

В. М. МАНЬКО, Т. Б. РУДНЕВА

ИНАКТИВАЦИЯ АЛЛОГЕННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК Т и В ЛИМФОЦИТАМИ

(Представлено академиком Д. К. Беллевым 14 X 1974)

При трансплантации летально облученным реципиентом смеси несингенных гемопоэтических и лимфоидных тканей происходит инактивация стволовых клеток (к.о.е.) трансплантата, что обнаруживается по снижению колониеобразования в селезенке реципиента. Это явление ⁽¹⁾ получило название «феномен инактивации несингенных стволовых клеток». Инактивирующими элементами, или «киллерами», как было установлено, являются лимфоциты, а клетки костного мозга выступают в роли «мишеней». В сочетании СВА : С57ВL лимфоциты мышей линии СВА являются лучшими киллерами, чем лимфоциты мышей линии С57ВL ⁽²⁾.

Известно, что лимфоидные органы — лимфатические узлы и селезенка, содержат лимфоциты двух типов, названные Т- и В-клетками ⁽³⁾. Возникает вопрос, что осуществляет инактивацию к.о.е.: Т-клетки, В-клетки или их смесь? Для выяснения поставленного вопроса изучена инактивирующая способность лимфоцитов от «Т-мышей» (Т-клетки), «В-мышей» (В-клетки), а также интактных и кортизонрезистентных клеток тимуса. Для сравнения была определена инактивирующая способность разных доз лимфоцитов из лимфатических узлов интактных мышей, т. е. смеси Т- и В-клеток. Лимфоциты получали от мышей линии СВА, костный мозг — от С57ВL/6.

Для получения «Т-мышей» ⁽⁴⁾ животным после облучения γ -лучами в дозе 850 р (мощность дозы 300 р/мин) трансплантировали внутривенно $5 \cdot 10^7$ сингенных тимоцитов, через 5—7 дней извлекали лимфатические узлы и селезенки, которые служили источником Т-клеток. Для получения «В-мышей» ^(5, 6) животных, интактных или тимэктомированных, облучали в дозе 850 р и защищали сингенным костным мозгом в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мыш. Через 1 неделю у интактных и 1—3 недели у тимэктомированных мышей извлекали лимфатические узлы и селезенки, которые использовали как источник В-клеток. Кортизонрезистентные тимоциты извлекали из тимусов мышей, получивших за 2 суток до извлечения клеток по 2,5 мг гидрокортизона внутривенно ⁽⁷⁾. Суспензии клеток костного мозга мышей С57ВL или смесь клеток костного мозга с Т или В лимфоцитами СВА вводили внутривенно гибридам (СВА \times С57ВL), летально облученным в дозе 850—900 р, через 4—24 часа после облучения. На 8—9 день подсчитывали число колоний в селезенках реципиентов. Результаты опытов представлены в табл. 1 и 2.

Изучение инактивирующей способности разных доз лимфоцитов из лимфатических узлов интактных мышей выявило возрастание инактивирующей способности с увеличением дозы киллеров при сохранении одной и той же дозы мишеней (табл. 1). Инактивация стволовых клеток на уровне 60% наблюдается уже при дозе лимфоцитов, равной 10^5 , на уровне 80% — при дозе $2 \cdot 10^5$, а при дозе $4 \cdot 10^5$ инактивация приближается к 100%. В отличие от интактных лимфоцитов, тимоциты способны инактивировать такое же количество аллогенных к.о.е. лишь в больших дозах. При дозе тимоцитов 10^6 инактивация отсутствует. Только начиная с дозы $2 \cdot 10^6$ у них проявляется инактивирующая способность на уровне 30%.

Таблица 1

Инактивация к.о.е. костного мозга С57ВL клетками интактных лимфатических узлов и тимуса СВА

	Лимфатические узлы							Тимус			
	0	2·10 ⁴	4·10 ⁴	10 ⁵	2·10 ⁵	4·10 ⁵	10 ⁶	0	10 ⁶	2·10 ⁶	5·10 ⁶
Соотношение клеток в смеси лимфоциты (или тимоциты): клетки костного мозга	—	1:10	1:5	1:2	1:1	2:1	5:1	—	5:1	10:1	25:1
Среднее число колоний в селезенке реципиента и число животных в группе (в скобках)	15,7± ±1,0 (128)	15,1± ±1,4 (41)	9,9± ±1,0 (30)	6,2± ±0,9 (55)	2,9± ±0,8 (36)	0,8± ±0,2 (74)	0,3± ±0,1 (46)	5,1± ±0,4 (26)	5,2± ±0,3 (26)	3,4± ±0,4 (29)	0 (9)
Индекс инактивации к.о.е., %	—	3,8	37,0	60,5	81,5	94,9	98,1	—	Нет инактивации	33,3	100

Примечание. Во всех опытах облученным реципиентам трансплантировали 2·10⁵ клеток костного мозга.

Таблица 2

Инактивация к.о.е. костного мозга С57ВL Т- и В-клетками СВА

Клетки, участвующие в инактивации к.о.е.	Число трансплантированных клеток СВА	Соотношение клеток в смеси	Число животных в группе	Индекс инактивации к.о.е., %
Кортизонрезистентные тимоциты	10 ⁵	1:2	13	Нет инакт.
	2·10 ⁵	1:1	21	85,6
	5·10 ⁵	2,5:1	18	94,5
Т-клетки из лимфатических узлов «Т-мышей»	10 ⁵	1:2	10	12,0
	2·10 ⁵	1:1	9	67,0
	5·10 ⁵	2,5:1	10	100,0
Т-клетки из селезенки «Т-мышей»	2·10 ⁵	1:1	14	55,0
	10 ⁶	5:1	29	59,1
	2·10 ⁵	1:1	5	18,0
В-клетки из лимфатических узлов «В-мышей»	4·10 ⁵	2:1	11	Нет инакт.
	5·10 ⁵	5:1*	5	34,2
	10 ⁶	5:1	4	Нет инакт.
В-клетки из селезенки «В-мышей»	2·10 ⁵ (а)	2:1*	8	25,0
	2·10 ⁵ (б)	1:1	8	32,0
	2·10 ⁵ (в)	2:1*	9	34,2

Примечание. Во всех опытах облученным реципиентам трансплантировали 2·10⁵ клеток костного мозга, в отмеченных звездочкой — 10⁵. а — В-клетки из селезенки интактных «В-мышей». б и в — В-клетки из селезенки тимэктомизированных «В-мышей», извлеченные через 1 неделю (б) и 3 недели (в).

И лишь при использовании дозы 5·10⁶ происходит 100% инактивация стволовых клеток.

При изучении инактивации к.о.е. популяциями Т-клеток оказалось, что клетки из разных источников (лимфоциты из лимфатических узлов и селезенки, кортизонрезистентные клетки тимуса) по инактивирующей способности сходны с интактными лимфоцитами (табл. 2). Ближе всего к интактным лимфоцитам находятся кортизонрезистентные тимоциты и клетки из лимфатических узлов «Т-мышей». В дозе 2·10⁵ кортизонрезистентные тимоциты инактивируют 85% стволовых клеток, Т-клетки из лимфатических узлов инактивируют 67%; в дозе 5·10⁵ соответственно 94 и 100%. Такие же результаты регистрируются при трансплантации облученным реципиентам смеси клеток интактных лимфатических узлов и костного мозга (ср. табл. 1 и 2). Однако, в отличие от интактных лимфоцитов, Т-клетки в дозе 10⁵ уже не инактивируют к.о.е. Лимфоциты из селезенки «Т-мышей» обладают несколько меньшей инактивирующей способностью. При использовании доз 2·10⁵ и 10⁶ инактивация не превышает 55 и 60% соответственно. Т-клетки из всех трех использованных источников, так же как и интактные лимфоциты и тимоциты, практически не образуют колонии в селезенке облученного реципиента.

Следует отметить, что клетки из лимфатических узлов «В-мышей»

тоже не дают колонии в селезенке реципиента, а клетки из селезенки образуют значительное количество колоний — до 12 на 10^5 трансплантированных клеточных элементов. В связи с этим определение инактивирующей способности больших доз В-клеток селезенки с помощью использованного приема было невозможно.

В отличие от Т-клеток, клетки как из лимфатических узлов, так и из селезенки «В-мышей», не обладают способностью инактивировать аллогенные стволовые клетки или эта способность выражена весьма слабо. При использовании В-клеток из лимфатических узлов в дозах от $2 \cdot 10^5$ до 10^6 индекс инактивации к.о.е. не превышал 34% и не возрастал с увеличением дозы В-клеток в трансплантируемой клеточной взвеси. Аналогичные данные получены в опытах с использованием клеток селезенки «В-мышей». При этом различия в инактивирующей способности В-клеток, полученных от предварительно тимэктомированных или нетимэктомированных мышей, отсутствовали (табл. 2).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в инактивации стволовых клеток основную, если не исключительную, роль играют Т-лимфоциты. Однако не все Т-клетки в одинаковой степени способны инактивировать к.о.е. Так, тимоциты лишь в больших дозах ($2 \cdot 10^6$ — $5 \cdot 10^6$) могут инактивировать стволовые клетки, тогда как кортизонрезистентные тимоциты, составляющие по нашим данным 2—3% от всей клеточной массы тимуса, осуществляют инактивацию на уровне 90—100% в значительно меньших количествах (2 — $5 \cdot 10^5$). Известно⁽⁸⁾, что кортизонрезистентные клетки тимуса представляют собой зрелую популяцию тимоцитов, которые постепенно мигрируют из тимуса и расселяются в лимфоидных органах. Следовательно, только зрелые Т-клетки могут осуществлять инактивацию к.о.е. Причем Т-клетки из селезенки несколько менее активны, чем Т-клетки из лимфатических узлов, что связано, вероятно, с неоднородностью популяции зрелых Т-клеток. Показано⁽⁹⁾, что Т-клетки из селезенки и лимфатических узлов различаются по ряду свойств.

Участвуют ли В-клетки в инактивации к.о.е.? Известно⁽¹⁰⁾, что В-клетки от мышей с врожденным отсутствием тимуса (*nude*) не обладают функцией клеток-киллеров. Сходные результаты получены и в наших опытах. Лимфоциты от «В-мышей» не инактивировали к.о.е. или инактивация была слабой. Последнее может быть связано с наличием у «В-мышей» некоторого количества Т-клеток либо в результате начавшегося восстановления Т-системы, либо в результате внесения Т-клеток с костным мозгом при получении «В-мышей»⁽¹¹⁾. Как было отмечено, интактные лимфоциты, содержащие как Т-, так и В-клетки, обладают несколько большей инактивирующей способностью, чем одни Т-лимфоциты. Известно также, что цитотоксическое действие смеси тимоцитов с селезеночными клетками на фибробласты выше суммарного действия отдельных компонентов смеси⁽¹²⁾. Не исключено, что присутствие В-клеток способствует усилению киллерной активности Т-клеток. Однако для однозначного ответа на вопрос об участии В-клеток в инактивации стволовых клеточных элементов требуются дополнительные опыты.

Институт биофизики
Министерства здравоохранения СССР
Москва

Поступило
14 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. В. Петров, Л. С. Сеславина, ДАН, т. 176, № 5, 1170 (1967). ² В. М. Манько, А. А. Михайлова, Л. С. Сеславина, В сб.: Общие вопросы патологии, т. 3, М., 1972. ³ G. Garotta, E. Clerici, Sperimentale, v. 120, № 6, 357 (1970). ⁴ J. Watson, R. Epstein, Immunol., v. 110, № 1, 31 (1973). ⁵ H. Wagner, J. Immunol., v. 109, № 3, 630 (1972). ⁶ T. O. Yoshida, B. Andersson, Scand. J. Immunol., v. 1, № 4, 401 (1972). ⁷ R. E. Tigelaar, R. Asofsky, J. Immunol., v. 110, № 2, 567 (1973). ⁸ D. Sabolovic, F. Dumont, Immunology, v. 24, № 4, 601 (1973). ⁹ J. D. Stobo, W. E. Paul, J. Immunol., v. 110, № 2, 362 (1973). ¹⁰ G. J. V. Nossal, Behring Instit. Mitteilugen, v. 52, 1 (1972). ¹¹ R. Bursleson, P. H. Levey, Cell. Immunol., v. 4, № 4, 305 (1972). ¹² P. Lonai, M. Feldman, Transplantation, v. 10, № 5, 372 (1970).