

Р. В. ПЕТРОВ, Р. Н. СТЕПАНЕНКО, А. А. МИХАЙЛОВА

**РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
В ЭФФЕКТЕ СТИМУЛЯЦИИ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ В
СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ИММУННЫХ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ И ИНТАКТНОГО КОСТНОГО МОЗГА**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 21 X 1974)

Ранее было показано, что совместное культивирование клеток лимфатических узлов, взятых на пике иммунного ответа от мышей, иммунизированных γ -глобулином лошади, с клетками интактного костного мозга приводит к увеличению в 2—3 раза интенсивности синтеза антител и неспецифических иммуноглобулинов (¹⁻³). Увеличение количества антител в смешанной культуре обусловлено не стимуляцией белкового синтеза в уже имеющихся антителопродуцентах, а появлением новых клеток, образующих антитела той же специфичности (⁴). Эффект увеличения антителообразования наблюдается при совместном культивировании как сингенных, так и аллогенных клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга (³) и проявляется при разделении клеточных популяций миллипоровыми фильтрами, т. е. в отсутствие непосредственного контакта взаимодействующих клеток (⁵). Эти особенности эффекта увеличения количества антителопродуцентов в смешанной культуре позволили нам выяснить вопрос, какая из клеточных популяций является источником новых клеток, синтезирующих антитела.

В настоящей работе мы провели дискриминативный анализ популяций антителопродуцирующих клеток в смешанных культурах с помощью H2-изоантисывороток, а также определили, в какой из клеточных популяций появляются новые антителопродуценты при разделении смешиваемых суспензий миллипоровыми фильтрами.

В опытах использовали гибридных мышей линий А и СВА, самцов и самок, весом 18—22 г. Животных иммунизировали в подушечки лап по 0,1 мл 10% суспензии эритроцитов барана. Через 3—4 недели проводили повторную иммунизацию тем же антигеном и аналогичным способом. На 4 сутки после реиммунизации мышей забивали декапитацией, извлекали стерильно подмышечные и паховые лимфатические узлы и готовили из них клеточные суспензии. Клетки культивировали 18—20 час. при 37° в среде 199 с добавлением сыворотки крупного рогатого скота при концентрации $3 \cdot 10^7$ кл/мл. Для получения смешанных культур во флаконы наливали по 1,5 мл суспензий каждой из двух исследовавшихся клеточных взвесей. В контрольных флаконах культивировали по 3 мл исходных клеточных суспензий.

Культивирование клеточных суспензий, разделенных миллипоровой мембраной с величиной пор 25 нм, проводили по методике, предложенной Л. А. Захаровой (⁵). По окончании культивирования количество клеток, синтезирующих антитела, определяли методом Эрне в модификации для выявления IgG-образующих клеток (⁶). О наличии взаимодействия между клетками судили по величине коэффициента стимуляции (K), который рассчитывали как отношение числа антителопродуцентов в смешанной культуре к числу антителопродуцентов в монокультуре.

Для получения анти-Н2 изоантисывороток мышам линии А еженедельно, в течение 6 недель, вводили подкожно по $5 \cdot 10^8$ клеток селезенки и лимфатических узлов от мышей линии СВА. Сыворотку получали через 8 суток после последней инъекции. Аналогичным способом была получена изоантисыворотка от мышей СВА против мышей линии А. Обработку клеточных суспензий проводили после окончания культивирования по методу Миллер и др. (7).

Таблица 1

Стимуляция иммунного ответа при совместном культивировании клеток различного гистологического происхождения

Компоненты смеси и генотип животных (иммунные лимфоузлы + интактный костный мозг)	Число бляшкообразующих клеток на 10^6 ядросодержащих				К	Р
	монокультура		миксткультура			
	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$		
А + А	5	$10 \pm 0,89$	6	$43 \pm 2,9$	4,3	0,01
СВА + СВА	5	$14 \pm 0,45$	5	$30 \pm 0,89$	2,1	0,01
А + СВА	11	$51 \pm 4,2$	10	$129 \pm 7,3$	2,2	0,01
СВА + А	4	$23 \pm 4,5$	4	$100 \pm 5,5$	4,3	0,01

Таблица 2

Изменение количества антителопродукторов в культурах клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга после обработки изоантисыворотками

Компоненты смеси и генотип животных	Число бляшкообразующих клеток на 10^6 ядросодержащих		К
	изоантисыворотка А против СВА	изоантисыворотка СВА против А	
Лимфоузлы А	$30 \pm 11,2$	$4 \pm 1,2$	4,6
Лимфоузлы А + костный мозг СВА	138 ± 43	$3 \pm 1,2$	2,3
Лимфоузлы СВА	2 ± 1	$82 \pm 8,8$	
Лимфоузлы СВА + костный мозг А	$4 \pm 1,8$	188 ± 24	

При совместном культивировании клеток иммунных лимфатических узлов, полученных от мышей на пике вторичного ответа к эритроцитам барана, с сингенными и аллогенными клетками интактного костного мозга происходит увеличение количества антителопродукторов в 2—4 раза (табл. 1). Таким образом, эффект стимуляции образования антител в смешанной культуре наблюдается при использовании не только белкового (γ -глобулина лошади), но и корпускулярного антигена (эритроцитов барана).

В табл. 2 представлены результаты опытов, в которых смешанные культуры аллогенных клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга по окончании культивирования обрабатывали изоантисывороткой против одной из смешиваемых популяций: либо против клеток лимфоузлов, либо против клеток костного мозга.

Обработка смеси клеток различного генотипа изоантисывороткой, цитотоксичной по отношению к клеткам иммунных лимфатических узлов, приводила к исчезновению бляшкообразующих клеток. Аналогичная обработка смешанных культур изоантисывороткой, цитотоксичной для клеток костного мозга, не вызывала угнетения бляшкообразования и не отменяла проявление эффекта стимуляции.

Результаты экспериментов с изоантисыворотками были подтверждены в опытах по культивированию клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга, разделенных миллипоровой мембраной. Если в верхнюю камеру 2-камерной ячейки поместить иммунные лимфатические узлы, а в нижнюю — интактный костный мозг, то количество антителопродукторов на 10^6 ядросодержащих клеток в верхней камере составит 49 ± 12 , что в 2,75 раза больше, чем в контроле, где в нижней камере вместо костного мозга находилась культуральная среда (в контроле число бляшкообразующих клеток на 10^6 ядросодержащих составляло в верхней камере $18 \pm 2,9$). В камере, где находились клетки костного мозга, антителопродукторы отсутствовали.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что при совместном культивировании клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга в популяции клеток лимфатических узлов появляется дополнительное количество антителопродукторов под влиянием клеток костного мозга.

Поскольку стимуляция антителообразования в смешанной культуре наблюдается и при разделении клеточных суспензий миллипоровой мембраной, в этом эффекте, по-видимому, принимает участие гуморальный фактор, выделяемый клетками интактного костного мозга. Возможно, что этот фактор способствует подключению к синтезу антител дополнительного количества клеток в популяции иммунных лимфоузлов, не участвующих в антителообразовании без такого влияния.

Институт биофизики
Министерства здравоохранения СССР
Москва

Поступило
10 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Михайлова, Р. В. Петров, Л. А. Захарова, ДАН, т. 197, № 1, 209 (1971).
² А. А. Михайлова, Л. А. Захарова, Р. В. Петров, ДАН, т. 203, № 3, 948 (1972).
³ R. V. Petrov, A. A. Mikhailova, Cell. Immunol., v. 5, 392 (1972). ⁴ A. A. Mikhailova, J. Madar, T. Hrabá, Folia Biol., v. 19, 315 (1973). ⁵ Л. А. Захарова, Н. С. Галкина, Бюлл. эксп. биол. и мед., № 9, 67 (1974). ⁶ D. W. Dresser, M. H. Wortis, Nature, v. 288, № 5013, 859 (1965). ⁷ J. F. A. P. Miller, G. F. Mitchell, J. Exp. Med., v. 128, № 4, 201 (1968).