Н. В. Вельская, Ю. П. Вельский, М. Г. Данилец, Е. С. Трофимова, В. К. Патрушев, Е. Ю. Шерстобоев, В. И. Агафонов

ИММУНОСУПРЕССИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОСТНО-МОЗГОВЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ПРИ Th2-ЗАВИСИМОМ ТИПЕ ИММУННОГО ОТВЕТА

НИИ фармакологии Томского научного центра СО РАМН

Показано, что при иммунологической толерантности на модели полуаллогенной беременности у мышей происходит усиление иммуносупрессивной и NO-синтезирующей активностей неприлипающих клеток костного мозга. Данные изменения проявлялись в отношении Т-лимфоцитов, полученных как от интактных, так и от беременных животных.

The study has shown immunosupression activity of bone marrow mice cells in Th 2- dependent type of immune response. It has been found that immunosupression and NO-synthesized activity strengthening of inadherent bone marrow cells has taken place at immunological tolerance on the model of semiallogeneic pregnancy. These changes have been seen with respect to T-lymphocytes obtained as from intact so from pregnant animals.

Известно, что состояние иммунной системы при беременности характеризуется как толерантное и сопровождается поляризацией Т-хелперов (Th) по типу 2 [11]. Соответствующие этому состоянию изменения затрагивают не только местные, но и центральные органы иммунитета, в том числе костный мозг. Клетками, обладающими иммунорегуляторными свойствами, являются незрелые кроветворные клетки разных ростков — естественные супрессивные клетки (ЕСК), которые неспецифически подавляют иммунологические реакции in vivo и in vitro с помощью различных факторов, таких, как оксид азота (NO), трансформирующий фактор роста β (ТФРβ) и др. Их роль в обеспечении толерантности изучена недостаточно. Тем не менее показано, что ЕСК мигрируют из костного мозга в селезенку мышей во время сингенной беременности и продуцируют ТФРβ [4, 5, 7], а также в децидуальную ткань человека, вырабатывая нуклеозиды [8] или ТФРβ [6] в качестве супрессивных факторов. Остается неясным, изменяется ли при беременности естественная супрессивная активность (ЕСА) костного мозга и играет ли при этом роль NO, который является единственным супрессорным фактором ЕСК интактного костного мозга [3]. Следует отметить, что активность ЕСК при типе 2 поляризации Т-лимфоцитов ранее не изучались. Недавно нами было показано, что при развитии гиперчувствительности немедленного типа ЕСА кариоцитов и синтез ими NO возрастают [1].

Целью данной работы явилось исследование иммуносупрессивной и NO-синтезирующей активностей ЕСК костного мозга животных при поляризации типа 2, связанной с толерантностью, в отношении Т-лимфоцитов как интактного организма, так и поляризованных по типу 2.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 20 мышах-самках линии BALB/cY в возрасте 8—16 нед. Животных, полученных из питомника НИИ фармакологии Томского научного центра СО РАМН (I категории, согласно сертификату), содержали в неполной барьерной системе. Мыши получали ad libitum стерилизованный гранулированный корм и кипяченую воду, подкисленную соляной кислотой до pH 4,0—4,5.

Мышей-самок линии BALB/c скрещивали с самцами линии C57BL/6, материал для исследования забирали на 17—19-е сутки гестации. Контролем служили фертильные самки BALB/c. Мышей забивали путем цервикальной дислокации. С помощью перфузии бедренной и большеберцовой костей выделяли клетки костного мозга, суспензию спленоцитов получали в результате гомогенизации селезенок. Суспензии пропускали через 4-слойный капрон, промывали и ресуспендировали в культуральной среде, состоящей из среды RPMI 1640 ("Sigma", США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ICN,

Таблица 1

Продукция ИФН-γ и ИЛ-10 Т-лимфоцитами селезенки беременных мышей *(X ± m)*

Цитокин	Группа животных	Содержание цитокина, % от контроля
ИФН-γ	Контроль	100,0 ± 4,8
	Опыт	65,8 ± 12,2*
ИЛ-10	Контроль	100,0 ± 7,3
	Опыт	174,2 ± 10,7*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 звездочка — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

США), 20 мМ HEPES ("Sigma", США), 0.05 мМ 2-меркаптоэтанола ("Sigma"), 50 мкг/мл гентамицина ("Flow Lab.", Великобритания) и 2 мМ L-глутамина ("Flow Lab."). В экспериментах использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток. Клетки культивировали в атмосфере с 5% CO_2 при абсолютной влажности.

Иммуносупрессивную активность оценивали по способности неприлипающих к пластику миелокариоцитов подавлять пролиферацию клеток-мишеней — активированных митогеном сингенных спленоцитов. Для удаления прилипающих клеток миелокариоциты культивировали в течение 1—1,5 ч в пластиковых чашках Петри. Затем полученные клетки в различных соотношениях культивировали в течение 60—64 ч в 96-луночных планшетах вместе с клетками-мишенями ($2 \cdot 10^5$ клеток на лунку) в присутствии 4 мкг/мл конканавалина А ("Sigma"). За 16 ч до окончания культивирования вносили ^{3}Н-тимидин по 0.5 мкКи на лунку, включение которого оценивали с помощью β-счетчика. Супрессивную активность вычисляли (в %) по формуле: 100- (1 — МиЭ/М), где МиЭ — количество импульсов в 1 мин в лунках (клетки-эффекторы + клетки-мишени), М — количество импульсов в 1 мин в лунках с клетками-мишенями.

Супернатант Т-лимфоцитов получали в результате культивирования в течение 24 ч спленоцитов ($5 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл) с конканавалином А (4 мкг/мл). Содержание интерферона-γ (ИФН-γ) оценивали в биотесте по способности исследуемого супернатанта индуцировать выработку NO миелокариоцитами

[9], а содержание интерлейкина-10 (ИЛ-10) определяли иммуноферментным методом с помощью тест-системы ("Amersham Biosciences"). Продукцию NO оценивали по содержанию нитритов с помощью реактива Грейса.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В исследуемые сроки мы наблюдали изменения продукции цитокинов Т-лимфоцитами селезенок беременных мышей (табл. 1): снижение уровня ИФН-γ и повышение содержания ИЛ-10. Выявленные изменения профиля вырабатываемых Т-клетками цитокинов согласуются с данными литературы и свидетельствуют о наличии поляризации Т-хелперов по типу 2 с развитием толерантности.

Иммуносупрессивная активность клеток костного мозга беременных мышей в отношении лимфоцитов интактных сингенных животных (табл. 2) при соотношении эффектор/мишень 1:1 была в 1,5 раза выше, чем у контрольных животных, во столько же раз больше ЕСК продуцировали и NO. При соотношении 0,5:1 в контроле супрессивной активности не наблюдалось, а у беременных мышей она составила 34,5% и также сопровождалась усилением синтеза NO.

Повышение иммуносупрессивной активности ЕСК, как видно из полученных результатов, по крайней мере частично, является следствием повышенного синтеза NO, поскольку известно, что ЕСК продуцируют NO после получения соответствующего индуцирующего сигнала от клеток-мишеней (ИФН-γ) [3]. Спонтанной продукции NO клетками костного мозга беременных мышей не наблюдалось, следовательно это усиление синтеза связано со стимуляцией его выработки цитокина-ми клеток-мишеней. Спектр цитокинов, продуцируемых Т-клетками при толерантности, как известно, качественно отличается от интактного, в частности по способности стимулировать синтез NO. У лимфоцитов, поляризованных по Th2-пу-ти, количество вырабатываемого ИФН-γ резко снижается, при этом увеличивается продукция цитокинов, подавляющих синтез NO [10]. Исходя из этих соображений, мы оценили действие ЕСК беременных мышей на пролиферацию лимфоцитов, полученных также от беременных мышей (поляризованных).

ЕСК костного мозга беременных мышей подавляли пролиферацию поляризованных лимфоцитов сильнее, чем костно-мозговые клетки интактных животных (табл. 3). Так, при соотношении эффектор/мишень 0,5:1 в контроле супрессивной активности практически не выявлено, в то время как ЕСК мышей опытной группы она составила 23,4%

Таблица 2

Способность костно-мозговых клеток беременных мышей подавлять пролиферацию лимфоцитов интактных животных и продуцировать NO (X ± га)

Соотноше-ние эффек-тор\мишень Группа	Соотноше-ние эффек-тор\мишень Включение тимиди-на, имп\мин	Концентра-ция нитри-тов, мкМ
Мишени, культиви-рованные в отсут-ствие эффекторов	0 1	44 715,0 ± 4738,0 < 2
Интактные мыши (контроль)	0.5:1	40 991.0 ± 3045.0 (8,3) 9,9 ± 0,1
Беременные мыши (опыт)		29 276,0 ± 2278,0* (34,5) 16,0 ± 1,1*
Интактные мыши (контроль)	1 1	26 490,0 ± 3049,0 (40,8) 13,5 ± 1,6
Беременные мыши (опыт)		16 693,0 ± 1136,0* (62,7) 20,3 ± 1,1*

Примечание. Здесь и в табл. 3 — миелокариоциты без мишеней включали не более 3000 имп/мин ^{3}H-тимидина и не вырабатывали детектабельных количеств NO; в скобках указан процент супрессии.

Таблица 3

Способность костно-мозговых клеток беременных мышей подав лять пролиферацию лимфоцитов беременных животных и проду цировать NO *(X ± m)*

Группа	Соотноше-ние эффек-тор/мишень	Включение тимиди-на, имп/мин	Концентра-ция нитри-тов, мкМ
Мишени, культиви-рованные в отсут-ствие эффекторов	0:1	45 185,0 ± 3381,0	< 2
Интактные мыши (контроль)	0,5:1	44 855,0 ± 1912,0 (0,7)	4,1 ± 0,8
Беременные мыши (опыт)		34 622,0 ± 2546,0* (23,4)	16,9 ± 2,9"
Интактные мыши (контроль)	1:1	25 349.0 ± 1488.0 (43,9)	15.3 ± 1.4
Беременные мыши (опыт)		17 405.0 ± 1643,0* (61,5)	21,9 ± 0,7*

при этом синтез NO был в 4 раза выше, чем в контроле. При соотношении эффектор/мишень 1:1 значения как иммуносупрессивной, так и NO-синтезирующей активности миелокариоцитов беременных животных в 1,4 раза превышали аналогичные показатели интактных мышей.

Таким образом, иммуносупрессивная и NO-синтезирующая активность клеток костного мозга животных с развившейся толерантностью в отношении как интактных, так и поляризованных лимфоцитов повышается. Ранее мы получили аналогичные данные при гиперчувствительности немедленного типа [1], а также при различных видах опухолевого роста [2]. Иными словами, наблюдается парадоксальная закономерность: у ЕСК, подвергшихся влиянию цитокинов Th2; экспрессия NO-синтазы в ответ на соответствующий стимул повышается.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вельская Н. В., Вельский Ю. П., Патрушев В. К.* и др. // Иммунология. - 2004. - Т. 25. № 4. - С. 213-215.
2. *Вельский Ю. П., Вельская Н. В., Данилец М. Г.* и др. // Бюл. экспер. биол. — 2003. — Прил. № 2. — С. 68—75.
3. *Angulo I., Rodriguez. R., Garcia B.* et al. // J. Immunol. — 1995. - Vol. 155. - P. 15-26.
4. *Brooks-Kaiser J. C., Murgita R. A., Hoskin D. W. //* J. Reprod. Immunol. - 1992. - Vol. 21. - P. 103-125.
5. *Brooks-Kaiser J. C., Hoskin D. W. //* J. Reprod. Immunol. — 1993. - Vol. 25. N 1. - P. 31-49.
6. *Clark D. A., Flanders K. C., Banwatt D.* et al. // J. Immunol. - 1990. - Vol. 144. - P. 3008-3014.
7. *Hoskin D. W., Bowser D. A., Brooks-Kaiser J. C.* //J. Leukocyte Biol. - 1992. - Vol. 51. N 6. - P. 649-656.
8. *LI X., Xu J., Guo M.* et al. // Int. J. Oncol. -1999. - Vol. 14. - P. 687-694.
9. *Migliorini P., Corradin G., Corradin S. B. //* J. Immunol. Meth. - 1991. - Vol. 139. - P. 107-114.
10. *Mosmann T. R., Cherwinski H., BondM. W.Qta\.//L* Immunol. - 1986. - Vol. 136. N 7. - P. 2348-2357.
11. *Weemann T. G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T. R. //* Immunol. Today. - 1993. - Vol. 14. - P. 353-356.

Поступила 12.01.05