер», ВНР)

Митомицин С («Sigma» США)

Фикол («Pharmacia Fine Chemicals» Швеция)

ДЕАЕ целлюлеза («Serva» ФРГ)

Сахароза (Шосткинский завод химреактивов)
 Бычий сывороточный альбумин («Serva» ФРГ)
 Гепарин («Рихтер», ВНР)
 Декст ран («Merck» ФРГ)
 Азид натрия («Serva», ФРГ)
 Тринитробензенсульфоновая кислота («Serva», ФРГ)
 Глицин-глицин («Reanal», ВНР)
 Полиэтиленгликоль-6000 («Loba Chemile», Австрия)
 Агар («Difco», США)
 Лиофилизированный комплемент морской свинки (Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов НИИ вакцин и сывороток имени Мечникова И.И., г.Уфа).
 Эмбриональная телячья сыворотка (НИИИЭМ имени Н.Ф.Гамалеи АМН России, г.Москва)
 Интерлейкин-1 γ и интерлейкин-1 β (Институт особо чистых препаратов Минмедпром, г. Санкт-Петербург)
 Стандартные моноспецифических сыворотки против иммуноглобулинов человека (ЦНИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова, г.Москва)
 Меченный изотиоционатом флуоресцеина кроличий сыворотка против иммуноглобулинов мыши (НИИЭМ имени Н.Ф.Гамалеи АМН России, г.Москва)
 Среда 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АНН России, г.Москва)
 Среда Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН России, г.Москва)
 Раствор Хенкса (Московское предприятие по производству бактериальных препаратов МЗ России, г.Москва)
 Пластиковые чашки Петри диаметром 40 или 106 мм (Ленинградский завод медицинских полимеров)

3.2. Метода исследования

Получение суспензии клеток селезенки

Мышей забивали цервикальным смещением позвоночника.

Затем мышей вскрывали, извлекали селезенку помещали в бакпечатки с холодным раствором Хенкса pH-7,2, стоящими на льду. Суспензии клеток селезенки получали в стеклянном гомогенизаторе, фильтровали через капроновый фильтр, отмывали центрифугированием при 300g 10 мин и определяли жизнеспособность клеток.

Здесь и во всех других опытах жизнеспособность спленоцитов определяли в камере Горяева, в качестве красителя применяли смесь 0,1%-ный раствор трипанового синего и эозина на физиологическом растворе. Общее количество ядросодержащих клеток считали с помощью 3%-ного раствора уксусной кислоты. Число жизнеспособных клеток в суспензиях составляло 95-9%.

Определение прямых IgM- АОК

Число IgM-АОК в селезенке мышей определяли методом Ерне, в модификации (1). В предварительно подогретые пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм (без слоя подстилающего агара) вносили 25 мкл 30% суспензии ЭБ на растворе Хенкса, 10-20 мкл суспензии клеток селезенки (их концентрацию подбирали таким образом, чтобы число зон гемолиза в чаше было в пределах 50-200) и 500 мкл расплавленного при 46°C агара, доведенного до концентрации 0,7% раствором Хенкса pH-7,2-7,4; все компоненты тщательно перемешивали непосредственно в чашке; через 1,5 ч инкубации при 37°C чашку аккуратно настилали 500 мкл комплемента морской свинки в разведении 1:5-1:10 на растворе Хенкса; подсчет зон гемолиза проводили через 1 час после инкубации при 37°C.

Конъюгирование ЭБ с ТНФ и определение ТНФ-АОК

Конъюгацию ЭБ с ТНФ проводили по методу Rittenberg, Pratt с модификациями (12).

1) ЭБ (3-4 мл осадка) отмывали 2 раза в физиологическом растворе и в растворе Хенкса pH-7,0 в большом объеме (40-50 мл) центрифугированием при 830^G, по 7 мин;

2) готовили раствор тринитробензенсульфоновой кислоты (ТНБС): ТНБС (из расчета 10 мг на 1 мл осадка ЭБ) растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды, затем к этому раствору ТНБС доставляли 10 мл раствор Хенкса pH-7,0 и с помощью 7,5% раствора бикарбоната натрия доводили pH до 7,0-7,2;

3) к этому раствору по каплям добавляли 1 мл осадка ЭБ и смесь перемешивали 10 мин на магнитной мешалке в темноте, после чего ЭБ осаждали центрифугированием при 830^G в течение 7 мин;

4) за это время готовили раствор аминокислотного димера (глицин-глицин) : 10-20 мг глицин-глицина растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды и к раствору добавляли 30-40 мл среды 199 pH-7,2. Эту смесь добавляли к осадку ЭБ, модифицированные ТНБС, осторожно, тщательно перемешивали и осаждали центрифугированием при 830^G в течение 7 мин;

5) отмывали 3-5 раз в растворе Хенкса pH-7,0 центрифугированием при 830^G по 5 мин и готовили 30% суспензию на растворе Хенкса. ЭБ, модифицированные ТНБС использовали для определения количества анти-ТНФ АОК. При постановке реакции Ерне с ЭБ модифицирован ТНФ, параллельно определяли число АОК.

Определенна иммунных комплексов в крови

Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли по методу Ю.А.Гриневича, А.И.Алферова (9). Использовали пулы сывороток от 3 мышей на каждую точку. Метод основан на селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3.75% растворе полиэтиленгликоля с последующим фотометрическим определением плотности преципитата.

Для проведения реакции готовили два раствора.

Раствор №1: 0,1 М боратный буфер pH-6.4 (3,410 г борной кислоты и 4,275 г буры растворяли в дистиллированной воде и

доводят объем до 1 литра).

Раствор № 2 готовили путем растворения 10 г полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 в 240 мл раствора №1. Кровь забирали у мышей декапитацией и в день взятия или на 2-й день выделяли сыворотку для исследования. В пробирку вносили 0,3 мл сыворотки, добавляли 0,6 мл раствора №1, тщательно перемешивали и переносили по 0,3 мл в 2 пробирки. В одну из них приливали 2,7 мл раствора №1 (контроль), в другую - 2,7 мл раствора № 2 (опыт). Содержимое пробирки тщательно перемешивали и оставляли на 60 мин при комнатной температуре, после чего определяли оптическую плотность образцов на спектрофотометре в кюветах размером 1x1 см при 450 нм. Вычисляли разность показателей оптической плотности, результат умножали на 10 и полученный результат служил показателем количества иммунных комплексов в 1 мл сыворотки крови.

Определение пролиферативных показателей клеток селезенки

Из суспензий селезеночных клеток, тестируемых на анти-ТНФ АОК. готовили мазки, фиксировали их в метаноле и окрашивали по Романовскому-Гимзе. В мазках подсчитывали митотический индекс (МИ), выражая его в промилях по отношению к количеству интерфазных ядер. Из подсчета клеточных элементов исключали ретикулярные клетки и моноциты. Митотические фигура учитывали на стадиях метафазы, анафазы и телофазы. Контрольные мыши ЛПС не получали. Поскольку уровень митозов у нормальных интактных мышей низок (0,5-1%), мы провели параллельный эксперимент, в котором использовали свойства винбластина задерживать клетки в метафазе и тем самым накапливать митозы. Для этого мышам, получившим ЛПС, вводили винбластин за 6 часов до забоя. МИ в этой серии обозначали как винбластинный индекс (ВИ). Контролем служили мыши, получившие винбластин, но не получившие ЛПС. При определении митотических показателей использовали 4-3 животных на каждом

сроке, просчитывая не менее 6000 клеток на мазок.

Получение не прилипающих к пластиковой поверхности клеток

Для получения прилипающих и не прилипающих к пластику клеток, готовили суспензию спленоцитов (8 мл клеток с концентрацией 10^6 /мл) на среде Игла с 3% инактивированной нагреванием ЭТС. Суспензию наносили на пластиковые чащи Петри диаметром 100 мм, инкубировали 1 ч при 37°C в CO₂ инкубаторе (Flow Labor) в атмосфере содержащей 5% CO₂. Не прилипающие клетки собирала путей промывания чашки раствором Хенкса. В цитохимической реакции на неспецифическую эстеразу примесь макрофагов составляла 3-5%. После 2-кратной сорбции эта примесь не превышала 3%.

Получение полуляции спленоцитов, обогащенной В-клетками

Применяли двухэтапную цитотоксическую реакцию: не прилипающие к пластиковой поверхности клетки селезенки инкубировали в водяной бане 30 мин при 37°C моноклональными анти-Thy1,2-антителами (при использовании моноклональных анти-Thy 1,2 антител этот этап проводили при 4°C) в среде Игла с периодическим перемешиванием суспензий. После инкубации клеток отмывали, их затем 30 мин инкубировали при 37°C с кроличьим комплементом, периодически перемешивая суспензию. Оба этапа проводили в объеме 10 мл среди Игла. От нежизнеспособных клеток освобождались центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина с 1% азидом натрия методом Davidson, Parish.

Получение и характеристика специфичности антисывороток и антител против Т-и В-клеток

А. Получение асцита, содержащего анти-Thy 1.2-антитела

Для получения анти-Thy 1,2 асцита мышей AKR 8-кратно с 7-

дневным интервалом внутрибрюшинно иммунизировали тимоцитами ($25 \cdot 50 \cdot 10^6$ на мышь) мышей СВА. Через 1 день после последней иммунизации мышам АКР вводили внутрибрюшинно 0,1-0,2 мл асцита беспородных мышей, с перевиваемой карциномой Эрлиха. Через 8-10 дней у мышей АКР собирали асцит, центрифугировали его 30 мин при $13300G$, супернатант инактивировали нагреванием 30 мин при $56^\circ C$, сорбировали эритроцитами и клетками костного мозга мышей (СВА х $C57B^1$) F_1 на холоду в течение 60 мин из расчета 1 мл асцита: на $2 \cdot 10^8$ клеток. После тестирования в цитотоксической реакции определяли минимальное разведение асцита, при котором он вызывал гибель 98-99% тимоцитов, 35-40% спленоцитов и 5% клеток костного мозга мышей СВА и (СВАх $C57B^1$) F_1 . Это разведение использовали в качестве рабочего. Асцит хранили до использования при $-70^\circ C$.

Обработка спленоцитов антисыворотками против Т-клеток и против В-клеток

Для этого применяли выше описанную двухэтапную цитотоксическую реакцию. Не прилипающие к пластиковой поверхности клеток селезенки и обработанные анти-Thy 1,2 антисывороткой клетки инкубировали либо с анти-Т-антисывороткой (АТС), либо с анти-В-сывороткой (АВС) и кроличьим комплементом.

АТС и АВС были получены совместно с сотрудниками лаборатории иммунологии МНИИЭМ имени Г.И.Габричевского (зав.проф. Н.А.Краскина).

Принципы получения сывороток заключаются в следующем; в качестве иммунизирующего материала при получении АТС использовали тимоциты мышей, при получении АВС-клетки селезенки В-мышей (т.е, клетки селезенки тимэктомированных мышей через 10-12 дней после детального облучения и трансплантации им $5 \cdot 10^6$ клеток сингенного костного мозга). Кроликам проводили 3 инъекции по $5 \cdot 10^8$ клеток на каждую инъекцию. Интервал между 1-й и 2-й инъекцией составлял 7 дней,

между 2-ой и 3-й 14 дней. Сыворотку крови, взятого на 5-7 дней после последней инъекции, инактивировали прогреванием при 56°C в течение 30 мин и подвергали адсорбции эритроцитами мыши до исчезновения гемагглютининов в реакции гемагглютинации. Для специфической адсорбции АТС использовали клетки селезенки В-мышей, добавляя их из расчета $3,10^8$ клеток на 1 мл сыворотки. Смесь инкубировали 60 мин при комнатной температуре и отделяли клетки центрифугированием. Эту процедуру повторяли 2-3 раза до исчезновения антител к клеткам костного мозга и к АОК. Для специфической адсорбции АВС использовали гомогенат головного мозга мышей (0,1 мл гомогената на 1 мл сыворотки). Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре, осадок уделяли центрифугированием. Эту процедуру повторяли 2-3 раза до полного исчезновения антител к тимоцитам в цитотоксическом тесте.

Характеристики АТС и АВС. По нашим данным процент клеток, чувствительных к действию АТС в селезенке, составляет в среднем 40%, в лимфатических узлах - 63%, среди лимфоцитов периферической крови 54%.

Для АВС эти показатели составляли; для тимоцитов - 0; для клеток костного мозга - 39%; для селезенки - 71%; для лимфатических узлов - 42%; для клеток периферической крови - 44%.

Готовые препараты (в виде сывороток) подвергали стерилизующей фильтрации и разливали по ампулам. Срок годности АТС и АВС - 1 год. АТС и АВС мы хранили при -70°C. Рабочее разведение при ЦТР 1:16 для обеих сывороток.

Обработка спленоцитов анти-1а антителами

Обработку не прилипающих к пластиковой поверхности клеток селезенки, предварительно обогащенных В-клетками в ЦТР с помощью анти- Thy 1,2 антителами, проводили анти-1а антителами (рабочее разведение 1:10 – 1:20) в водяной бане при 37°C 30 мин (периодически встряхивали). Анти-1-А^К антитела любезно предоставлены М.Б.Зайцевой (Институт иммунологии МЗ России).

Обработка спленоцитов моноклональными анти-Thy 1.2. анти-Lyt 1.1 и анти- Lyt 2 антителами

Обработку не прилипающих к пластиковой поверхности клеток селезенки, предварительно обогащенных В-клетками в ЦТР с помощью моноклональных анти-Thy 1,2 антител, проводили с использованием моноклональных авти-Lyt 1,1, либо анти- Lyt 2 антител в водяной бане при 37°C 30 мин в присутствии кроличьего комплемента.

Использовали также моноклональные анти- Thy1,2 антитела (гибридома G4, IGM, H); контакт клеток с ниш (конечное разведение 1:500 - 1:1000) проводили на холоду в течение 30 мин.

Моноклональные анти- Lyt1.1 антитела (гибридома 11-86.2.1; конечное разведени 1:4 - 1:8).

Моноклональные анти- Lyt 2 антитела (гибридома H 35-17.2; конечное разведение 1:10). Эти сыворотки любезно предоставлены С.И.Соболь (Институт иммунологии МЗ России).

Получение свежего кроличьего комплемента

Кровь собирали из ушной вены кролика. Далее все манипуляции проводили на холоду при 4°C. Для образования тромба сыворотку инкубировали 1 час, затем центрифугировали при 1300^G в течение 15 мин. Полученную сыворотку сорбировали спленоцитами мышей СВА или (СВА х С57В¹)^{F₁} в соотношений 2.10⁸ клеток на 1 мл сыворотки. Сорбцию проводили в течение 1 часа при периодическом перемешивании суспензии. После окончания сорбции суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 300^{oG}.

Сорбированный комплемент тестировали на токсичность:

а) в каждую из четырех пробирок приливали 0,8 мл среды 199, 0,1 мл спленоцитов (10⁷ клеток/мл), 0,1 мл комплемента (разведение комплемента 1:2, 1:5, 1:10 или 1:15);

б) инкубировали 80 мин при 37°C;

в) оценивали жизнеспособность спленоцитов

Для работы использовали разведение кроличьей сыворотки, при которой жизнеспособность спленоцитов составляла 90% и

больше. Комплемент хранили до использования при -70°C в течение 3-4 недель.

Определение степени чистоты популяции спленоцитов, обогащенной В-клетками

Чистоту полученной популяций тестировали методом прямой иммунофлуоресценции, используя меченную изотиоционатом флуоресцеина кроличью сыворотку против иммуноглобулинов мыши. Для этого готовили суспензию спленоцитов (10^7 клеток/мл) в физиологическом растворе NaCl забуференный 0,1М фосфатами до pH 7,0-7,2 (ЗФР) с 0,1% азидом натрия; добавляли меченой кроличью сыворотку в разведении 1:8 в соотношении 0,5 мл клеток на 0,5 мл сыворотки; проводили инкубацию в течение 30 мин при 4°C (при периодическом перемешивании встряхиванием). После окончания реакции, клетки трижды омывали в избытке ЗФР. Далее исследование проводили с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮАММ-2. Определяли процент светящихся клеток. В популяции спленоцитов, обогащенных В-клетками, эта величина составляла 95-98%.

Разделение обогащенных В-клеток в поле тяжести 1g

Разделение иммунных В-клеток по размеру осуществляли седиментацией в поле тяжести 1g на установке «Стапут». Сущность метода сводится к тому, что клеточная суспензия наслаивается на градиент плотности и клетки, свободно оседая в этом градиенте под воздействием силы тяжести 1g, проходят различные расстояния по высоте рабочей камеры. Эксперименты проводили совместно с сотрудницей Института иммунологии МЗ России, Копыловой В.А.

Седиментационная камера представляет собой цилиндрический сосуд с внутренним диаметром 110 мм с коническим входом вниз и выходом вверх. Высота цилиндрической части составляет 80 мм. В ней формировали линейный градиент плотности 1-2% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) на растворе Хенкса pH-7,2. На градиент наслаивали разделяемые иммунные В-клетки в

концентрации 10×10^6 мл в растворе Хенкса pH-7,2 с добавлением 0,08% БСА, 0,08% декстрана с молекулярной массой 300000 и 13 ед/мл гепарина. Для снижения опасности появления «струйного эффекта» между слоями клетки и началом линейного градиента формировали сглаженный переход. Все манипуляции с клетками, включая их введение в камеру тонким слоем, седиментацию и фракционирование проводили при 4°C .

По окончании разделения, занимавшего около 4-5 ч, градиент с разделившимися в нем слоями клеток (в нижней части концентрировались клетки максимального диаметра, в верхней - минимального) вытесняли через верхний конус при подаче снизу в камеру плотного вытесняющего 8% раствора сахарозы. С помощью коллектора фракций «ЛКВ» разделяли выходящую суспензию на фракции по 8 мл. В каждой фракции определяли концентрацию клеток по результатам подсчета строили седиментационный профиль. Скорость седиментации рассчитывали, исходя из времени прохождения клетками конических переходов и времени нахождения их в цилиндрической части камеры, а также из известного смещения клеток относительно исходного положения. На основании полученной скорости седиментации размер клетки определяли по эмпирической формуле;

$$\alpha = 4 \sqrt{S}$$

где α - диаметр клетки (в мм); S - скорость седиментации (в мм/ч).

Исходя из седиментационного профиля, мы объединяли полученные 13 фракций в 3 группы: А - медленноседиментирующие клетки; В - быстроседиментирующие клетки и Б - клетки с промежуточной скоростью седиментации. Полученные указанным способом клетки вводили реципиентам (см. ниже).

Получение человеческого IgG

Исходным материалом для выделения IgG служила сыворотка

крови человека. Глобулярную фракцию получали трехкратным осаждением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (при 33% насыщений). Осадок отделяли центрифугированием (20 мин, 3300^г) и растворяли в половинном по отношению к предыдущему объему количестве дистиллированной воде. После последнего центрифугирования осадок растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и ставили на диализ против физиологического раствора, затем против 0,02М фосфатного буфера pH-8,0 (смену растворов, против которых вели диализ, производили трижды через 12 час). После диализа определяли концентрацию белка биуретовым реактивом. Концентрация белка, наносимого на колонку, составляла 20мг/мл.

Человеческий IgG получали методом ионообменной хроматографии. Использовали колонки фирмы «IKB». Колонку наполняли уравновешенной 0,02 М фосфатным буфером pH-8,0 суспензией ДЕАЕ целлюлозы. Общий объем плотно упакованной целлюлозы и размера колонки выбирали из расчета 50 мл целлюлозы на 1 г белка. Выход белка регистрировали при помощи спектрофотометра (комплект для ионообменной хроматографии фирмы «ISCO» (США), при длине волны 280 нм).

Для определения степени чистоты выделенной фракции иммуноглобулина использовали метод иммуноэлектрофореза. Иммуноэлектрофорез проводили на стеклянных пластинах (84 x 94 мм) в слое 1% агара толщиной 1 мм в 0,06 М веронал-медиаловом буфере pH-8,65 в течение 45 мин при напряжении 200 В и силе тока 14 мА на приборе «Multiphor» («IKB»). Для получения дуг precipitation использовали стандартные моноспецифические сыворотки против иммуноглобулинов человека. Стекла с пробами помещали во влажную камеру при 4°С на 24 часа. После этого агар отмывали от несвязавшихся компонентов и окрашивали раствором амидо-черного (амидо-черный 1 г, ледяная уксусная кислота - 100 мл, дистиллированная вода - до 1 л) в течение 10-15 мин. Чистоту выделенного иммуноглобулина оценивали по количеству линий в иммуноэлектрофорезе и их положению относительно старта.

Тепловая агрегация человеческого IgG

Человеческий IgG диализовали против ЗФР. Доводили концентрацию белка в растворе до 10-12 мг/мл. После этого раствор IgG инкубировали в водяной бане при 63°C в течение 13-18 минут до видимого помутнения раствора. Затем охлаждали на льду (течение 15 мин). Центрифугировали при 30000 G на ультрацентрифуге («Sorvall») в течение 1 часа. Осадок ресуспендировали в минимальном объеме ЗФР.

Фракционирование не прилипающих к пластиковой поверхности спленоцитов на Fc γ R⁺ и Fc γ R⁻ клетки

Фракционирование клеток на несущие и не несущие Fc - рецептор для IgG проводили на сорбенте с агрегированным человеческим IgG методом (12). На пластиковые чаши Петри диаметром 100 мм, предварительно обработанные ЗФР pH-7,2, наносили агрегированный человеческий IgG (3 мг IgG в объеме 6 мл ЗФР) и оставляли на 12-28 ч при 4°C. Затем чашки осторожно промывали ЗФР и наносили на них не прилипающие к пластиковой поверхности спленоциты (60.10⁶ клеток в ЗФР на чашку); инкубировали в течение 1 час при комнатной температуре. После инкубации собирали отдельно с помощью резинового напальчника не прилипшие и прилипшие к сорбенту клетки, дважды отмывали средой 139. Степень чистоты получаемых популяции оценивали в тесте ЕА-розеткообразования. Популяция клетки содержала не более Fc γ R⁻ - клетки содержала не более 1-2% ЕА-РОК.

Фракционирование не прилипающих к пластиковой поверхности спленодитов на и Ig⁺ и Ig⁻-клетки

Разделение спленоцитов на Т- и В-клетки проводили по методу. Для этого на пластиковые чашки Петри (диаметром 100 мм), предварительно смоченные ЗФР, наносили раствор F (ав)₂ - фрагментов кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, в количестве 6 мг в объеме 6 мл ЗФР на чашку и оставляли при 4°C на ночь. Затем сливали раствор F (ав)₂-фрагмента, промывали чашки раствором ЗФР с 5% фетальной сывороткой 4-5 раз и наносили на чашку 6.10⁶ не прилипающих к пластику клеток в

объеме 6мл, инкубировали при 4°C в течение 1 час. Затем отдельно собирали неприлипающие клетки Ig⁻ клетки и прилипающие к сорбенту — Ig⁺-клетки.

Препараты F (ав)₂- фрагмента кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши любезно предоставлены А.Д.Черноусовым (Институт иммунологии МЗ России)

Обработка спленоцитов митомицином С

Обработку не прилипающих к пластиковой поверхности клеток селезенки митомицином С проводили при концентраций 25 мкг/мл. Для этого клетки в среде Игла, содержащей 10% ЭТС, инкубировали с препаратом в течение 30 мин в СО₂-инкубаторе. После чего клетки трижды отмывали центрифугированием при 300G по 10 мин.

Определение функциональной активности В-клеток в системе сингенного переноса

Для оценки супрессивного эффекта антигениндуцированных В-супрессоров донорами В-клеток служили мыши, которым за 7 дней до опыта внутрибрюшинно вводили 5,10⁷ ЭБ (12). В-клетки вводили внутривенно в дозе 25,10⁶ необлученным сингенным реципиентам, последних через 20-30 мин после переноса клеток иммунизировали 2,10⁸ ЭБ. Число -АОК у этих мышей определяли на 4-5 день.

Функциональную активность не прилипающих к пластиковой поверхности, обогащенной популяции В-клеток мышей MRL/1 оценивали в системе переноса клеток в дозе 25,10⁶ гаплоидентичным мышам линии СВА Н-2^К. Последних иммунизировали 2,10 ЭБ. Число IgM-АОК определяли у реципиентов на 4-5 день.

Для оценки эффекта В-клеток, выделенных от мышей, получивших инъекцию ЛПС, их вводили либо в дозе 25.10⁶ необлученным реципиентам, либо в дозе 10.10⁶ в одном шприце с 10,10⁶ нормальными клетками селезенки летально облученным

реципиентам через 6 часов после облучения. Через 20-30 мин после трансплантации клеток реципиентов иммунизировали в дозе $2 \cdot 10^8$ ЭБ и на 4-5 день у необлученных или на 6-7 день у облученных реципиентов определяли число IgM антителообразующих клеток (АОК) (рис.1).

Для оценки H-2 рестрикции в действиях донорских клеток, ЛПС вводили мышам СВА, у которых через 7 дней получали обогащенные В-клетки и в дозе $25 \cdot 10^6$ переносили необлученным реципиентам С57BL и (СВАхС57BL) F₁. Последних иммунизировали $2 \cdot 10^8$ ЭБ и через 4-5 дней определяли число IgM-антителообразующих клеток (АОК).

Мышей облучали в дозе 8,5 Гр. Тотальное облучение мышей проводили в лаборатории радиобиологии АМН России на установке «Стебель 3а» (источник ^{137}Cs , мощность дозы 5,5 Гр/мин). Мыши во время облучения находились в специальных клетках из органического стекла с ячейками, где размещала по 3 мыши.

Изучение способности сывороток мышей, получивших ЛПС, индуцировать имиунорегуляторные клетки

Мышам (СВАхС57BL) F₁ однократно внутрибрюшинно вводили ЛПС, через 5 дней получали пул сывороток, определяли содержание ЦИК, после чего сыворотку в объеме 0,5 мл вводили внутривенно сингенным необлученным реципиентам. Через 24 а 72 ч из селезенок реципиентов с помощью цитотоксической реакции с анти-Thy 1.2 антителами или с АВГ получали популяции неприлипающих к пластику клеток, обогащенные соответственно, В- и Т-клетками. В дозе $25 \cdot 10^6$ В- или Т-клетки вводили внутривенно сингенным необлученным реципиентам, которых через 30 мин иммунизировали их $2 \cdot 10^8$ ЭБ, содержание АОК в селезенке реципиентов определяли через 4-3 дней. При переносе клеток летально облученным реципиентам им вводили по $10 \cdot 10^6$ В- или Т-клеток в одном шприце с $10 \cdot 10^6$ НКС; ЭБ вводили через 30 мин в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток; число антителообразующих клеток (АОК) подсчитывали через 6-7 дней после иммунизации.

ОСНОВНАЯ СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

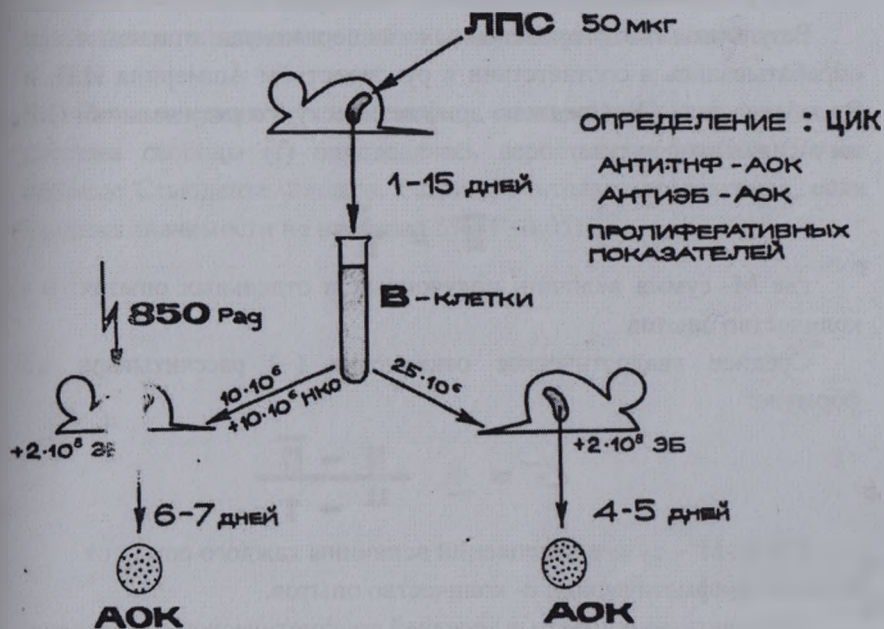


Рис. 1

Индукция иммунорегуляторных В-клеток препаратами интерлейкина-1

Из неприлипающих к пластику спленоцитов интактных мышей (СВАх C57BL) F₁ получали популяцию, обогащенную В-клетками в цитотоксической реакции с моноклональными антителами, удаляли мертвые клетки и обрабатывали их в течение 60 мин в СО₂-инкубаторе препаратами интерлейкина-1 (ИЛ-1), ИЛ-1 γ и ИЛ-1 β , любезно предоставленными нам С.Л.Кетлинским, отмывали и в дозе $20 \cdot 10^6$ клеток вводили сингенным необлученным реципиентам, у которых определяли число АОК после иммунизации их ЭБ. Контрольным мышам вводили В-клетки, необработанные

препаратами ИЛ-1.

3.3. Статистическая обработка экспериментальных данных

Результаты всех проведенных экспериментов статистически обрабатывались в соответствии с руководством Ашмарина И.П. и Воробьева А.А. (4). Среднюю арифметическую в ряду величин (M) вычисляли по формуле:

$$\bar{M} = \frac{M}{n}$$

где M - сумма величин, полученных в отдельных опытах; n - количество опытов.

Среднее квадратическое отклонение (σ) рассчитывали по формуле:

$$\sigma = \pm \frac{M - \bar{M}}{n - 1}$$

Где $M - \bar{M}$ - сумма отклонений величины каждого опыта от средней арифметической; n - количество опытов.

Стандартную ошибку (m) средней арифметической определяли, используя формулу;

$$m = \pm \frac{\sigma}{n}$$

где σ - среднее арифметическое отклонение; n - количество опытов.

Достоверность цифровых различий оценивали по критерию Стьюдента;

$$t = \frac{\frac{\bar{M}_1 - \bar{M}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

где $\bar{M}_1$ - средняя арифметическая первой из сравниваемых

величин;

M_2 - средняя арифметическая второй из сравниваемых величин;

m_1 и m_2 стандартные ошибки среднего арифметического.

По вычисленному значению и соответствующему значению степени свободы (f) определялась вероятность ошибки (P) по таблице Стьюдента-Фишера. Разница считалась достоверной, если уровень значимости не превышал 5% ($P < 0,05$).

ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Кинетика поликлонального иммунного ответа индуцированного ЛПС и его чувствительность к различным ингибиторам

Как уже упоминалось в обзоре литературы, ЛПС является поликлональным В-активатором. Многие особенности этого действия ЛПС хорошо известны, но остаются и невыясненные вопросы. Планирование этой части работы проследовало 2 основные цели - подтвердить способность использованной в работе ЛПС быть поликлональным В-стимулятором и выявить чувствительность поликлонального иммунного ответа к некоторым воздействиям.

4.1.2. Кинетика поликлонального иммунного ответа

Однократное внутрибрюшинное введение мышам (CBAxС57BL/6)F₁ ЛПС в дозе 50 мкг приводило к развитию в селезенке поликлонального иммунного ответа, который тестировали определением числа анти-ТНФ и анти-ЭБ АОК. В обоих случаях ответ развивался очень быстро, достигая пика на 2-е сутки; при этом число АОК уже через 1 сутки было столь же высоким, что и через 3 суток. В последующем ответ против ЭБ снижался быстрее, а число анти-ТНФ АОК снижалось постепенно и сохранялось на значительном уровне до конца наблюдения.

Полученные результаты показывают, что в селезенке мышей после введения использованного нами ЛПС быстро развивается и длительно сохраняется поликлональный иммунный ответ.

4.1.3. Кинетика содержания циркулирующих иммунных комплексов

Поликлональная активация клеток селезенки мышей сопровождалась появлением ЦИК в сыворотке крови (табл. 8). Их уровень начинал возрастать со 2 суток и достигал максимального

уровня на 5 сутки,

Таблица 8

**Кинетика поликлонального иммунного ответа на
липополисахарид**

Дни после введения ЛПС	Число АОК в селезенке		Числов АОК/10 ⁶ ЯСК	
	Против ТНФ	Против ЭБ	Против ТНФ	Против ЭБ
1	29150±2703	615±31	361,0±26,5	7,7±2,7
2	81000±10297	4100±857	625,0±132,0	32,7±10,7
3	56650±1544	3610±459	394,0±93,4	31,0±3,8
5	6675±995	300±107	75,4±13,7	3,3±1,2
7	3790±428	155±50	33,7±4,2	1,3±0,3
13	4430±834	85±46	38,0±9,8	1,1±0,7
Контроль	250±48	50±14	2,9±0,3	0,6±0,04

Примечание: Здесь и далее – ЛПС – липополисахарид: ЭБ-эритроциты барана; ЯСУ-ядросодержащие клетки в селезенке. Контроль – мыши, не получавшие ЛПС.

Таблица 9

**Кинетика содержания ЦИК в сыворотке крови у мышей,
получивших инъекцию ЛПС**

Дни после введения ЛПС	Содержание ЦИК в 1 мл сыворотки
1	0,15
2	0,18
3	0,25
5	2,80
7	1,30
13	2,35
Контроль	0,09

Контроль – содержание ЦИК у мышей, не получивших ЛПС. где отмечалось 30-кратное повышение уровня ЦИК в сыворотке по сравнению с контролем (мыши, не получившие ЛПС). К 7 суткам наблюдения содержания ЦИК снижалось, оставаясь выше контроля, после чего вновь повышалось к 13 суткам. (Табл 9)

4.1.4. Кинетика пролиферативных показателей в селезенке

Как видно из рис.2А, в норме митотический индекс (МИ) селезенки низок и составляет около 1%. За 6 часов винбластинного блока он достигает 6% (рис.2.Б), что позволяет оценивать скорость накопления митозов примерно 1% час. В условиях равновесного состояния нормальной селезенки это означает, что средняя скорость прохождения клеточного цикла можно определить как 1% делящихся клеток в 1 час. ЛПС вызывал резкое повышение как МИ, так и винбластинного индекса (ВИ) от 1 до 13 дня наблюдения. Однако, следует отметить, что оба показателя в исследованном интервале времени изменяются неоднозначно. Максимум значений МИ 6,6% достигает к 3 дню, а ВИ (около 40%) на 3 сутки. В последующие 4-5 суток наблюдается падение показателей (хотя уровень их остается достоверно выше контроля). Новый подъем пролиферации регистрируется на 13 день, когда величины МИ и ВИ приближаются к максимальным: 5,2 и 36,3%, соответственно.

Как видно из рис.2В индексы стимуляции митозов (определяемые как отношение величины МИ и ВИ к соответствующим контрольным величинам, полученный без обработки мышей ЛПС) ведут себя аналогично, демонстрируя максимальный подъем на 2-3 и 13 дни. На этих сроках пролиферативные показатели возрастают в 5-7 раз над контрольными значениями.

В то же время число ядросодержащих клеток (ЯСК) в селезенке увеличивалось к 3 суткам всего лишь в 1,5 раза (табл. 10). Это означает, что возрастание пролиферативной активности, по-видимому,

КИНЕТИКА ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ
МЫШЕЙ, ПОЛУЧИВШИХ ЛПС.

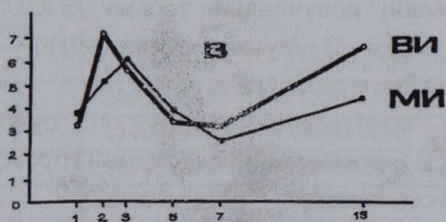
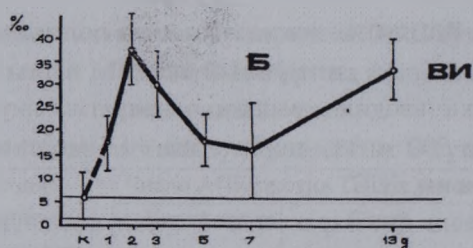
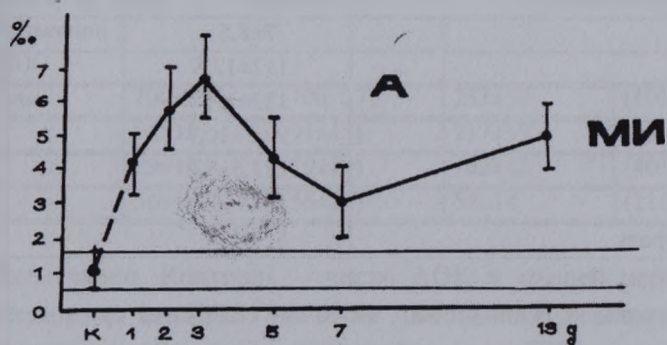


Рис. 2

Таблица 10

Кинетика количества ядросодержащих клеток (ЯСК) в селезенке, у мышей, получивших инъекцию ЛПС

Дни после введения ЛПС	Количество ЯСК в селезенке в млн
1	77±8,5
2	117±12,8
3	133±1,4
5	92,5±10,7
7	112,5±5,3
13	134±16
Контроль	85,8±3

Контроль - количество ЯСК в селезенке у мышей, не получивших ЛПС. не связано с увеличением клеточности селезенки.

4.1.5. Влияние цитостатиков на поликлональный иммунный ответ

Цитостатики вводили мышам однократно внутрибрюшинно: цитозар в дозе 500 мг/кг, винбластин - 1,5 мг/кг в разные сроки после инъекции им ЛПС.

При введении цитозара через 1 сутки после ЛПС наблюдали уменьшение числа анти-ТНФ АОК в 3,4 раза по сравнению с контролем (мыши, получившие только ЛПС), а при введении цитостатика через 2 суток после ЛПС снижение было приблизительно 2-кратным (табл. 11).

Введение винбластина через 1 сутки после ЛПС сопровождалось снижением числа анти-ТНФ АОК в 2,5 раза, а через 2 суток - снижением в 5 раз (табл. 12).

Введение указанных препаратов одновременно с ЛПС не давало эффекта снижения числа анти-ТНФ-АОК. В этих опытах ответ тестировали на 3 сутки после введения ЛПС.

При введении цитозара через 1 сутки после ЛПС и тестировании

Таблица 11

**Чувствительность индуцированного ЛПС поликлонального
иммунного ответа к цитозару и винбластину**

День введение цитостатиков после инъекции ЛПС	Число АОК (M $\pm$ mt)			
	Цитозар		Винбластин	
Контроль	100 $\pm$ 27	(100 $\pm$ 27)	253 $\pm$ 50	(100 $\pm$ 19)
0	91 $\pm$ 15	(91 $\pm$ 15)	217 $\pm$ 39	(85 $\pm$ 16)
+1	29 $\pm$ 10	(29 $\pm$ 10)	102 $\pm$ 12	(40 $\pm$ 5)
+2	56 $\pm$ 14	(56 $\pm$ 14)	54 $\pm$ 14	(21 $\pm$ 5)

Примечание. Контроль – число АОК у мышей через 3 дня после введения им ЛПС. Значение АОК даны в пересчете на 10⁶ ЯСК в селезенке. Здесь и в других таблицах в скобках – число АОК в процентах к контролю, принятому за 100.

Таблица 12

**4.1.6. Влияние антигениндуцированных В-супрессоров и В-
клеток мышей MRL/MpJ-Irg/Irg на поликлональный
иммунный ответ.**

Влияние антигениндуцированных В-супрессоров

Сроки введения донорских В-клеток относительно момента инъекции ЛПС реципиентам; дни	Число АОК против ТНФ в селезенке реципиентов		
	Контроль	Опыт	Процент супрессии
-2	20000 $\pm$ 3425	23500 $\pm$ 2703	+17,50
-1	20000 $\pm$ 3425	11750 $\pm$ 1552	-41,25*
0	13400 $\pm$ 3052	7000 $\pm$ 1810	-47,76*
+1	17500 $\pm$ 2354	15500 $\pm$ 2085	-11,43
+2	17500 $\pm$ 2354	18000 $\pm$ 2619	+2,85

ответа в кинетики наблюдали резкое, 10-20-кратное снижение числа АОК как против ТНФ, так и против ЭБ, продолжавшееся 2 суток после введения препарата (что соответствует 2 и 3 суткам ответа на ЛПС). Далее на 6 сутки после введения препарата (что соответствует 7 суткам ответа на ЛПС) наблюдали 2-х кратную стимуляцию анти-

ТНФ ответа по сравнению с контролем (только ЛПС); ответ нормализовался к 13 суткам наблюдения.

Таким образом, эксперименты с использованием ингибиторов клеточного деления показывает, что поликлональный ответ, регистрируемый по количеству анти-ТНФ и анти-ЭБ АОК чувствителен к ингибитору синтеза ДНК цитозару и митотическому яду винбластину.

В-клеток мышей MRL/MpJ-Lpr/Lpr на поликлональным иммунный ответ

АИВс получали от доноров, иммунизированных субоптимальной дозой ЭБ (21) и вводили реципиентам в разные сроки относительно инъекции им ЛПС.

Показано, что АИВс примерно в 2 раза снижали число анти-ТНФ АОК при введении их за 1 сутки до или одновременно с ЛПС, но они не подавляли поликлональный ответ при введении их через 24 и 48 часов после инъекции ЛПС, а также за 2 суток до ЛПС (табл. 12).

В другой серии опытов от интактных мышей MRL/MpJ-Lpr/Lpr получали не прилипающие к пластику спленоциты, обогати их В-клетками и вводили реципиентам в разные сроки относительно инъекции им ЛПС. Эти В-клетки, как и АИВс, подавляли примерно в 2 раза число анти-ТНФ АОК при введении их за 1 сутки или одновременно с ЛПС, а при введении их через 24 или 48 часов после инъекции ЛПС супрессивный эффект был слабее (супрессия была примерно 1,5-кратной). Эти В-клетки не подавляли поликлональный ответ при введении их за 2 суток до ЛПС (табл. 13).

Таблица 13

Влияние В-клеток мышей MRL/MpJ-Lpr/Lpr на индуцированный ЛПС поликлональный иммунный ответ

Сроки введения донорских В-клеток относительно момента	Числов АОК против ТНФ в селезенке реципиентов		
	Контроль	Опыт	Процент

инъекции ЛПС реципиентам, сутки			супрессии
-2	50000±9869	42000±5792	-16
-1	50000±9869	23500±4586	-53*
0	53600±3911	33200±4413	-38*
+1	24500±3052	16000±3662	-35
+2	24500±3052	15700±2197	-36

Примечание: Контроль - реципиентам введен только ЛПС. Число АОК определяли через 3 дня после введения реципиентам ЛПС. Звездочка - разница между контролем и опытом статистически значима при $P < 0,05$.

АИВс и В-клетки мышей MRL/MpJ-Lpr/Lpr действуют, вероятно, только на процессы инициации поликлонального иммунного ответа.

4.2. Изучение функциональной активности В-клеток, индуцированных ЛПС

Целью этой серии экспериментов было изучение иммунорегуляторной активности В-клеток мышей, получивших однократную внутрибрюшинную инъекцию 30 мкг ЛПС.

При оценке функциональной активности таких 3-клеток показано, что и в организме интактных, и в организме летально облученных реципиентов они стимулировали ответ против ЭБ в 2,3-3,4 раза (табл. 7.)

Таблица 14

Кинетика формирования иммуностимулирующих В-клеток у мышей, получивших ЛПС

Дни после введения донорам ЛПС		Число АОК в селезенке реципиентов ($M \pm mt$)			
		Необлученные реципиенты		Облученные реципиенты	
3	Контроль	111±29	(100±26)	46±5	(100±10)
	Опыт	259±32*	(233±29)	67±12	(145±26)
5	Контроль	70±13	(100±18)	23±7	(100±30)
	Опыт	200±31*	(285±45)	75±15*	(326±65)
7	Контроль	198±59	(100±29)	48,5±8,5	(100±15)
	Опыт	427±72*	(215±36)	262±30*	(540±62)

15	Контроль Опыт	475±68 662±99	(100±14) (139±21)	67±17 134±51	(100±25) (200±76)
----	------------------	------------------	----------------------	-----------------	----------------------

Примечание. У необлученных реципиентов контрольным мышам вводили только ЭБ. У облученных реципиентов контрольным мышам вводили нормальные клетки селезенки (НКС)+ЭБ. Значения антителообразующих клеток (АОК) даны в пересчете на 10^6 ядросодержащих клеток (ЯСК) в селезенке.

4.2.1. Кинетика образования иммуностимулирующих В-клеток к чувствительность их нормирования к винбластину

При изучении кинетики формирования иммуностимулирующих В-клеток селезенки их получали на 3, 5, 7 и 15 сутки после введения ЛПС и вводили либо интактным, либо облученным реципиентам.

Тестирование эффекта стимуляции в организме интактного реципиента показало, что В-клетки, полученные от доноров на 3,5 или 7 дни после введения им ЛПС, стимулировали иммунный ответ на ЭБ в 2,3-2,8 раза, а В-клетки, полученные на 15 сутки такой способностью не обладали (табл. 14).

При оценке аффекта в организме облученного реципиента наблюдали стимуляцию иммунного ответа на ЭБ в 1,4-5,4 раза В-клетками, получениями во все сроки, кроме В-клеток, полученных на 15 сутки. При этом наибольший стимулирующий эффект отмечали при переносе В-клеток, полученных на 7 день после введения доноров ЛПС. (табл. 14).

Если донорам одновременно с ЛПС однократно внутрибрюшинно вводили 1,5 мг/кг винбластина, то наблюдали полную отмену иммуностимулирующего действия донорских В-клеток, полученных через 7 дней после инъекции ЛПС (рис. 3). Если винбластин вводили через 5 дней, то иммуностимулирующий эффект донорских В-клеток не только полностью сохраняется, но был даже выше, чем в контроле. Следовательно, предшественники иммуностимулирующих В-клеток чувствительны к митотическому

яду винбластину, а уже сформировавшиеся клетки - резистентны. Таким образом, однократное внутрибрюшинное введение мышам ЛПС в дозе 50 мкг сопровождается появлением в селезенке не прилипающих к пластиковой поверхности В-клеток, способных в системе адаптивного иммунитета стимулировать иммунный ответ против ЭБ. Эти стимулирующие В-клетки появляются через 3 дня и сохраняются в селезенке до 7 дня и предшественники их чувствительны к винбластину.

4.2.2. Изучение отличий иммуностимулирующих В-клеток от других субпопуляций В-лимфоцитов

Целью этих экспериментов было доказательство того, что иммуностимулирующее действие неприлипающих к пластику В-клеток мышей, получивших ЛПС, не связано с эффектом предшественников АОК, коммитированных к ЭБ и/или В-клеток памяти, которые могли появиться в результате поликлональной активации В-клеток, индуцированной ЛПС. В этих опытах использовали клетки селезенки, полученные от

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИНДУКЦИИ
ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ В-КЛЕТОК
К ВИНБЛАСТИНУ

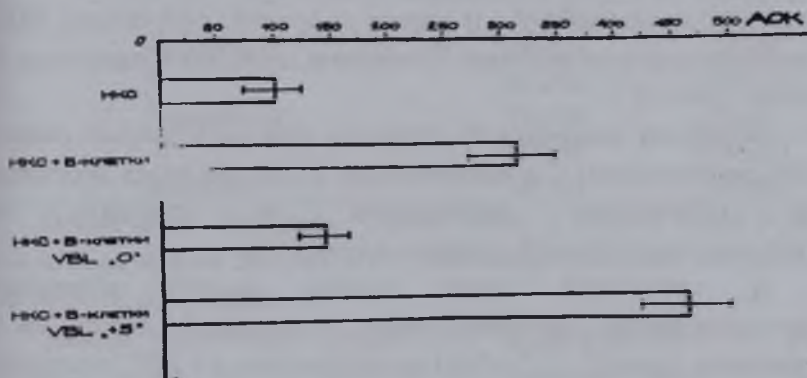


рис. 3

Тотальная популяция донорских с пленоцитов, после переноса интактным реципиентам не влияла, а в организме облученных животных подавляла ответ на ЭБ (табл.15).

Таблица 15

Функциональная активность тотальной популяции спленоцитов мышей, получивших ЛПС

Вариант опыта	Число АОК в селезенке реципиентов ($M \pm m$)			
	необлученные реципиенты		облученные реципиенты	
Контроль	32000 $\pm$ 5205	(100 $\pm$ 16)	3060 $\pm$ 523	(100 $\pm$ 17)
Опыт	33625 $\pm$ 4745	(105 $\pm$ 14)	2400 $\pm$ 558	(78 $\pm$ 18)

Примечание: У необлученных реципиентов контрольным мышам вводили только ЭБ. У облученных реципиентов контрольным мышам вводили НКС+ЭБ. В опыте реципиентам введены спленоциты, полученные от доноров через 7 дней после инъекции им ЛПС. Значения АОК даны в пересчете на селезенку.

Выделенные из интактных донорских спленоцитов В-клетки стимулировали ответ на ЭБ у облученных реципиентов 2,4 раза, однако стимулирующий эффект В-клеток от мышей, получивших ЛПС, был значительно более сильным примерно 4,0-кратным (табл. 16).

Изучение кооперации донорских В-клеток с нормальными Т-клетками показывало, что В-клетки от мышей, получивших ЛПС, кооперировали с интактными Т-клетками такие, как и интактные В-клетки (табл. 15).

Обработка донорских В-клеток *in vitro* ингибитором синтеза ДНК митомицином С в концентрации 25 мкг/мл перед переносом их облученным реципиентам не отменяла их иммуностимулирующей активности (табл. 17).

В следующей серии опытов мышей однократно внутрибрюшинно иммунизировали оптимальной дозой ЭБ в различные сроки (1, 2, 7 сутки) после инъекции им ЛПС, после чего оценивали число АОК в селезенке против ЭБ каждый раз на 4 день после иммунизации. При этом во всех случаях наблюдали по

меньшей мере 2-кратное снижение ответа против ЭБ (табл. 16).

Таблица 16

Тестирование иммуностимулирующей активности В-клеток селезенки мышей, получивших ЛПС

Тип донорских клеток, введенных летально облученным реципиентам	Число АОК в селезенке реципиентов ($M \pm mt$)	
НКС (контроль)	130 $\pm$ 25	(100 $\pm$ 19)
В-клетки (норм.) +НКС	314 $\pm$ 63*	(241 $\pm$ 49)
В-клетки (ЛПС) + НКС	520 $\pm$ 83*	(400 $\pm$ 63)
НКС (контроль)	261 $\pm$ 33	(100 $\pm$ 12)
В-клетки (норм.) +НКС	400 $\pm$ 115	(153 $\pm$ 44)
В-клетки (ЛПС), обработанные митомицином С+НКС	827 $\pm$ 62*	(316 $\pm$ 24)
В-клетки (норм.)+Т-клетки (норм.)	711 $\pm$ 82	(100 $\pm$ 11)
В-клетки (ЛПС)+Т-клетки (норм.)	503 $\pm$ 138	(70 $\pm$ 70)

Примечание: (ЛПС) – клетки получены через 7 дней после введения донорам ЛПС. (норм.) – клетки получены от интактных мышей. значения АОК даны в пересчете на 10^6 ЯСК в селезенке.

Таблица 17

Влияние ЛПС на иммунный ответ против ЭБ in situ

День введения ЭБ после инъекции ЛПС (день 0)	Число АОК	($M \pm mt$)
Контроль +1	321 $\pm$ 23	(100 $\pm$ 7)
	120 $\pm$ 29	(37 $\pm$ 9)
Контроль +2	321 $\pm$ 23	(100 $\pm$ 7)
	161 $\pm$ 28	(50 $\pm$ 8)
Контроль +7	359 $\pm$ 42	(100 $\pm$ 11)
	160 $\pm$ 30	(44 $\pm$ 8)

Примечание: Контроль – число АОК у мышей через 4 дня после введения им ЭБ (без ЛПС). Значения АОК даны в пересчете на 10^6 ЯСК в селезенке.

Анализ полученных результатов свидетельствует, на наш взгляд, в пользу того, что иммуностимулирующий эффект В-клеток, индуцированных ЛПС in vitro, не связан с активности предшественников АОК и или В-клеток памяти.

4.2.3. Некоторые свойства иммунорегулирующих В-клеток, индуцированных ЛПС

Для дальнейшего изучения природа и свойств В-клеток их получали от доноров через 7 дней после введения им ЛПС, а эффект тестировали в организме облученных реципиентов.

При сравнении эффекта не прилипающей к пластику популяции, обогащенной - В-клетками (Thy 1,2⁻ клеток), и неприлипающих клеток, содержащих поверхностно иммуноглобулин (Ig⁺-клетки) видно, что обе популяции примерно одинаковы (в 2 раза), увеличивали ответ реципиентов на ЭБ (табл. 18)

При разделении Thy 1,2⁻ клеток на FcRγ⁺ - клетки обнаружено, что FcRγ⁻ В-клетки повышали ответ до 332%, то есть оказывали иммуностимулирующий эффект, FcRγ⁺ В-клетки, напротив примерно в 2 раза подавляли ответ (табл. 11) Обработка FcRγ⁻ и FcRγ⁺ - В-клеток анти-Т-сывороткой в присутствии комплемента не отменяла их стимулирующий и супрессирующий (соответственно) эффекты (табл. 18).

Данные по цитотоксической обработке Thy 1,2⁻ клеток моноклональными анти-Lyt 1.1 и анти-Lya 2 антителами показывают, что иммуностимулирующий эффект указанными антителами не отменяется (табл. 11). Напротив, обработка Thy 1,2⁻ клеток анти-Ia антителами отменяла их иммуностимулирующий эффект (табл. 18).

Таблица 18

Некоторые свойства не прилипающих к пластику клеток селезенки мышей (СВАхС57BL)F₁ индуцированных in vitro ЛПС

№ группы	Тип донорских клеток, введенных летально облученными реципиентам	Число АОК в селезенке реципиентов (M±mt)
1	НКС (контроль)	5100±1506 (100±29)
2	Клетки, обработанные анти Thy 1,2-антителами +С (Thy 1,2 ⁻)	115810±1837* (227±35)
3	Клетки, содержащие поверхностные	9780±1940* (191±38)

	иммуноглобулины (Ig)	
4	НКС (контроль)	1960±310 (100±15)
5	Thy1,2 ⁺ FcR ⁺ - клетки	1140±240* (58±12)
		6520±1478* (332±76)
6	Thy1,2 ⁻ FcR ⁻ - клетки	
7	НКС (контроль)	7740±1004 (100±13)
8	Thy1,2 ⁺ FcR ⁺ - клетки, обработанные АТГ+С	3480±523* (44±7)
9	Thy1,2 ⁻ FcR ⁻ - клетки, обработанные АТГ+С	15120±1250 (195±16)
10	НКС (контроль)	1650±395 (100±23)
11	Thy 1,2 ⁻ - клетки	4200±1000* (225±60)
12	Thy 1,2 ⁻ клетки, обработанные анти – Lyt 1-антителами +С	3900±1057* (236±64)
13	Thy 1,2 ⁻ клетки, обработанные анти – Lyt 2-антителами +С (Thy 1,2 ⁻ , Lyt 2)	3000±785* (182±23)
14	НКС (контроль)	6420±726 (100±11)
15	Thy 1,2 ⁻ - клетки	9900±1448* (154±22)
16	Thy 1,2 ⁻ клетки, обработанные анти – 1a-антителами +С (Thy1,2, 1a)	5100±1088 (79±17)
17	НКС (контроль)	400±104 (100±26)
18	Thy 1,2 ⁻ - клетки, полученные от интактных доноров	520±55 (130±13)
19	Thy 1,2 ⁻ клетки, полученные обработанные АВГ+С	340±169 (85±42)
20	Thy 1,2 ⁻ клетки, взятые от доноров, получивших ЛПС	900±202* (225±50)
21	Thy 1,2 ⁻ клетки, взятые обработанные АВГ+С	68±18* (* (17±4)
22	НКС (контроль)	133±12 (100±9)
23	Медленно седиментирующие в поле тяжести Ig мелкие Thy/1,2 ⁻ -клетки (скорость 2,1-4,1 мм/ч: диаметр 6,6-8,1 мкм)	78±17* (58±13)
24	Быстроседиментирующие крупные Thy 1,2 ⁻ -клетки (скорость 6,0-8,3 мм/ч: диаметр 9,7-11,5 мкм)	231±50 (176±35)
25	Thy 1,2 ⁻ - клетки с промежуточной скоростью седиментации и диаметром (4,8-5,4 мм/ч: 8,7-9,2 мкм)	316±32237±25)

Примечание: АТГ-анти Т-глобулин; АВГ-анти – В-глобулин;

С-комплект; Значение ОАОК в группах 1-21 даны в пересчете на селезенку, а в группах 22-25 на 10^6 ЯСК в селезенке.

Иммуностимулирующей активности наблюдали также после обработки Thy 1,2⁺ клеток анти-В-сывороткой (табл. 18).

После фракционирования не прилипающих к пластику Thy 1,2⁺ - спленоцитов в поле тяжести 1g оказалось, что иммуностимулирующей активностью обладали быстроседimentирующие крупные клетки и клетки с промежуточной скоростью седиментации. Напротив, медленноседimentирующие мелкие клетки давали супрессорный эффект (табл. 13). Кроме того, иммуностимулирующий эффект Thy 1,2⁺ - клеток не был подвержен H-2 рестрикции. В этой серии опытов не прилипающие к пластику В-клетки получали от мышей СВА либо через 5 дней, либо через 7 дней после введения им ЛПС, а ответ тестировали в системе переноса необлученным реципиентам C57B¹ или (CBA $\times$ C57B¹) F¹ (рис. 4).

Таким образом, введение мышам ЛПС сопровождается появлением в селезенке не прилипающих к пластику спленоцитов, способных в системе адоптивного переноса и стимулировать и подавлять иммунный ответ на ЭБ.

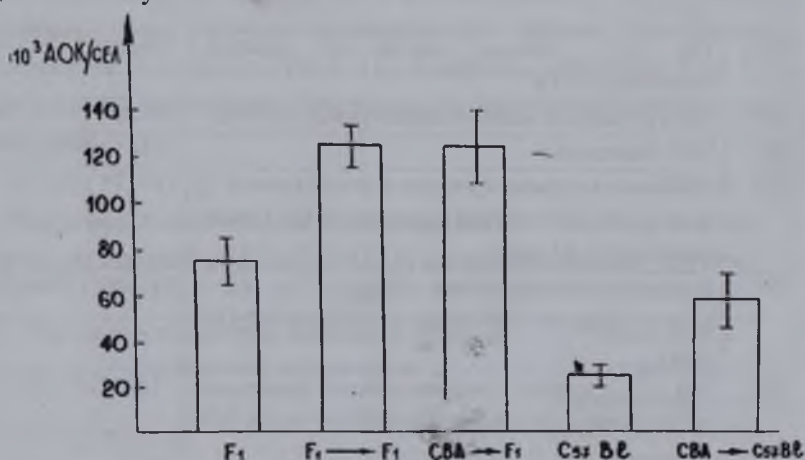


Рис. 4. Оценка H-2 рестрикции в действии иммуностимулирующих В-клеток.

Стимулирующие клетки являются крупными, быстроседиментирующими в поле тяжести Ig клетками, имеющими фенотип: $1,2^-$, $Fc\gamma^-$, $Lyt1.1^-$, $Lyt2^-$, Ig^+ , Ia^+ и их эффект не подвержен H-2 ограничению.

В отличие от иммуностимулирующих, супрессорные клетки являются мелким, медленноседиментирующими клетками, имеющими фенотип $1,2^-$ и $Fc\gamma^-$.

4.2.4. Восстановление с помощью В-клеток иммунного ингибированного введением цитозара

Помимо собственно иммуностимулирующей активности, индуцированные введением ЛПС В-клетки обладали способностью восстанавливать иммунную реактивность реципиентов, подавленную введением цитозара. Для этого необлученных мышей иммунизировали $2 \cdot 10^8$ ЭБ и через 24 часа им однократно внутрибрюшинно вводили цитозар в дозе 300 мг/кг и через 6 часов после введения цитозара этим мышам переносили не прилипающие к пластику В-клетки, полученные от доноров, которым за 7 дней до этого вводили ЛПС. Ответ оценивали на 5 сутки после иммунизаций.

Как видно из таблицы, таким образом, полученные В-клетки усиливали ответ реципиентов на ЭБ в 2,4 раза. При этом следует отметить, В-клетки, полученные от интактных мышей восстанавливали ответ всего лишь до уровня контроля (только ЭБ).

4.2.5. Способность мышей, получивших ЛПС, индуцировать иммунорегуляторные клетки

В этих опытах получали пул сывороток от мышей через 5 дней после инъекции им ЛПС. Содержание ЦИК в них составляло 1,2 единиц в 1 мл.

**Восстановление В-клетками иммунного ответа
подавленного цитозаром**

Тип донорских клеток, введенных реципиентам	Число АОК в селезенке ($M \pm m$)	
ЭБ	24500 $\pm$ 2619	(100 $\pm$ 10)
ЭБ + цитозар	10500 $\pm$ 131395	(43 $\pm$ 5)
ЭБ + В-клетки (ЛПС)	21250 $\pm$ 13828	(209 $\pm$ 15)
ЭБ + цитозар + В-клетки (ЛПС)	59000 $\pm$ 4827	(241 $\pm$ 19)
ЭБ + цитозар + В-клетки (норм .)	31000 $\pm$ 3068	(126 $\pm$ 21)

Примечание. (ЛПС) - клетки получены через 7 дней после введения донорам ЛПС. (норм) - клетки получены от интактных мышей. Значения АОК даны в пересчете на селезенку.

Сыворотки вводили промежуточным реципиентам, от которых через 24 ч получали В- и Т-клетки и вводили их летально облученным реципиентам. В этих опытах обнаружили способность таким образом полученных В-клеток усиливать иммунный ответ НКС на ЭБ 97%, а Т-клеток - на 117% (табл. 13). Если В- и Т-клетка получали от промежуточных реципиентов не через 24 ч, а через 72 ч после введения им сывороток, то они не обладали иммунорегуляторной активностью (табл. 19).

Таким образом, сыворотка мышей, получивших однократно инъекцию ЛПС, обладала способностью индуцировать иммуностимулирующие В- и Т-лимфоциты.

4.2.6. Индукция иммунорегуляторных В-клеток препаратами интерлейкина - 1

После обработки В-клеток интактных мышей (CBAx57B¹)F¹ ИЛ-1 γ введения их сингенным необлученным реципиентам наблюдали увеличение числа АОК против ЭБ в 1,7-2 раза (табл. 20). Обработка В-клеток ИЛ-1 β такого эффекта не давала.

Таблица 20

**Способность сывороток мышей, получивших ЛПС,
индуцировать иммунорегуляторные клетки**

Дни после введения сывороток	Тип донорских клеток, введенных реципиентам	Число АОК в селезенке ($M \pm mt$)	
		Необлученные реципиенты	Облученные реципиенты
1	Контроль В-клетки Т-клетки		23775 $\pm$ 3352 (100 $\pm$ 14) 46875 $\pm$ 2720 (197 $\pm$ 14) 51600 $\pm$ 7115 (217 $\pm$ 30)
3	Контроль В-клетки Т-клетки	81250 $\pm$ 22352 (100 $\pm$ 25) 129500 $\pm$ 16924 (145 $\pm$ 19) 106500 $\pm$ 30618 (119 $\pm$ 34)	11595 $\pm$ 1991 (100 $\pm$ 17) 8160 $\pm$ 1810 (70 $\pm$ 15) 11340 $\pm$ 1520 (98 $\pm$ 13)

Примечание: У необлученных реципиентов контрольные мыши получали только ЭБ. У облученных реципиентов контрольные мыши получали НКС+ЭБ.

Таблица 21

Индукция иммунорегуляторных В-клеток препаратами интерлейкина -1

Реципиентам введены В-клетки, обработанные	Числов АОК в селезенке	Числов АОК/ 10^6 ЯСК
Контроль	89400 $\pm$ 6300 (100 $\pm$ 7)	900,2 $\pm$ 65,6 (100 $\pm$ 7)
ИЛ-1 γ	179200 $\pm$ 17632 (200 $\pm$ 20)	1532,9 $\pm$ 78 (170 $\pm$ 9)
ИЛ - 1 β	115200 $\pm$ 18183 (149 $\pm$ 21)	1128,1 $\pm$ 80 (125 $\pm$ 9)

Примечание: контроль — мышам вводили В-клетками, не обработанные препаратами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первой из поставленных в работе задач было доказать, что использованный нами препарат ЛПС является поликлональным активатором. Проверка убедительно показала, что однократное внутрибрюшинное введение мышам 50 мкг ЛПС сопровождалось быстро развивающимся (пик через 48-72 ч) и длительным увеличением пролиферативной активности спленоцитов и числа АОК против ТНФ и ЭБ. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы о быстро развивающемся и длительном поликлональном ответе селезенки на ЛПС (61). Следует отметить, что в этих работах использованы другие дозы *m* источники ЛПС, а ответ оценивали либо на другие антигены, либо подсчитывали тотальное число АОК.

Индукцируемый в нашей работе ответ обладал различной чувствительностью к некоторым ингибиторам в зависимости от момента их введения относительно инъекции ЛПС. Так, цитостатики цитозар и винбластин не супрессировали поликлональный ответ при введении одновременно с ЛПС, но подавляли его в 2-5 раз при введении через 24 или 48 ч после него.

Эти эксперименты показывают, что на 2-3 сутки после введения ЛПС имеется совпадение всех 3 исследованных признаков поликлонального ответа; максимальные значения числа АОК против ТНФ и ЭБ и пролиферативных показателей, а также максимальная чувствительность к цитостатикам. Поскольку пик АОК достигается уже через 2 сутки, скорее всего клетки за это время совершают минимальное число делений, возможно, 2-3. В то же время 1-е сутки ответа на ЛПС можно охарактеризовать следующим образом; высокий уровень числа анти - ТНФ и анти-ЭБ АОК (сопоставимый с уровнем 3 суток), достаточно высокий (но не максимальный) уровень митотической активности и минимальная чувствительность к цитостатикам, введенным одновременно с ЛПС. Отсюда можно сделать вывод, что высокий уровень антителообразования в 1-е сутки после введения ЛПС зависит слабо или не зависит вовсе от клеточной пролиферации. Вполне

вероятно, что индукция поликлонального иммунного ответа начинается с клеток, дифференцирующихся в АОК без деления. Не исключено, что они относятся к популяции наиболее зрелых предшественников АОК. Это предположение не противоречит современным представлениям о гетерогенности чувствительных к ЛПС В-клеток по степени зрелости.

В другой серии опытов мышам, получившим ЛПС, вводили супрессорные В-клетки - антигениндуцированные В-супрессоры, полученные от иммунных доноров (12) или В-клетки селезенки интактных взрослых мышей MRL/1, содержащих в своем составе В-супрессоры (18). И те, и другие клетки подавляли ответ на ЛПС только тогда, когда их вводили за сутки до или одновременно с ЛПС, т.е. они действуют только на процессы инициации поликлонального иммунного ответа.

Эти данные имеют существенное значение для понимания патогенеза аутоиммунных заболеваний. Действительно, как уже упоминалось, в селезенке аутоиммунных мышей MRL/1 в том возрасте, когда у них имеются все признаки аутоиммунной патологии, найдены В-супрессоры (18), активность которых удастся определить только в системе переноса H-2^K гаплоидентичным мышам линии СВА. При этом *in situ* они себя никак не проявляют, ибо несмотря на их наличие у аутоиммунных мышей наблюдается поликлональный иммунный ответ. Следовательно, можно предположить, что либо клетки-мишени нечувствительны к таким В-супрессорам, либо они способны действовать только на процессы инициации поликлонального ответа и не действуют на уже развивающийся ответ, либо поликлонально активированные В-иммуностимуляторы (см. ниже) доминируют над В-супрессорами и их действие не проявляется.

Еще одним важным признаком поликлонального иммунного ответа, индуцированного ЛПС, является резкое возрастание уровня ЦИК (на 5 сутки отмечено 30-кратное увеличение). Для нас этот факт имеет принципиальное значение, поскольку с помощью сывороток, взятых на 5 сутки после инъекции ЛПС, нам удалось

индуцировать иммунорегуляторные В-клетки (см. ниже).

Одним из основных результатов работы следует признать также то, что после однократного введения мышам ЛПС в селезенке появляются не прилипающие к пластику В-клетки, способные в системе адаптивного иммунитета стимулировать ответ против ЭБ. Эти стимулирующие В-клетки появляются через 3 дня и сохраняются в селезенке до 7 дня, увеличивая ответ у необлученных реципиентов в 2,3-2,8 раза, а у облученных – в 3,2-5,4 раза.

Необходимо было доказать, что иммуностимулирующее действие не прилипающих к пластику В-клеток мышей, получивших ЛПС, не связано с эффектом предшественников АОК, коммитированных к ЭБ и или В-клеток памяти, которые могли бы появиться в результате поликлональной активации В-клеток, индуцированное ЛПС. В этих опытах использовали клетки, полученные от доноров через 7 дней после введения им ЛПС.

Показано, что тотальная популяция спленоцитов от таких доноров либо не влияет, либо даже подавляет ответ на ЭБ у реципиентов. Выделенные из интактных спленоцитов не прилипающие к пластику В-клетки также стимулировали ответ на ЭБ у облученных реципиентов, однако стимулирующий эффект В-клеток от мышей, получивших ЛПС, был значительно более сильным. Обработка таких В-клеток митомицином С перед переносом их облученным реципиентам не отменяла их иммуностимулирующей активности. Наконец, В-клетки от мышей, получивших ЛПС, кооперировали с интактными Т-клетками так же, как и интактные В-клетки.

Обнаруженные в этих опытах неспособность тотальной популяции спленоцитов стимулировать ответ против ЭБ у реципиентов и значительно более слабый иммуностимулирующий эффект не прилипающих к пластику интактных В-клеток в сравнении с В-клетками мышей, получивших ЛПС, свидетельствуют, на наш взгляд, в пользу того, что иммуностимулирующий эффект В-клеток, индуцированных ЛПС in

vivo не связан с активностью предшественников АОК.

Кроме того, одинаковая способность к взаимодействию с интактными Т-клетками у не прилипающих к пластику интактных В-клеток и В-клеток от мышей, получивших ЛПС, а также резистентность иммуностимулирующей активности последних к обработке митомицином С, по-видимому, указывают на то, что стимуляция иммунного ответа против ЭБ у реципиентов не связана с активностью клеток памяти в популяции переносимых им В-клеток доноров.

Еще одним косвенным доказательством того, что эффект стимуляции В-клетками не связан с В-клетками памяти, можно, вероятно, считать тот факт, что введение мышам ЭБ, в разные сроки после инъекции им ЛПС, во всех случаях сопровождалось по меньше-: мере 2-кратным снижением ответа против ЭБ.

Перечисленные доказательства самостоятельности В-иммуностимулирующих клеток, безусловно, являются косвенными. Тем не менее, принадлежность этих клеток к В-лимфоцитам не вызывает сомнений. Нам удалось показать, что и Thy 1,2⁺ клетки, Ig⁺-клетка вызывали примерно одинаковый стимулирующий эффект. Интересно, что обогащенные м Thy 1,2⁺-клетками, лишенными FcR-рецептора FcR γ - клетками повышflo иммуностимулирующий эффект до 332%, а обогащенные FcR γ ⁺ -клетками, напротив, позволило зарегистрировать примерно 2-кратный иммунодепрессивный эффект.

Эти данные свидетельствуют о гетерогенности не прилипающих к пластику спленоцитов, индуцированных ЛПС - они содержат:

- 1) иммуностимулирующие клетки, являющиеся, наиболее вероятно, В-клетками. Скорее всего, они представляют собой отдельную популяцию клеток, не содержащую в своем составе предшественников АОК и или -В-клеток памяти;

- 2) иммуносупрессорные клетки, несущие на мембране FcR. Обработка Thy 1,2⁺, FcR γ ⁺-клеток анти-Т-глобулином не отменяла их супрессорной активности, как, впрочем и аналогичная

обработка $\text{Thy } 1,2^-$, $\text{Fc}\gamma^-$ клеток не изменяла их стимулирующей активности. Эта группа доказательств косвенно указывает на то, что и супрессорные и стимулирующие действия обеспечивают, вероятно, В-клетки.

Еще одним свидетельством в пользу принадлежности иммуностимулирующих клеток к В-лимфоцитам является, по видимому, данные по цитотоксической обработке $\text{Thy } 1,2^-$ -клеток другими антителами. Например, анги-Lyt 1.1 и анти-Lyt-2 антитела иммуностимулирующий эффект не отменяли. Напротив, обработка $\text{Thy } 1,2^-$ - клеток анти-Ia антителами отменяла их иммуностимулирующий эффект. Отмену иммуностимулирующей активности наблюдали также после обработки $\text{Thy } 1,2^-$ - клеток с помощью анти-В-глобулина.

Полученные в этой части работы данные свидетельствуют о том, что введение мышам ЛПС сопровождается появлением в селезенке не прилипающих к пластику клеток, обладающих иммуностимулирующей активностью при тестировании в системе адоптивного иммунитета у летально облученных реципиентов. Эти клетки имеют следующий фенотип: $\text{Thy } 1,2^-$, $\text{Fc}\gamma^-$, $\text{Lyt } 1.1^+$, $\text{Lyt } 2^-$, Ig^+ , Ia^+ , MBLA^+ . Кроме того, иммуностимулирующий эффект $\text{Thy } 1,2^-$ -клеток проявлялся также в системе переноса необученным реципиентам и не подвержен H-2 рестрикции.

После фракционирования не прилипающих к пластику $\text{Thy } 1,2^-$, спленоцитов в поле тяжести Ig оказалось, что иммуностимулирующей активностью обладали быстроседimentирующие крупные клетки. Напротив, медленноседimentирующие мелкие клетки давала супрессорный эффект. Следовательно, клетки с супрессорной активностью являются $\text{Thy } 1,2^-$, $\text{Fc}\gamma^+$, медленноседimentирующими мелкими метками.

Необходимо отметить, что по многим исследованным параметрам иммуностимулирующие клетки, индуцированные ЛПС, похожи на иммуностимулирующие клетки, индуцированные ЭБ и также протестированные в системе адоптивного иммунитета: это

были крупные быстроседиментирующие клетки, являющиеся $\text{Thy } 1,2^+$, MBLA^+ , Ig^+ и $\text{FcR}\gamma$ – клетками. Поскольку использования в этих работах система тестирования, включающая иммунизацию ЭБ и доноров, и реципиентов позволяет выявить клетки-памяти, можно считать, что В-клетки памяти и иммуностимулирующие В-клетки, индуцированные ЛПС, но не являющиеся В-клетками памяти, имеют много общих черт, хотя и является, вероятно, разными клеточными популяциями.

Полученные результаты указывают на то, что в гетерогенной популяции поликлонально активированных В-клеток, наряду с клетками, продуцирующими самые различные антитела и аутоантитела, находятся такие клетки, обладающие способности и подавлять, и стимулировать иммунный ответ. Это могут быть одни и те же, или разные клетки. Не исключено, что речь идет о превалировании того или иного эффекта в зависимости от тест-системы. Данные литературы говорят о том, что ЛПС индуцирует преимущественно В-супрессоры. Это показано, главным образом, в двух системах: 1) при введении ЛПС *in vivo* и затем тестировании активности клеток селезенки *in vitro* и 2) при культивировании клеток селезенки *in vitro* и затем тестировании активности таких клеток в других культурах *in vitro* (84). Ни в одной из подобного рода работ не удалось зафиксировать иммуностимулирующих В-клеток. По-видимому в условиях *in vitro* В-супрессоры доминируют над иммуностимулирующими В-клетками. Причины этого не известны. Можно лишь предположить, что В-супрессоры (являющиеся, как показано нами $\text{FcR}\gamma^+$, мелкими клетками) либо лучше вшиваются *in vitro*, либо в таких искусственных условиях функция В-иммуностимуляторов не проявляются из-за недостатка необходимых биологических компонентов, либо происходит конкуренция за клетки-мишени, либо для супрессорных и иммуностимулирующих клеток имеются разные мишени и мишени для последних теряют к ним чувствительность. Очевидно, что можно высказать еще несколько предположений, но ни одно из них пока не имеет экспериментальных подтверждений.

По - видимому исследованная нами система тестирования (перенос клеток мышам реципиентам) является более адекватной для выявления иммуностимулирующих В-клеток, индуцированных *in vivo* ЛПС, чем для выявления В-супрессоров. Причем эта закономерность сохранялась при использовании и интактных, и облученных реципиентов. В то же время, система переноса В-клеток интактным реципиентам адекватна для оценки антигениндуцированных В-супрессоров, а облученным - для оценки В-клеток памяти (12). Следовательно, выбор тест-системы является во многом важнейшим (фактором для обнаружения и оценки иммунорегуляторных В-клеток, но он, по-видимому, не является абсолютным. Действительно, после разделения клеток в поле тяжести 1g удалось в системе переноса облученным реципиентам выявить и В-супрессора, индуцированные антигеном (3), В-супрессоры, индуцированные ЛПС.

Какие факторы могут быть индукторами иммунорегуляторных В-клеток? Кинетика их формирования говорит о том, что они появляются не ранее 3-го дня, а пик приходится на 5-7 дни после инъекции ЛПС. В эти же дни регистрируются максимальное содержание ЦИК. Вполне вероятно, что последние являются основными индукторами таких клеток.

Следует отметить, что иммунные комплексы обладают достаточно сложным действием иммунокомпетентные клетки, причем основным их действием является индукция или активация супрессорных клеток. При этом мишенями их действия могут быть: 1) макрофаги, синтезирующие после контакта с ними простагландины Е, которые в свою очередь через ЦАМФ подавляют ответ В-лимфоцитов на антигены; 2) Т-лимфоциты, способные вырабатывать супрессорные факторы; 3) В-лимфоциты, вырабатывающие SBF. Во всех этих случаях эффект ЦИК опосредован их взаимодействием с $\text{Fc}\gamma$, рецептором на клеточной поверхности. Значительно меньше известно о способности ЦИК индуцировать появление иммуностимулирующих клеток. Считают, что этот эффект может быть опосредован при взаимодействии с $\text{Fc}\mu$ -рецепторов на поверхности клеток, в том числе В-лимфоцитов.

Из данных, полученных в нашей работе, следует, $\text{Fc}\gamma^+$ -В-клетки являются супрессорами. В таком случае их индукцию ЦИК можно объяснить взаимодействием Fc -фрагментов IgG ,

находящихся в составе таких ЦИК. С FcR γ на поверхности В-клеток. Иммуностимулирующие В-клетки в наших опытах были лишены FcR γ но это не исключает того, что они могут иметь рецептор для Fc α - фрагмента Ig. В таком случае, ЦИК, содержащие в своем составе IgM, могут быть индукторами иммуностимулирующих В-клеток. Это предположение нуждается в экспериментальной проверке.

Другим возможным индуктором может быть интерлейкин - 1, синтезирующий макрофагами и В-клетками под влиянием ЛПС. известно, что В-клетки содержат рецепторы для этого медиатора (74) и зависимые от него процессы активации В-клеток во многом сходны с тем, что происходят в Т-клетках. Не исключено, что под влиянием ЛПС процесс синтеза и высвобождения интерлейкина+1 резко усиливается, это приводит к образованию и или активации уже индуцированных ЛПС иммунорегуляторных В-клеток. Косвенным подтверждением правомочности такого предположения могут быть полученные нами данные о способности интерлейкина-1 индуцировать образование иммуностимулирующих В-клеток (табл. 15) в популяции спленоцитов интактных мышей.

Еще одной важной проблемой является осмысление способности В-клеток подавлять или стимулировать иммунный ответ в организме реципиента. Супрессорная активность В-клеток в настоящее время активно изучается и факторами супрессии могут быть SBF, простагландины Е и цАМФ, синтезируемые В-клетками антитела, способность В-клеток индуцировать другие супрессорные клетки, в том числе Т-и В-супрессора и т.д. (см. обзор литературы).

Что касается иммуностимулирующей активности В-клеток, то известна способность активированных В-клеток представлять антиген Т-клеткам. Процесс представления антигена макрофагами, как известно, ограничен по Ia-антигенам.

Поскольку иммуностимулирующие В-клетки в наших опытах были эффективными в организме несингенных реципиентов, то в данном случае иммуностимулирующий эффект В-клеток, по-видимому, не связан с их антигенерезентирующей активностью.

Литература по иммуностимулирующей активности В-клеток, индуцированной ЛПС ограничена единственным сообщением (84).

Показано, что В-клетки, стимулированное ЛВС вместе с декстран сульфатом (один ЛПС давал слабый эффект) либо супернатантом, содержащим В-клеточный стимулирующий фактор-1 (BSF-1), затем зафиксированные миготицином С или параформальдегидом и добавленные в первичную смешанную культуру лимфоцитов (СКЛ) мышей давала эффект стимуляции. При этом обнаружено, что костимулирующая активность В-клеток не связана с их способностью синтезировать интерлейкин-1, но эту активность можно заменить добавлением в СКЛ форболового эфира форбол миристат ацетата.

Обнаруженные нами иммуностимулирующие В-клетки также сохраняли активность после обработки миготицином С. Следовательно, их эффект в организме реципиента не зависит от способности к пролиферации. Косвенно об этом свидетельствуют такие данные о неспособности винбластина, введенного донорам за 2 дня до получения В-клеток, подавлять их образование. Относительно отсутствия связи между синтезом интерлейкина-1 и способностью В-клеток, индуцированных ЛПС и декстран сульфатом, стимулировать супрессорные клетки, можно сказать, что в этих условиях, по-видимому, синтезируются костимулирующие молекулы, необходимые для активации Т-клеток и прохождения ими по клеточному циклу без интерлейкина-1. Поскольку активация В-клеток одним ЛПС без декстран сульфата не сопровождалось индукцией В-клеток, способных стимулировать, можно предположить, что либо в этих условиях синтезируется интерлейкин-1, но его уровень недостаточен для стимуляции первичной супрессорные клетки, либо стимуляция первичной супрессорные клетки может происходить без интерлейкина-1. Об этом говорят, данные о неспособности антител к интерлейкину-1 блокировать первичную супрессорные клетки и о неспособности интерлейкина-1 функционировать в качестве костимулятора в митогенном ответе Т-лимфоцитов человека.

С другой стороны, показана способность В-клеток синтезировать интерлейкин-1 после их стимуляции комплексом

между кондиционированной средой Т-клеток и анти-Ig-антител или в условиях их стимуляции Кон А вместе с Т-клетками. Кроме того, показана способность к синтезу интерлейкин-1 В-клеточными линиями и нормальными В-клетками людей, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр.

Следовательно, способность В-клеток давать иммуностимулирующий эффект может зависеть и не зависеть от интерлейкина-1, что видимо, определяется и условиями их активации и тест-системой.

Еще одним механизмом иммуностимулирующего действия В-клеток, индуцированных ЛПС может быть способность $\text{Thy } 1,2$ -клетки могут вырабатывать хелперный фактор.

В заключение мы хотели бы подчеркнуть, что ЛПС действительно обладает широким спектром иммуотропной активности, включая индукцию иммунорегуляторных В-клеток. Механизмы данного явления могут быть различными. Эти клетки могут появиться просто как следствие поликлональной активации В-клеток, могут индуцироваться иммунными комплексами, синтезированными макрофагами (и, возможно, В-клетками) интерлейкином-1, либо другими механизмами. У доноров превалирует эффект супрессии иммунного ответа, возможно, вследствие доминирования В-супрессоров. При переносе В-клеток от доноров, получивших ЛПС, в культуру клеток *in vitro* также доминируют В-супрессоры, а при переносе в культуру клеток *in vivo* - иммуностимулирующие В-клетки. Механизм собственно супрессорного или стимулирующего эффекта также могут быть различными. Вместе с тем, независимо от механизмов действия, которые еще предстоит изучить, факт индукции с помощью ЛПС иммуностимулирующих В - клеток сомнений не вызывает и он может иметь существенное значение в тех случаях, когда создаются возможности персистенции ЛПС и других эндотоксинов и когда можно ожидать проявление всего спектра иммуотропной активности ЛПС, часто приводящей к иммунопатологии.

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

1. АБС - Анти В – сыворотка
2. АОК - Антителообразующие клетки
3. АПК - Антиген презентирующей клеткой
4. АТС – Анти Т – сыворотка
5. ВИ – Винбластинный инфекс
6. В-Клетки
7. ГЗТ - Гиперчувствительности замедленного типа
8. ДК - Дендритные клетки.
9. ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота
10. ЖКТ – Желудочно кишечный тракт
11. ИКК - Иммунокомпетентных клеток
12. ИЛ- Интерлейкина
13. ИС - Иммунной системы
14. ЛПС - Липополисахариды
15. М - Моноциты и макрофаги
16. МИ – Митотический инфекс
17. МкАт - Моноклональных антител
18. НК - *Натуральные киллеры*
19. НКС – Нормальные клетки селезенки
20. ПМЯЛ - Полиморфно ядерные лейкоциты
21. СК - Синовиальные клетки,
22. СКК - Стволовых кроветворных клеток
23. ТК - Тучные клетки,
24. Тх - Т-хелперы,
25. Ф - Фибробласты,
26. ЦИК - Циркулирующими иммунными комплексами
27. ЭБ – Эритроциты барана
28. Эн - Эндотелиальные клетки
29. Эп - Эпителиальные клетки,
30. ЯСК – Ядродержащие клетки

ЛИТЕРАТУРА

1. Акрамов А.Р., Калинин А.Г., Пинегин Б.В. Чувствительность процесса формирования антигениндуцированных В-супрессоров к ингибиторам синтеза ДНК. // Журнал микробиол. эпид. и иммунобиол. - 1985, - №3. - С. 82-86.
2. Акрамов А.Р., Калинин А.Г., Пинегин Б.В. Ингибиторный анализ антигениндуцированных В-супрессоров. - В кн. Актуальные вопросы иммунофармакология. - М. 1987 - С. 39-46.
3. Акрамов А.Р. Индукция иммунорегуляторных В-лимфоцитов под влиянием липолисахарида. Автореферат. дисс.к.м.н. Москва, 1988.
4. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. //Л.; Медицина. - 1982. - 180 с.
5. Влияние костномозговых лимфоцитов супрессоров на пролиферацию гибридомных клеток. /И.Г.Сидорович, Г.А.Игнатьева, И.А.Николаева, Р.М.Хаитов. //Иммунология. - 1984. - № 5. - С. 35-37.
6. Влияние В-активина и Т-активина на формирование антигениндуцированных В-супрессоров / А.Р.Акрамов, А.Г.Калинович //Нейрогуморальная регуляция иммунного гомеостаза. Тез. докладов ТУ Всесоюзного симпозиума "Регуляция иммунного гомеостаза". - Ленинград, 1986. - С. 129-130.
7. Влияние Т-активина на функциональную активность антигениндуцированных В-супрессоров /А.Р.Акрамов. //Тезисы XVI Республиканская научная конференция молодых медиков Грузии, посвященная 70-летию Великой Октябрьской революции. - Бакуриани, 1987 - С. 245.
8. Гариб Ф.Ю. В-лимфоциты и моноклональные лечебные антитела. Лекция. Вестник лимфологии. 2009; 2: 29–38.
9. Гриневич Ю.А., Алферов А.И. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. //Лабораторное дело. - 1981. - № 8. - С. 493-495.
10. Дозморов И.М. Функциональная обратимость во взаимодействиях лимфоцитов с аллогенными стволовыми

- клетками; Автореферат дис.; докт. биол. наук: 14.00.36. /МЗ Институт иммунологии М 1986. - 40 с.
11. Дьяков И.Н., Сидорова Е.В. Субпопуляции Влимфоцитов и влияние микроокружения на их функциональную активность. Пульмонология. №5, 2010. С. 116-123.
12. Калинин А.Г. Иммунорегуляторные В-клетки в норме и при иммунопатологии. Автореферат дисс. д.м.н. 1987, стр. 3-38.
13. Климов В.В. Основы иммунологии. Учебное пособие. Томск, Издательство СибГМУ, 2017, С. 3-169.
14. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. С. 640.
15. Костномозговые клетки-супрессора у больных вирусными и алкогольными циррозами печени. / Р.М.Хаитов, В.А.Джалалова, М.И.Губарев, А.П.Погромов, А.С.Ивлев // Терапевтический архив. - 1986. – С. 82-86.
16. Кульберг А.Я. Регуляция иммунного ответа. - М. «Медицина», 1986. - 223 с.
17. Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Бязрова М.Г., Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры./ Иммунология. Том 40, № 6, 2019, С.63-76
18. Маджидов У.В., Калинин А.Г., Пинегин Б.В. Изучение некоторых показателем иммунного статуса мышей линии //Иммунология. - 1986. - № 6. - С. 18-21.
19. Манько В.М., Хаитов Р.М. Иммунопептентные клетки (поверхностные структуры и субпопуляционная организация). //Итоги науки и техники. ВИНТИ. Иммунология. - 1987. - Т. 18. - С. 3-240.
20. Москалев, А.В. Аутоиммунные заболевания. Диагностика и лечение / А.В. Москалев [и др.]. – М.: Гэотар-Медиа, 2017. – 218 с.
21. Москалев А.В., Б.Ю. Гумилевский, А.В. Апчел, В.Н. Цыган. Семейство В-лимфоцитов и их функции. / Вестник Российской Военно- Медицинской академии./ 3 (67), 2019, С. 189-194.

22. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Лимфоциты супрессоры В-ряда - В-супрессоры. // Успехи современной биологии. - 1981.Т. 91.выпуск 1. С. 8-28.
23. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Костномозговые клетки-супрессоры (В-супрессоры). В кн. Итоги науки и техники. Серия иммунология - М. 1982. - Т.10. - С. 6-29.
24. Решетникова Л.К. Иммунология. Учебное пособие. Благовещенск.2019.
25. Сидорова Е.В. Что нам известно сегодня о В-клетках. Успехи соврем. биол. 2006; 3: 227–241.
26. Соколов А.В. В-клеточное звено в регуляции аутоиммунных заболеваний. Acta Naturae. 2018; 10 N3 (38): 11–23.
27. Супрессорные клетки костного мозга человека /Р.В.Петров, Р.М.Хаитов, И.Г.Сидорович, М.И.Губарев, В.А.Савинов. //Докл. АН. - 1984. - Т. 274, №1. - С. 207-210., 1983. - 254 с.
28. Хаитов Р.М. В-клеточная регуляция иммунной системы. //Иммунология. - 1987 - № 3. - С. 10-13.
29. Хаитов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 328.
30. Хаитов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. С. 496.
31. Характеристика и клетки-мишени супрессивного фактора, секретируемого клетками костного мозга. /И.Г.Сидорович, В.В.Ляхов, А.А.Власова, В.И.Новиков. //Иммунология. - 1987. - № 4. - С. 67-69.
32. Шейбак В.М.,А.Ю. Павлюковец // В-лимфоциты: функции и метаболизм. /Иммунопатология, Аллергология, Инфектология 2020 №3, С. 39-45
33. Шеховцова Н.В. Основы иммунологии. Учебное пособие. Ярославль, 2009, С. 3-122.
34. Ярилин А.А. Основы иммунологии. Учебник. – Москва, ГЕОТАР-Медиа, 2010, 747 с.
35. Activation of suppressor T cells by autologous lymphoblastoid cells. A mechanism for feedback regulation of immunoglobulin synthesis. /James S.P., G.G. Yenokida, Graeff A.S., W.Strober. //J. Immunol. -

1982. – Vol. 128, №3. – P. 1149-1154.

36. Activation of antigen-specific suppressor T cells by B cells from mice immunized with type III pneumococcal polysaccharide. / G.E.Taylor, F.W.Stashar, G. Caldes, B.Prescott, T.E. Chased, A.Brooks, P.J.Baker //J. exp. Med. - 1983. - Vol. 153, №3. - P. 703-717.

37. Accessory cell function of human B cells. I. Production of both Interleukin-1-like activity and an Interleukin 1 inhibitory factor by an EBV-transformed human B cell line. / G.Scale, Y.D.Kuang, R.E.Hall, A.V. Muehmore, J.J. Oppenim. //J. Exp. Med. – 1984. – Vol. 159, № 6. - P. 1637-1652.

38. B-lymphocyte regulation of the immune system. III- Preparation and characterization of rabbit antibodies that inhibit the biological activity of the lymphokine, B-cell-derived enhancing factor (BEF). /Del Caere lo P., M.F.Del., Guercio, M.Zanetti, D.H. Katz. //Cell. Immunol. - 1986. – Vol. 98, - P. 333-340.

39. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. /R.L. Coffman, J.Ohara, M.W.Bond, J. Carty, A. Zlotnik, W.K. Paul. //J. Immunol. - 1986. - Vol, 136, № 12. - P. 4538-4541.

40. Bacterial lipopolysaccharides activate immune suppressor cells in newborn mice. /R.A.Winchurch, C.Hilberg, W.Birmingham, A.M.Munster. //Cell. Immunol. - 1981. - Vol. 58, № 2. – P. 450-466.

41. Bacterial lipopolysaccharide-induced Interferon- γ production: roles of interleukin 1 and interleukin 2. /J.Le, J.X. Lin, D. Henriksen-destefano, J.Vilcek. //J.Immunol. - 1986, - Vol. 136, № 12, - P. 4525-4530.

42. Beller D.I., Unanue E.R. Regulation of macrophage Ia expression in vivo and in vitro. //Adv.Exp. Med. Biol. - 1982. - Vol. 155. - P. 591-599.

43. Bjorklund M., Coutinho A. Isotype commitment in the in vivo immune responses. II. Polyclonal plaque-forming cell response to lipopolysaccharide in the spleen and bone marrow.// Eur. J. Immunol. - 1983. - Vol. 13, №1, - P. 44-50.

44. Calkins C.E.I. Interactions between primed and unprimed cells in the regulation of in vitro antibody responses. I. Role of plasma cells as

- inducers of suppression. //Eur. J. Immunology. - 1982. - Vol. 12. № 1. - P. 70-75.
45. Chesnut R.W., Grey H.M. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. //J. Immunol. - 1986. - Vol. 126, № 3. - P. 1075-1079.
46. Chestnut R.W., Colon J.M., Grey H.M. Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages. //J. Immunol. - 1982. - Vol. 129, № 6, - P. 2332-2388.
47. Control of suppressor cell activity: autoanti-idiotypic B cells produced by pointing with picryl chloride inhibit the T-suppressor cell which blocks the effector stage of contact sensitivity /G.L. Asherson, M. Zembala, S.C. Gautam, M.C. Watkins //Cell. Immunol. - 1982. Vol. 70. № 1. - P. 160-69.
48. Dono M., Cerruti G., Zupo S. The CD5+ B-cell. Int. J. Bio-chem. Cell Biol. 2004; 36 (11): 2105-11
49. Emerson S.G., Pretell J., Cone R.E. Physical and pharmacologic inhibition of the shedding of I-A antigens. //Exp. and Clin, Immunogenet. - 1984. - Vol. 1, № 1. - P. 3-18.
50. Farkas R., Monor Y., Klajman A. Generation of B suppressor cells by phytohaemagglutinin. // Immunology. - 1986. - Vol. 57. - P. 395-398.
51. Farkas R., Monor Y., Klajman A. Long-term cultures of chronic lymphocytic leukemia B cells generate B suppressor cells. //Clin, Immunol. Immunopathol. - 1987. - Vol. 42, № 2, - P. 171-182.
52. Feedback suppression of the immune response in vivo. III. Lyt-1⁺ B-cell are suppressor - inducer cells. /T. Shimamura S. Habu, K. Hashimoto S., Sasaki. //Cell Immunology. - 1984. - Vol. 83. № 1. - P. 221-224.
53. Fedler J.M. Tolerance to a reactive hapten. Differential susceptibility of B cell subsets and mechanism of induction. // Immunol. Rev. - 1980. - Vol. 50. - P. 133-161.
54. Frohman M., Cowing C. Presentation of antigen by B-cells: functional dependence on radiation dose, interleukins, cellular activation and differential glycosylation. // J. Immunol. 1985. - Vol. 134, № 4. - P. 2269-2275.

55. Genetic defect in responsiveness to the B-cell mitogen lipopolysaccharide. /In Coutinho, L. Forni, F. Melchers, T. Watanabe. //Eur. J. Immunol. - 1977. - Vol. 7, № 5. - P. 325-328
56. Grey H.M., Colon S.M., Chesnut H.W. Requirements for the processing of antigen by antigen-presenting B-cells. II. Biochemical comparison of the fate of antigen in B cell tumors and macrophages. //Immunology. - 1982. - Vol. 129, № 6. - P. 2383-2395.
57. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptors interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. /J. Kaye, S. Gillis, S.B. Mizel, M.E. Shevach, T.R. Males, C.A. Dinarello, L.B. Lachman, C.A. Janeway. // J. Immunol. - 1984. - Vol. 133, № 3. - P. 1339-1345.
58. Hara T., Fu S.M. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. //J. Exp. Med. - 1985, № 4. - P. 641-656.
59. Hardy R.R. B cell development. J. Immunol. 2006; 177 (5): 2749-2754.
60. Identification of two distinct factors, B₁₅₁-TRF1 and B₁₅₁-TRF2 inducing differentiation of activated B cells and small resting B cells into antibody-producing cells. /S. Ono, S.I. Hayashi, Y. Tokahama, K. Dobashi, Y. Katon, K. Nakanishi, W.E. Paul, T. Hamaoka. //J. Immunol. - 1986. - Vol. 137, № 1. P. 187-196.
61. Inhibitory mechanism of the proliferative response of resting, B-cells: feedback regulation by a lymphokine (suppressive B-cell factor) produced by Fc receptor-stimulated V-cells. /T. Ohno, N. Miyama-Inaba, T. Masuda, K. Fukuma, K. Aizawa, R. Suzuki, K. Kumagata, T. Kanoh, H. Uchino //Immunology. - 1987. - Vol. 61- P. 35-41.
62. Izui S., Eisenberg R.A., Dixon F.J. Subclass-restricted IgG polyclonal antibody production in mice injected with lipid A-rich lipopolysaccharides. //J. Exp. Med. - 1981. - Vol. 153. № 2. - P. 324-333.
63. R.C. Jandl, R.G. Flanagan, F.M. Schur. Interleukin-1 stimulation of human B-lymphoblast differentiation. //Clinical immunology and

immunopathology. - 1988. - Vol. 46. № 1 - P. 115-121.

64. Johnsen H.E. Lymphocyte subpopulations in man; induction of cytotoxic T-lymphocytes in vitro by allogeneic B- and T-cells. //Tissue Antigens. - 1981. - Vol. 18. № 2. - P.108-124.

65. Jurgensen C.H., Ambrus J.L., Fauci A.S. Production of B- cell growth factor by normal human B-cells //The J. of Immunology. - 1986, - Vol. 136, № 12. - P. 4542-4547.

66. Kehrl J.H. Muraguchi A., Fauci A.S. Differential expression of cell activation markers after stimulation of resting human B lymphocytes. //J.Immunol. - 1984. - Vol. 132, № 6. - P. 2857-2861.

67. Kennedy M.W., Thomas D.B. A regulatory role for the memory B-cell as suppressor-inducer of feedback control. //J. Exp. Med. - 1983. - 157(2). - P. 547-558.

68. L'Age-Stein J. Priming of T-helper cells by antigen-activated B-cells. B-cell primed Lyt-1⁺ helper cells are restricted to cooperate with B-cells expressing the IgVH phenotype of the primers. // J. Exp. Med. - 1981. - Vol 153, № 5. - P. 1236-1245.

69. Lachman L.B. Interleukin 1. Release from LPS-stimulated mononuclear phagocytes. // In; Beneficial effects of Endotoxins. 1983. - P. 283-335.

70. Lack of oral tolerance in C₃H/He J mice/ H.Kiyono, J.R. Mc Chee, M.J. Wannemuehler, S.M. Michalek. //J. Exp. Med. - 1982. Vol. 155, № 2. - P. 605-610.

71. Lipopolysaccharide regulation of the immune responses: T lymphocytes from normal mice suppress mitogenic toad immunogenic responses to LPS. / J.R. Mc Ghee, H.Kiyono, S.M. Michalek, J.L. Babb, D.L. Rosenstreich, S.E. Mergenhagen. // J. Immunol. 1980. - Vol. 124, № 4. - P. 1603-1611.

72. Lipopolysaccharide regulation of the immune response. Beneficial effects on lymphoid cells and a model for their activation by LPS. /K.A. Gollahan, S.M. Michalek, M.J. Wannemuehler, J.R. Mc Chee. //In: Beneficial effects of endotoxins. 1983. - P. 327-353. ed. Nowatny A.

73. Makela O., Seppala I.J.T., Vaara M., LPS greatly enhances the antibody response to hapten-polysaccharide conjugates but not to

haptен-protein, conjugates. //Ann. Immunol. - 1983. - Vol. 134, № 1. - P. 25-36.

74. Matsumoto T., Nakano M., Shibuto M. Suppression of the polyclonal B-cell response of lipopolysaccharide by concanavalin-A-treated non-T-celle in vitro. //Immunology. - 1982. - 47 (4). - P. 651-661.

75. Melchers F., Andersson J. B cell activations curse atoms and their variation. //Cell. - 1984. - Vol 37, № 1. - P. 715-720.

76. Mitogen-induced amplification of blastogenesis in lipopolysaccharide-precultured lymphocytes. /D.E. Lopatin, D.F. Mangan, I.S. Horner, F.L. Peebles. //Infect. Immunity, - 1980. - Vol. 29, № 2. - P. 512-519.

77. Moore K.D., Loxton A.G. Regulatory B lymphocytes: development and modulation of the host immune response during disease. Immunotherapy. 2019; 11 (8): 691-704.

78. Morrison D.C., Ryan J.L., Bacterial endotoxins and host immune responses. //Adv. Immunol. - 1999. - Vol.- 28. - P. 293-450.

79. Morrison D.C., Rudbach J.A. Endotoxin-cell membrane interaction leading to transmembrane signaling. //In: Contemporary topics in Mocular Immunology. - 1981. - Vol. 8, № 2. - P. 187 -194.

80. Morrison D.C. Bacterial endotoxin and pathogenesis. //Rev. Infect, Dis. - 1983. - Vol. 5. - P. 733-747.

81. Nakano M., Uchiyama T. In vitro adjuvant effect of endotoxin. //Ins Beneficial effects of endotoxins. - 1983. - P. 255-272.

82. Noess V., Nofstand T. Chemaical compozition and biological activity of lipopolysaccharides prepared from type strains of campylobacter jejuni and campylobacter coli. //Acta path. Microbial. Immunol. Scand. Sect. B. - 1984. - Vol. 92, № 2. - P. 217-222.137.

83. Noesa V. In vitro blastogenic response and immunoglobulin synthesis in murine spleen cells stimulated with lipopolysaccharides from Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. //Acta path. microbiol. Immunol. Scand. sect. C. - 1985. - Vol. 93, № 2. - P. 211-216.

84. Norin A.J., Short M.K. Replicative properties of lipopolysaccharide-induced murine B lymphocyts: detection of three different responses to

- mitogenic restimulation. // J. Immunol, 1982. - Vol. 126, № 6. - P. 2377-2381.
85. Odean Characterisation of the cells mediating LPS-induced suppression. // M.Sc. Thesis. - 1981. - P. 320-322.
86. Oppenheim J.J., Gery I. Interleukin 1 is more than an interleukin. // Immunology Today. - 1982. - Vol. 3. - P. 113-120.
87. Piccolella E.C., Lombardi G., Morell R. Human lymphocyte activities properties of a purified polysaccharine from candida albicans: B and T cell cooperation in the mitogenic response // J. Immunol - 1980. - Vol. 125. №5. - P.2082-2088.
88. Pape K.A., Taylor J.J., Maul R.W., Gearhart P.J., Jenkins M.K. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. Science. 2011; 331 (6021): 1203-7
89. Portnoi D., Motta I., Truffa-Bachi P. Immune unresponsiveness of spleen cells from lipopolysaccharide-treated mice to particulate thymus-dependent antigen. I. Evidence for differentiation signal defect. // Eur. J. Immunol. - 1981. - Vol. 11. №1. - P. 156-158.
90. Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B-lymphocytes. /K.Matsushima, A.Procopio, H.Abe, G.Scala, J.R.Ortaldo, J.J. Oppenheim. //J. Immunol. - 1985. - Vol. 135, № 2. - P. 1132-1136.
91. Properties of a specific interleukin 1 (IL 1) receptor on human epstein barr virus-transformed B lymphocytes: identity of the receptor for IL 1- γ - and IL 1 β /R.Matsushima, T.Akahoshi, M. Ymada, Y.Furutani, J.J.Oppenheim. //J.Immunology. - 1986. - Vol. 136, № 12. - P. 4496-4502.
92. Raetz C.R. The enzymatic synthesis of lipid A: molecular structure and biological function of monosaccharide precursor. //Rev. Infect. Dis. - 1984. - Vol. 6, № 4. - P. 463-471.
93. Rigas V., Rogers I.J. Studies on the cellular nature of Candida albicans-induced suppression. // J. Immunol. - 1983. - Vol. 130, № 1. - P. 376-379.
94. Roles of surface-found immunoglobulin molecules in regulating the replication and maturation to immunoglobulin secretion of B

- lymphocytes. /F.Melchers, J. Andersoon, T. Lernhardt, M.H.Schreier. //Immunol. Rev. - 1980. - Vol. 52, - P. 89-114.
95. Seppala I.J.T., Makela O. Adjuvant effect of bacterial LPS and / or alum precipitation in responses to polysaccharide and protein antigens. // Immunol. - 1984. - Vol. 53. № 6. - P. 827-836.
96. Shapper C.M., Paul W.E. Interferon - γ and B cell stimulatory factor - 1 reciprocally regulate Ig isotype production. //Science. - 1987. - Vol. 236, № 4801. - P. 944-947.
97. Shenk R.RE., Weisabarger H.Z., Dickler H.B. Anti-idiotypic stimulation of antigenspecific antigen-independent antibody responses in vitro. II. Triggering, of B lymphocytes by idiotypic plus antiidiotypic in the absence of T lymphocytes. //J. Immunol. - 1984. - Vol. 132, № 6. - P. 2703-2714.
98. Shimamura T, Hashimdot K., Sasaki S. Feedback suppression of the immune response in vivo. I. Immune B-cells induce antigen-specific suppressor T-cell. //Cell. Immunology. - 1982. - Vol. 68. - №1. - P. 104-113.
99. Singer A., Hodes R.J. Mechanisms of T cell-B cell interaction. //Ann. Rev. Immunol. - 1983. - Vol. 1. - P. 211-241.
100. The effects of interleukin 1 on human B cell activation and proliferation. /R.J.M.Falkoff, A.Muraguchi, J.X.Hong, L.J.Butler, C.A.Dinareello, A.S.Fauch. //J.Immunol. - 1983. - Vol. 131, № 2. - P. 801-805.
101. Vale A.M., Kearney J.F., Nobrega A, Schroeder H.W. Chapter 7-Development and function of B cell subsets. In: Alt F.W., Honjo T., Radbruch A., Reth M., ed. Molecular Biology of B Cells. 2nd ed. London: Academic Press, 2015.
102. Vogel S.N., Hillfeker M.L., Caulfield M.J. Endotoxin-induced T-lymphocyte proliferation. //J.Immunol. - 1983. - Vol. 130. № 4. - P. 1774-1779.
103. Waldman H., Munro A. B cell activation. //Transplant. Rev. - 1975. - № 23. - P.13-222.
104. Walker S.M., Wegle W.O. Effect of bacterial lipopolysaccharide on the in vitro secondary antibody response in mice. II. Abrogation of

the suppressive capacity of endotoxin. //Cell, Immunol. - 1982. - Vol. 67. № 1. - P. 168-17.

105. Warrington R.J., Rutherford W.J., Sauder R.J. Soluble mediators produced by a human continuous V lymphoblastoid cell line. // Cell. Immunol. - 1982. - Vol. 73, № 1. - P. 159-168.

106. Wetzel G.D., Kettman J.R. Activation of murine B lymphocytes. III. Stimulation B lymphocyte clonal growth with lipopolysaccharide and dextran sulfate. //J. Immunol. - 1981. - Vol. 126, № 3. - P. 723-730.

107. Yamamoto H., Bitoh S., Fujimoto S. Regulation of immune responses via genetically-restricted cellular interactions. I. Augmentation of antibody responses by idiotype-specific enhancing B lymphocytes. //J. Immunol. - 1984. - Vol. 3. № 6. - P. 2882-2889.

108. Yamamoto H., Bitoh S., Fujimoto S. Regulation of immune responses via genetically restricted cellular interactions. I. I-region-restricted cooperation between idiotypic and antiidiotypic B lymphocytes. // Cell. Immunol. - 1985. - Vol. 94. № 2. - P. 579-586.

109. Yarkoni Y., Getahun A., Cambier J.C. Molecular underpinning of B-cell anergy. Immunol. Rev. 2010; 237 (1): 249-63.

110. Zabala C., Lipsky P.E. Immunodulatory effects of bacterial lipopolysaccharide on human B lymphocytes activation in vitro. //J. Immunol. - 1982. - Vol. 129, № 6. - P. 2496-2503.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
ГЛАВА I. ОСНОВЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОЛОГИИ	6
1.1. Неспецифические факторы защиты ганизма	6
1.2. Органно - циркуляторный принцип организации иммунной системы	15
1.2.1. Компоненты иммунной системы	15
1.2.2. Состав иммунной системы	17
1.2.3. Центральные и периферические органы иммунной системы	18
1.3. Иммунный ответ	23
1.3.1. Клетки иммунной системы	25
1.4. Специфические факторы защиты	29
1.4.1. Регуляция иммунного ответа	39
1.5. Главный комплекс гистосовместимости	40
ГЛАВА II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	45
2.1. Иммунорегуляторные В-лимфоциты	45
2.2. Иммунорегуляторные эффекты липополисахарида	48
ГЛАВА III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
3.1. Материалы исследования	60
3.2. Методы исследования	61
3.3. Статистическая обработка экспериментальных данных	76
ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	78
4.1. Кинетика поликлонального иммунного ответа, индуцированного липополисахаридом, и его чувствительно к различным ингибиторам	78
4.1.2. Кинетика поликлонального иммунного ответа	78
4.1.3. Кинетика содержания циркулирующих иммунных комплексов	78
4.1.4. Кинетика пролиферативных показателей в селезенке	80

4.1.5. Влияние цитостатиков на поликлональный иммунный ответ	82
4.1.6. Влияние антигениндуцированных В-регуляторных клеток и В-клеток мышей MRL/MpJ-lpr/lpr на поликлональный иммунный ответ	83
4.2. Изучение функциональной активности В-клеток индуцированных липополисахаридом	88
4.2.1. Кинетика образования иммуностимулирующих В-клеток и чувствительность их формирования к винбластину	86
4.2.2. Изучение отличий иммуностимулирующих В-клеток от других субпопуляций В-лимфоцитов	87
4.2.3. Некоторые свойства иммунорегуляторных В-клеток, индуцированных липополисахаридом.....	90
4.2.4. Восстановление с помощью В-клеток иммунного ответа, ингибированного введением цитозара	93
4.2.5. Способность сывороток мышей, получивших липополисахарид, индуцировать иммунорегуляторные клетки ...	93
4.2.6. Индукция иммунорегуляторных В-клеток препаратами интерлейкина-1	94
Заключение	96
Условные сокращения	106
Литература	107

REN 570.5010.9792.3.1



9 789910 979231