



УДК 612.006-092.19:612.017.1-063

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕПЛООВОГО ШОКА АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ АЛЛОСПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ

© 1999 г. Д. Б. Казанский[#], В. Н. Петрищев, А. А. Штиль, А. Д. Чернышева, Н. В. Сернова,
И. Ф. Абронина, Л. А. Побезинский, Е. Л. Агафонова

Онкологический научный центр РАМН, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Поступила в редакцию 25.02.98 г. Принята к печати 06.07.98 г.

Поиск адекватного метода избирательного тестирования функциональной активности Т-клеток памяти в течение долгих лет остается ключевой проблемой, от решения которой зависит прогресс в области изучения иммунологической памяти. Мы предлагаем простые варианты тестирования активности Т-клеток памяти CD8⁺, специфичных к аллоантигену H-2K^b, основанные на измерении их пролиферации в ответе на прогретые аллогенные спленоциты и клетки аллогенных опухолей *in vitro*. Показано, что первичный пролиферативный ответ на аллоантиген в культуре *in vitro* не развивается, если аллогенные антигенпрезентирующие клетки подвергнуты острому (45°C, 1 ч) либо умеренному (42°C, 30 мин) тепловому шоку. Блок первичного аллогенного ответа наивных Т-лимфоцитов на прогретые спленоциты не отменяется при добавлении экзогенного интерлейкина 2 и не связан с делецией либо супрессией антигенреактивных клонов. Напротив, долгоживущие Т-клетки памяти CD8⁺, индуцированные в первичном ответе *in vivo*, способны к пролиферативному ответу на прогретые аллогенные стимуляторы, несущие иммунизирующий антиген. Различия наивных Т-клеток и Т-клеток памяти в ответе на аллогенные стимуляторы, подвергнутые тепловому шоку, могут быть обусловлены жесткой зависимостью наивных Т-клеток от индуцибельной костимуляции, опосредованной лигандом В7, экспрессия которого подавляется в культурах, содержащих стимуляторы, подвергнутые тепловому шоку. Эти данные можно рассматривать как указание на существование механизма регуляции специфического клеточного иммунитета, в основе которого лежит нарушение костимуляторных функций в результате клеточного стресс-ответа, индуцированного в клетках, представляющих антиген.

Ключевые слова: лимфоцит; клетки памяти; аллореактивность; тепловой шок.

В процессе иммунного ответа на антигены бактерий, вирусов и опухолей в организме образуется популяция лимфоидных клеток, способных к ускоренному и усиленному ответу на тот же антиген, введенный повторно. Эта популяция получила название клеток памяти. На ее возникновении и существовании в организме в течение продолжительного времени основаны все методы вакцинации, известные на сегодняшний день. Как и наивные лимфоциты, клетки памяти могут

быть подразделены на популяции В-лимфоцитов, способных к продукции антител в ответе на антигенный стимул, и Т-лимфоцитов, выполняющих регуляторные и специфические цитотоксические функции, а также помогающих В-клеткам в процессе их антигензависимой дифференцировки. Т-клетки памяти в свою очередь могут быть разделены на клетки CD4⁺, функция которых важна в ответе В-клеток на бактериальные антигены и CD8⁺, осуществляющие прямой антигенспецифический лизис инфицированных вирусами или трансформированных клеток. Поиск адекватного метода тестирования функциональной активности Т-клеток памяти в течение долгих лет остается одной из ключевых проблем, тормозящих прогресс в изучении иммунологической памяти [1]. Очевидно, что такой метод может быть основан на особенностях Т-клеток памяти, отличающих их от других субклассов Т-клеток. В их числе можно назвать: 1) более раннее, чем у наивных Т-клеток, появление эффекторных функций и быстрое достижение максимума ответа после вторичной активации [2]; 2) высокую аффинность их анти-

Сокращения: МНС – major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости; MLR – mixed lymphocyte reaction – реакция смешанной культуры лимфоцитов; MLTC – mixed lymphocyte tumor culture – смешанная культура лимфоцитов и опухолевых клеток; CTL – cytotoxic T lymphocyte – цитотоксический Т-лимфоцит; TCR – T cell receptor – Т-клеточный рецептор; APC – antigen presenting cell – клетка, представляющая антиген; hsp – heat shock proteins – белки теплового шока; RT-PCR – polymerase chain reaction with reverse transcriptase – полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой; IL-2 – интерлейкин 2; ИС – индекс стимуляции.

[#] Автор для переписки (тел.: (8095) 324-55-13; e-mail: kazansky@dataforce.net).

генсвязывающих рецепторов [3]; 3) гиперреактивность и способность к стимуляции гораздо более низкими дозами специфических антигенных пептидов в отличие от доз, которые необходимы для индукции ответа наивных Т-лимфоцитов [4]; 4) присутствие на их поверхности ряда постактивационных маркеров таких, как CD45RO, β -цепь рецептора к IL-2, а также различия в плотности ряда других маркеров – высокая плотность CD44 и Ly6C и низкая – CD62L [5]; 5) большую устойчивость к воздействию кальциевых ионофоров по сравнению с наивными Т-лимфоцитами [6]; 6) пониженные требования к целому ряду контактных взаимодействий с APC в процессе вторичной антигензависимой дифференцировки.

Методы тестирования популяции Т-клеток памяти, основанные на быстром возникновении у нее эффекторных функций, являются достаточно убедительными для демонстрации этого субкласса Т-лимфоцитов, но не позволяют достичь их селективной активации, последующего обогащения и клонирования. Из-за сходства используемых методов индукции, а также из-за недостаточно четких различий в скорости достижения максимумов первичного и вторичного ответов субпопуляциями Т-клеток очень трудно определить, является ли клетка активированной первично или это ее вторичная встреча с антигеном. Весьма сложно также достоверно сравнивать аффинности антигенсвязывающих рецепторов Т-клеток. В исследованиях, проведенных ранее, для этой цели использовали конкуренцию с антителами к молекулам МНС на APC либо блокаду корцепторных молекул CD4 или CD8 на мембране Т-клетки, что могло привести к интерференции с путями проведения антигенспецифического сигнала. Оценки экспрессии постактивационных маркеров (CD45RO⁺ у человека и CD45RB^{lo} у мыши) и молекул клеточной адгезии (CD44^{high} и CD62L^{lo}) сейчас наиболее широко используются для характеристики субпопуляций Т-клеток памяти, однако, они не дают никакого представления об их функции и специфичности, а также возможности отличить долгоживущие клетки памяти от их ранних активированных предшественников [7, 8]. Выделение же Т-клеток памяти на градиентах перколла, содержащих иономицин, не приводит к селективному выделению клонов Т-клеток памяти, специфичных к конкретному антигену [6]. Таким образом, существует острая необходимость в разработке метода, используя который, можно было бы достичь селективной активации, пролиферации и обогащения этого субкласса Т-клеток, осуществить последующее клонирование и изучение полученных клонов.

В середине 70-х годов при изучении первичных и вторичных иммунологических реакций *in vitro* стало известно, что одно из неперменных условий индукции первичной MLR и первичных СТЛ – метаболическая активность стимулирующих клеток. Для успешного протекания этих реакций до-

пустима лишь необратимая блокада пролиферации стимуляторов облучением либо обработкой митомицином С [9–12]. Точные причины этого явления не установлены, но вполне вероятно, что индукция пролиферации наивных Т-лимфоцитов в высокой степени зависит от индуцируемой экспрессии костимулирующих молекул антигенпрезентирующими клетками и контакта с ними в процессе первичного ответа.

В отличие от наивных Т-лимфоцитов Т-клетки памяти могут быть активированы “непрофессиональными” APC, не экспрессирующими костимулирующие лиганды B7-1 и B7-2 [13–15]. Более того, предшественники вторичных СТЛ могут быть активированы клетками, облученными ультрафиолетом, APC, убитыми прогреванием, замораживанием–оттаиванием и даже фрагментации их мембран. Наивные лимфоциты не способны к пролиферации и дифференцировке в СТЛ в этих условиях. Дифференцировка же вторичных СТЛ из клеток памяти и появление у них цитотоксических функций не требует пролиферации и происходит быстро – в течение суток. Для такой дифференцировки достаточно контакта с посторонней аллогенной клеткой или с Т-клеточным митогеном [9, 16–22]. В то же время неоднократно отмечалось, что пролиферация в первичной MLR не может быть вызвана стимуляторами, инактивированными прогреванием при 45°C [23–25]. Для объяснения этого явления привлекались главным образом гипотезы о селективной активации Т-супрессоров прогретыми аллогенными клетками [25, 26]. Но впоследствии, когда существование Т-супрессоров как отдельного субкласса Т-клеток подверглось обширной критике [27, 28] и работы по этой теме перестали появляться в печати, эффект не получил должного объяснения, а различия в пролиферативном потенциале наивных Т-клеток и Т-клеток памяти в этой системе так и не были выявлены. При активации предшественников вторичных СТЛ в ответ на прогретые (45°C, 60 мин) аллогенные стимуляторы *in vitro* мы обратили внимание на тот факт, что на 4-й день культивирования в культурах, содержащих отвечающие клетки (респондеры) предварительно иммунизированных животных, число жизнеспособных лимфоцитов значительно (в 5 и более раз) превышает число жизнеспособных клеток в нестимулированных культурах, причем многие из них – бласты. Напротив, в культурах клеток, содержащих респондеры неиммунизированных животных и прогретые аллогенные стимуляторы, количество жизнеспособных клеток постепенно снижается, как и в нестимулированных культурах. Аллогенная система в данном случае дала нам редкую возможность связать эти эффекты со статусом примирования животных антигеном и сопоставить вторичные ответы на антиген с первичными, которые можно “увидеть” в аллогенной системе из-за высокой частоты клонов, отве-

чающих на аллогенные молекулы МНС в норме. По этой причине мы сочли целесообразным исследовать возможность функционального тестирования Т-клеток памяти, основанную на их пролиферации в MLR в ответ на прогретые аллогенные стимуляторы. Более ранние свидетельства о неспособности APC, облученных ультрафиолетом [9, 12, 17, 18], к индукции первичных СТЛ навели нас на мысль, что наблюдаемый эффект может быть следствием клеточного стресс-ответа, индуцированного в APC, и побудили провести анализ воздействия теплового шока на функции антигенпрезентирующих клеток в аллогенной системе – проблеме, совершенно не изученной, несмотря на десятки тысяч работ, опубликованных в мире по этим темам в отдельности.

В данной работе мы приводим доказательства того, что в отличие от наивных Т-лимфоцитов, Т-клетки памяти CD8⁺ животных, примированных антигеном, отвечают интенсивной антигенспецифической пролиферацией на APC, инактивированные прогреванием. Различия в пролиферации наивных клеток и Т-клеток памяти в ответ на прогретые стимуляторы не могут быть объяснены селективной индукцией супрессорных клеток в первичной культуре *in vitro*, а также делецией антигенреактивных клонов наивных Т-лимфоцитов. Эти различия наблюдаются в условиях как острого, так и умеренного теплового шока APC и являются следствием различий между наивными Т-клетками и Т-клетками памяти в их зависимости от костимулирующих лигандов на мембране антигенпрезентирующих клеток.

Способность Т-клеток памяти к пролиферации в ответ на прогретые аллогенные стимуляторы. Для индукции пролиферативного ответа респондеры, выделенные из интактных мышей B10.D2(R101) (K^dI^dD^b), а также мышей, примированных внутрибрюшинно 2.5×10^7 клеток тимомы EL4 (K^bD^b) за 2 мес. до постановки эксперимента, в соотношении 1 : 1 смешивали с сингенными стимулирующими клетками (стимуляторами) мышей B10.D2(R101) либо аллогенными стимуляторами мышей C57BL/6 (K^bI^dD^b), обработанными прогреванием (45°C, 1 ч) либо облученными. Через 4 сут в смешанных культурах оценивали пролиферацию по включению [³H]тимидина в течение 18 ч.

На рис. 1 представлены результаты, показывающие, что хотя спленоциты интактных мышей B10.D2(R101) пролиферируют в ответ на облученные аллогенные стимуляторы от мышей C57BL/6, они не отвечают на стимуляторы, обработанные прогреванием. Такие же клетки, выделенные от животных, предварительно примированных тем же аллоантигеном (H-2K^b), представленным на поверхности клеток тимомы EL4 (K^bD^b), активно пролиферируют как в ответ на облученные, так и на прогретые аллогенные стимуляторы. Аналогичные различия в ответе наив-

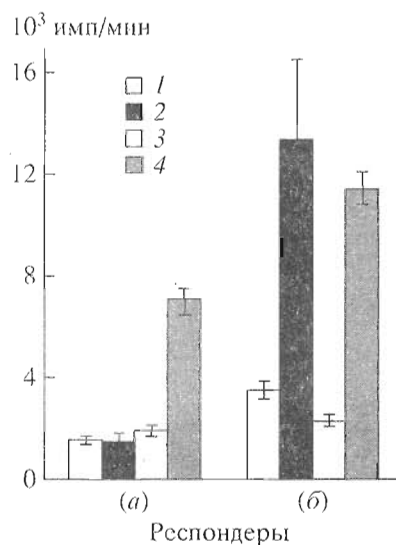


Рис. 1. Интенсивность пролиферативного ответа респондеров интактных (а) и примированных (б) мышей B10.D2(R101) на сингенные B10.D2(R101) (1, 3) и аллогенные C57BL/6 (2, 4) стимуляторы, облученные (3, 4) и подвергнутые острому тепловому шоку (1, 2). Показаны данные одного репрезентативного эксперимента. По оси ординат – среднее значение (из четырех повторов) радиоактивности параллельных проб \pm средняя ошибка.

ных Т-клеток и Т-клеток памяти мы наблюдали, когда стимуляторы были подвергнуты умеренному тепловому шоку (42°C, 30 мин) с последующим их облучением в дозе 25 Гр, а также в ответе на аллогенные стимуляторы, фиксированные параформальдегидом (данные не приведены). Эти данные указывают на значительные различия в условиях активации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти, а также позволяют предположить критическую зависимость активации наивных Т-лимфоцитов от индуцируемой экспрессии костимулирующих лигандов аллогенными APC.

Условия индукции и динамика пролиферативного ответа Т-клеток памяти. На рис. 2 представлены результаты исследования динамики развития пролиферативного ответа спленоцитов примированных мышей B10.D2(R101) на прогретые стимуляторы. Различия в ответе культур, содержащих сингенные и аллогенные прогретые стимуляторы, становятся заметными уже через 2 сут культивирования и увеличиваются до 4–5-х сут. Для определения оптимальных соотношений респондеров и стимулирующих клеток фиксированное количество респондеров примированных животных помещали в лунки 96-луночных круглодонных планшетов (3×10^5 клеток на лунку) и добавляли различные количества прогретых (45°C, 1 ч) аллогенных стимуляторов. Через 4 сут в смешанных культурах оценивали пролиферацию по включению [³H]тимидина в течение 18 ч. Определение оптимальных соотношений отвеча-

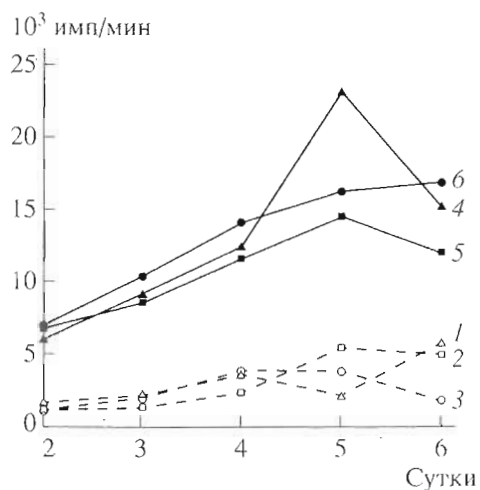


Рис. 2. Динамика развития пролиферативного ответа респондеров примированных мышей B10.D2(R101) на сингенные (1, 2, 3) и аллогенные (4, 5, 6) стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку. Стимуляторы и респондеры использовали в соотношениях: 0.25 : 1 (1, 4), 0.5 : 1 (2, 5) и 1 : 1 (3, 6). По оси абсцисс – сроки, прошедшие со дня постановки эксперимента. По оси ординат – средние значения из четырех повторов, определенные по радиоактивности параллельных проб. Средняя ошибка в каждой точке не превышала 15% среднего арифметического.

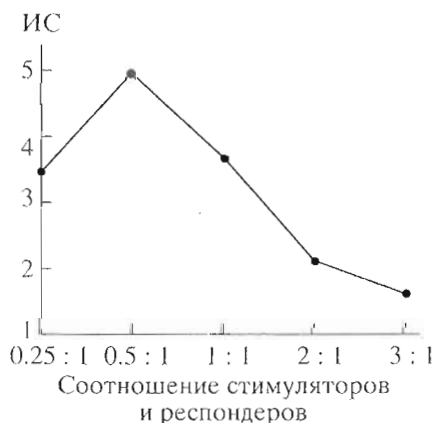


Рис. 3. Зависимость пролиферативного ответа респондеров примированных мышей B10.D2(R101) на прогретые аллогенные стимуляторы от соотношения стимуляторов и респондеров. По оси абсцисс – соотношения прогретых стимуляторов и респондеров. По оси ординат – индекс стимуляции аллогенной MLR. Средняя ошибка в каждой точке не превышала 15% среднего арифметического.

ющих и стимулирующих клеток показало, что оптимальный ответ наблюдается при соотношениях 1 : 0.5 и 1 : 1 (рис. 3). Увеличение доли стимуляторов по отношению к отвечающим клеткам приводило к угнетению ответа. По всей видимости, реакция Т-клеток памяти зависит от контактных взаимодействий, так как пролиферативный ответ лучше развивался при постановке реакции

в лунках круглодонных планшетов, чем плоскодонных (данные не приведены).

Специфичность пролиферации Т-клеток памяти, индуцированной прогретыми стимуляторами. В дальнейших экспериментах в качестве стимуляторов использовали клетки аллогенных опухолей – тимомы EL4 (K^bD^b) от мышей C57BL/6 (H-2^b), саркомы MC-11 (K^bD^b) от мышей C57BL/10 (H-2^b) и тимомы BW5147 (K^kD^k) от мышей AKR (H-2^k). Мышей B10.D2(R101) иммунизировали 2.5×10^7 клеток тимомы EL4, через 2 мес. выделяли спленоциты и определяли пролиферацию в ответ на прогретые клетки аллогенных опухолей. В предварительных экспериментах было установлено, что в отличие от реакции на нормальные аллогенные клетки, оптимальное развитие реакции Т-клеток памяти мышей B10.D2(R101) на клетки аллогенных опухолей наблюдается при соотношении респондеров и стимуляторов 1 : 0.1, т. е. при значительно меньшем количестве добавленных стимуляторов.

В табл. 1 приведены результаты, показывающие, что пролиферативный ответ Т-клеток памяти является антигенспецифическим, так как он наблюдается лишь тогда, когда прогретые стимуляторы несут иммунизирующий антиген (молекулу H-2K^b), представленный на клетках тимомы EL4 и саркомы MC-11, но не молекулы MHC другого гаплотипа (H-2K^k и H-2D^k), представленные на клетках тимомы BW5147. Из полученных результатов следует также, что клетки интактных животных не способны к ответу на прогретые клетки аллогенных опухолей.

Корцепторы, экспрессируемые клетками памяти в ответе на аллогенные стимуляторы, подвергнутые прогреванию. Иммунизация антигенами гистосовместимости может приводить не только к активации клеточных реакций, зависящих от Т-лимфоцитов, но и к экспансии клонов В-лимфоцитов, продуцирующих специфические антитела. Поэтому важно было выяснить, являются ли определяемые нами клетки памяти Т- либо В-лимфоцитами. Для этого спленоциты мышей B10.D2(R101), примированных клетками тимомы EL4, обрабатывали супернатантами гибридом GK1.5 и 3.168 (цитотоксический титр 1/100) в конечном разведении 1/20 в течение 30 мин на холоду, добавляли комплемент кролика в конечном разведении 1/20 и инкубировали в течение 45 мин при 37°C. Такую обработку повторяли дважды, после чего респондеры отмывали и использовали для постановки аллогенной MLR с прогретыми сингенными и аллогенными стимуляторами.

На рис. 4 представлены данные, показывающие, что одновременная обработка спленоцитов, содержащих Т-клетки памяти, антителами к CD4 и CD8 и комплементом (устранение из популяции всех зрелых Т-лимфоцитов) приводит к практически полному исчезновению пролиферации. Та-

ким образом, пролиферация в данной системе действительно обусловлена присутствием Т-лимфоцитов. Обработка антителами к CD8 и комплементом значительно подавляет ответ, а антителами к CD4 и комплементом оказывается менее эффективной. Из этого следует, что главная популяция, от которой зависит развитие пролиферативного ответа, – Т-лимфоциты CD8⁺. Наши предварительные данные по исследованию экспрессии антигенов CD3, CD4 и CD8 методом FACScan на поверхности бластных клеток, присутствующих в культурах на 5-й день после индукции ответа, показывают, что клетки CD8⁺ являются главными эффекторными клетками, пролиферирующими в данной системе. Это справедливо даже в том случае, когда вторичная стимуляция проводится прогретыми аллогенными клетками, несущими молекулы МНС класса II – наиболее эффективными в индукции пролиферативного ответа Т-лимфоцитов CD4⁺. Учитывая тот факт, что первичная иммунизация проводилась в условиях различий по единственной молекуле гистосовместимости класса I (H-2K^b), распознаваемой Т-лимфоцитами CD8⁺, можно заключить, что в ответе на прогретые аллогенные стимуляторы избирательно пролиферируют именно те Т-лимфоциты, которые были примированы аллоантигеном в первичном ответе.

Механизм неответа наивных Т-лимфоцитов на прогретые стимуляторы. Как правило, отсутствие иммунного ответа на специфический антиген является следствием физической или функциональной необратимой инактивации (делеции) антигенспецифических клонов, вхождения их в состояние анергии, либо индукцией супрессорных механизмов. Чтобы выяснить, какой из этих трех механизмов ответствен за отсутствие пролиферации наивных Т-лимфоцитов в ответ на прогретые аллогенные стимуляторы, мы добавляли прогретые сингенные и аллогенные стимуляторы в культуры, содержащие наивные отвечающие клетки и затем, через различные сроки инкубации респондеров с прогретыми клетками – облученные стимуляторы – аллогенные либо сингенные. В том случае, если бы предынкубация с прогретыми клетками приводила к угнетению ответа на добавленный впоследствии облученный стимулятор, эффект можно было бы трактовать как следствие супрессии либо делеции клонов. В противном случае – как состояние обратной анергии. Для выяснения иммунологической специфичности эффектов представлялось целесообразным использовать экспериментальную схему, основанную на применении спленоцитов мышей C57BL/6 в качестве респондеров и двух *bm*-мутантов по молекуле МНС класса I H-2K^b (*bm1* и *bm3*, индуцирующих минимальные перекрестные реакции) в качестве аллогенных стимуляторов.

Таблица 1. Пролиферация наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти мышей R101 в ответе на аллогенные опухолевые клетки, подвергнутые острому тепловому шоку при температуре 45°C, 1 ч

Стимуляторы	Интенсивность пролиферации*, имп/мин	
	наивные Т-лимфоциты	Т-клетки памяти
R101 (K ^d I ^d b)	340 ± 45	335 ± 19
EL-4 (K ^b D ^b)	664 ± 53	10721 ± 480**
MC-11 (K ^b D ^b)	715 ± 26	12195 ± 408**
BW5147 (K ^b D ^b)	604 ± 31	495 ± 35

Представлены репрезентативные данные одного из трех экспериментов.

* Среднее значение из четырех повторов, определенное по радиоактивности параллельных проб ± средняя ошибка.

** Достоверные отличия ($P < 0.001$).

Респондеры, полученные от мышей C57BL/6, помещали в лунки 96-луночных круглодонных планшетов в количестве 3×10^5 клеток на лунку и добавляли аллогенные либо сингенные стимуляторы, предварительно подвергнутые умеренному тепловому шоку, в соотношениях с респондерами от 0.25 : 1 до 2 : 1. В различные сроки после постановки такой “первичной” реакции добавляли облу-

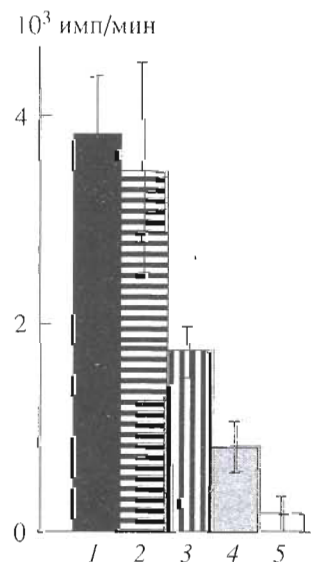


Рис. 4. Аллогенный ответ респондеров примированных мышей B10.D2(R101) на прогретые сингенные и аллогенные стимуляторы после совместной (5) и раздельной обработки моноклональными антителами к корецепторам CD4 (3), CD8 (4) в присутствии комплемента и комплементом без антител (2). В качестве контроля использовали необработанную популяцию спленоцитов (1). По оси ординат – уровень пролиферации (разность между средними значениями радиоактивности параллельных проб, определенных из четырех повторов для аллогенных и сингенных культур).

Таблица 2. Пролиферативный ответ наивных Т-лимфоцитов на прогретые аллогенные стимуляторы после добавления облученных аллогенных спленоцитов

Номер опыта	Добавленные стимуляторы		Индексы стимуляции аллогенного ответа* при соотношении прогретых стимуляторов и респондеров			
	прогретые	облученные	0.25 : 1	0.5 : 1	1 : 1	2 : 1
1	bm1	bm1 (0)	0.88	1.23	0.83	0.93
	bm1	bm3 (0)	1.36	1.73	2.14***	1.22
	C57BL/6	bm1 (0)	0.99	1.00	0.79	0.83
	C57BL/6	bm3 (0)	1.37	1.55	1.31	0.79
2	bm1	bm1 (1)	3.48	6.12***	6.15***	10.86***
	bm1	bm3 (1)	5.56	13.71**	15.02***	12.61***
	C57BL/6	bm1 (1)	1.12	1.13	0.92	0.20
	C57BL/6	bm3 (1)	1.66	1.97	1.51	1.38
3	bm1	bm1 (1)	1.02	1.76	1.50	0.69
	bm1	bm3 (1)	3.74	4.74**	3.51**	1.89
4	bm1	bm1 (4)	1.54**	1.03	2.16**	1.27
	bm1	bm3 (4)	1.30	1.38	1.26**	0.82
	C57BL/6	bm1 (4)	0.81	0.37	1.32	1.23
	C57BL/6	bm3 (4)	0.75	0.83	0.77	0.87

В круглых скобках указан день добавления облученных стимуляторов.

* Данные представлены как индексы стимуляции аллогенного ответа – в данном случае, как отношение аллогенного ответа на облученный стимулятор в присутствии прогретых клеток к аллогенному ответу, индуцированному тем же облученным стимулятором в отсутствие прогретых клеток, т.е. $IS = (a - b)/(c - d)$, где a – СРМ в ответе на облученный аллогенный стимулятор в присутствии прогретых клеток, b – СРМ в ответе на облученный сингенный стимулятор в присутствии прогретых клеток, c – СРМ в ответе на облученный аллогенный стимулятор в отсутствие прогретых клеток, d – СРМ в ответе на сингенный стимулятор в отсутствие прогретых клеток.

** Достоверные отличия, $P < 0.05$.

*** $P < 0.001$.

ченные (25 Гр) аллогенные спленоциты. На 4-е сут после добавления облученных стимуляторов пролиферацию в смешанных культурах оценивали по включению [^3H]тимидина в течение 18 ч. Результаты экспериментов представлены в табл. 2. Добавление свежих облученных аллогенных стимуляторов в момент постановки реакции приводило к нормальному развитию аллогенного ответа вне зависимости от того, присутствовали в культуре прогретые стимуляторы или нет (опыт 1, 1-я строка). В случае, когда к наивным респондерам одновременно добавляли прогретые стимуляторы bm1 и облученные стимуляторы bm3, развивалась отчетливая реакция на прогретые стимуляторы (опыт 1, 2-я строка). Ни в одном эксперименте присутствие в культуре аллогенных прогретых клеток не вызывало угнетение ответа на облученные стимуляторы, добавленные впоследствии, вне зависимости от того, какой интервал времени проходил между добавлением прогретых стимуляторов и облученных, и были ли эти стимуляторы идентичны.

Таким образом, стало ясно, что отсутствие пролиферации наивных Т-лимфоцитов в ответ на аллогенные стимуляторы, подвергнутые тепловому шоку, не может быть объяснено ни делецией клонов, ни индукцией супрессоров аллогенного ответа. Наоборот, в отдельных случаях наблю-

далась стимуляция аллогенного ответа, когда прогретые стимуляторы присутствовали в культуре исходно (опыты 2 и 4, 1-я строка). Наибольшее усиление ответа наблюдалось в культурах, в которые были добавлены сначала аллогенные прогретые клетки, а затем посторонние облученные аллогенные стимуляторы (опыты 1–3, 2-я строка). Если в культуры добавляли прогретые клетки, сингенные респондерам, то никакого усиления ответа на облученные аллогенные стимуляторы не наблюдалось (опыты 1, 2 и 4, строки 3 и 4). Эти факты говорят о том, что усиление ответа в результате предынкубации с прогретыми аллогенными стимуляторами в этой системе обусловлено взаимодействием TCR-отвечающих лимфоцитов с аллогенными молекулами МНС на поверхности прогретых клеток. Таким образом, прогретые стимуляторы успешно “примируют” респондеры через взаимодействие TCR с молекулами МНС. Хотя сами по себе прогретые аллогенные стимуляторы не способны вызвать пролиферацию Т-клеток, активационный блок снимается при последующем добавлении аллогенных облученных спленоцитов.

Сходный, хотя и менее выраженный эффект восстановления пролиферации наивных Т-клеток в ответ на прогретые аллогенные стимуляторы может быть получен при добавлении в культуру

сингенных облученных спленоцитов (рис. 5). Спленоциты мышей C57BL/6 (3×10^5 клеток на лунку) смешивали в разных соотношениях со стимуляторами мышей bm1 и bm3, подвергнутыми умеренному тепловому шоку, и на следующие сутки добавляли свежесыведенные сингенные облученные спленоциты (3×10^5 клеток на лунку). Через 4 сут в смешанных культурах оценивали пролиферацию по включению [^3H]тимидина за 18 ч. В культурах, содержащих наивные респондеры и прогретые аллогенные стимуляторы, аллогенный ответ отсутствовал (данные не приведены). Однако добавление сингенных облученных клеток в такие культуры приводило к заметному усилению пролиферации в культурах.

Таким образом, снятие активационного блока в ответ на прогретые аллогенные клетки не является следствием дополнительной антигенной стимуляции, а обусловлено неспецифическим сигналом, поступающим от метаболически интактных облученных клеток. Из данных, представленных на рис. 6, следует, что, по всей видимости, сигнал не является цитокином. К интактным и иммунным респондерам (3×10^5 клеток на лунку) добавляли прогретые (45°C , 1 ч) спленоциты мышей R101 либо клетки тимомы EL4 ($\text{K}^{\text{bD}^{\text{b}}}$) и 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-2. Через 4 сут в смешанных культурах оценивали пролиферацию по включению [^3H]тимидина в течение 18 ч. Добавление высоких концентраций IL-2 (100 МЕ/мл) не восстанавливало аллогенный ответ наивных лимфоцитов, а лишь неспецифически стимулировало пролиферацию в культурах, содержащих как сингенные, так и аллогенные прогретые стимуляторы – индексы стимуляции наивных лимфоцитов близки к 1. Использование кондиционированной среды из MLR, а также супернатантов культур, стимулированных конканавалином А, вместо рекомбинантного IL-2 оказалось также безуспешным (данные не приведены). Напротив, в тех же условиях Т-клетки памяти давали выраженный аллогенный ответ. Это обстоятельство навело нас на мысль, что тепловой шок стимуляторов приводит к нарушению более ранних контактных взаимодействий респондеров с аллогенными APC.

В первичном иммунном ответе такие взаимодействия реализуются в результате физического контакта Т-лимфоцитов с дендритными клетками, являющимися профессиональными APC, обладающими уникальной способностью к активации первичного ответа Т-лимфоцитов [29]. Для индукции такого ответа недостаточно одного лишь взаимодействия TCR с молекулой MHC. Анализ литературы последних лет показывает, что контакт Т-лимфоцита с дендритной клеткой опосредован взаимодействием ряда дополнительных пар лигандов, таких как B7-1/CD28, LFA-1/ICAM, CD4(CD8)/MHC II (MHC I), ICAM/LFA-1, CD2/LFA-3. При этом взаимодействие первых двух из указанных пар критически

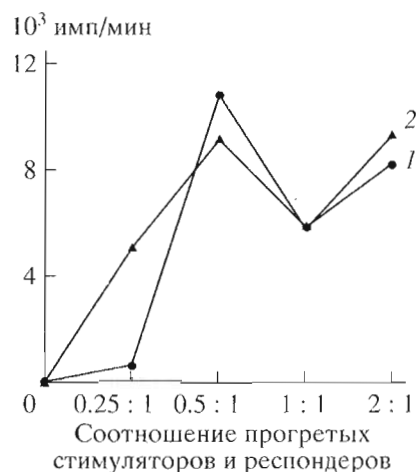


Рис. 5. Зависимость пролиферативного ответа наивных респондеров мышей C57BL/6 на прогретые аллогенные стимуляторы мышей bm1 (1) и bm3 (2) в присутствии облученных сингенных спленоцитов от соотношения прогретых стимуляторов и респондеров. По оси ординат – уровень пролиферации (разность значениями радиоактивности проб в культурах, содержащих прогретые аллогенные и сингенные стимуляторы в тех же соотношениях).

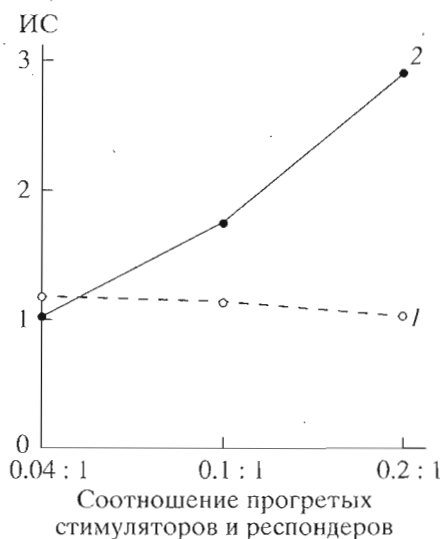


Рис. 6. Зависимость от соотношения прогретых стимуляторов и респондеров уровня пролиферации респондеров интактных (1) и иммунных (2) мышей B10D2(R101) на прогретые аллогенные клетки тимомы EL4($\text{K}^{\text{bD}^{\text{b}}}$) в присутствии экзогенного IL-2. Средняя ошибка в каждой точке не превышала 15% среднего арифметического.

важно для успешной индукции экспрессии CD40L (gp39) на поверхности Т-лимфоцита в процессе его активации. А экспрессия CD40L в свою очередь создает условия для активации профессиональных APC через CD40 и ведет к индуцированной экспрессии костимуляторов B7-2, B7-1 и, возможно, других, пока не идентифицированных.

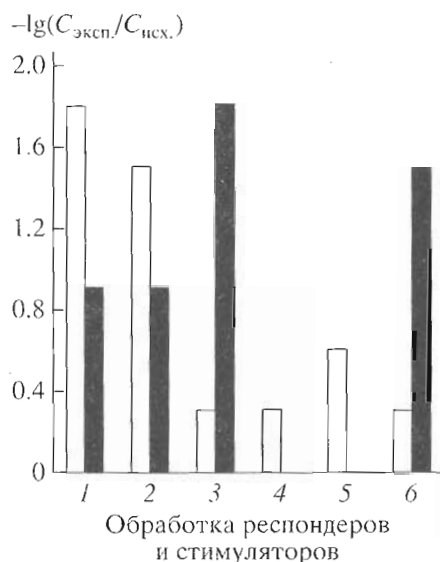


Рис. 7. Результаты RT-PCR на препаратах суммарной мРНК генов B7-1 (белые столбики) и HSP70.1 (черные столбики), выделенной из сингенных и аллогенных смешанных культур интактных спленоцитов и спленоцитов, подвергнутых умеренному тепловому шоку (42°C, 30 мин, 25 Гр, обозначена индексом sh). По оси абсцисс – комбинации и обработка клеток, использованных для постановки MLR: 1 – интактные спленоциты B10.D2(R101); 2 – интактные спленоциты B10.D2(R101) + интактные спленоциты C57BL/10; 3 – спленоциты B10.D2(R101)^{sh}; 4 – спленоциты B10.D2(R101)^{sh} + спленоциты C57BL/10^{sh}; 5 – интактные спленоциты B10.D2(R101) + спленоциты B10.D2(R101)^{sh}; 6 – интактные спленоциты B10.D2(R101) + спленоциты C57BL/10^{sh}. Представлены репрезентативные данные одного из двух независимых экспериментов, подтвержденные при постановке PCR кДНК. По оси ординат – отрицательный логарифм разведения образца мРНК, при котором наблюдалось образование видимой электрофоретической полосы амплифицированного продукта.

Взаимодействия костимуляторных молекул семейства B7 поверхности активированных таким образом APC с молекулой CD28 поверхности Т-лимфоцита дают Т-лимфоциту сигнал для повышения уровня мРНК IL-2 и увеличения плотности рецепторов к IL-2 [30, 31]. Дендритные клетки являются уникальным типом клеток, экспрессирующих B7-1 постоянно и, вероятно, именно этим объясняется их особая роль в инициации первичного иммунного ответа после контакта с Т-лимфоцитом. На других типах клеток, способных выполнять роль профессиональных APC (В-лимфоцитах и макрофагах), B7 появляется лишь в результате взаимодействия CD40 с CD40L на поверхности уже активированных Т-лимфоцитов и, по всей видимости, играет функциональную роль на более поздних стадиях ответа [32, 33].

Учитывая эти факты, мы предположили, что наивные Т-лимфоциты при инкубации с прогрессивными аллогенными стимуляторами входят в со-

стояние обратимой анергии вследствие исчезновения костимулирующих сигналов, поставляемых интактными дендритными клетками, в процессе их первичного контакта. Очевидно, что развитие стресс-ответа APC могло бы приводить к исчезновению либо подавлению экспрессии B7, последующей дефективной экспрессии рецепторов IL-2 [34] и, тем самым, к подавлению первичного аллогенного ответа даже в присутствии высоких концентраций этого цитокина.

Экспрессия B7-1 в смешанных культурах, содержащих стимуляторы, подвергнутые тепловому шоку. Чтобы проверить эту гипотезу, исследовали влияние теплового шока на уровень мРНК генов B7-1 и HSP70.1 в аллогенной и сингенной MLR. На рис. 7 представлены результаты RT-PCR генов HSP70.1 и B7-1 на препаратах суммарной мРНК, выделенной из смешанных культур (6×10^5 мононуклеаров) через 4 ч инкубации. После ревертазной реакции ряда двукратных разведений образцов мРНК проводили 35 циклов PCR для B7-1 и 32 цикла для hsp70 и β -актина. После завершения PCR реакционную смесь наносили на гель агарозы, содержащий бромистый этидий, и разделяли электрофорезом. Гели фотографировали и анализировали, используя УФ-трансиллюминатор. Определение экспрессии β -актина использовали как контроль идентичности условий реакции для разных образцов (как правило, она не различалась более чем в два раза при постановке параллельных проб). Результаты (по оси ординат) представляли как отрицательный логарифм разведения образца мРНК, при котором можно было наблюдать образование видимой электрофоретической полосы амплифицированного продукта. Представленные результаты свидетельствуют о том, что тепловой шок, которому были подвергнуты клеточные популяции, взаимодействующие в MLR, вызывает в них классические проявления стресс-ответа с усилением экспрессии гена HSP70.1. При этом наблюдается быстрое и драматическое подавление экспрессии гена B7-1, которое можно обнаружить уже через 2 ч после индукции теплового шока. Примечателен тот факт, что значительное снижение уровня мРНК B7-1 наблюдается даже в культурах, содержащих интактные спленоциты, что может свидетельствовать о существовании межклеточных сигнальных взаимодействий, приводящих к генерализованному подавлению экспрессии этого гена. Практически идентичные данные получены нами при PCR образцов кДНК, полученной с использованием d(T)₁₅-праймеров, что указывает на обусловленность этого эффекта подавлением образования именно новосинтезированной РНК этого гена (данные не приведены). По всей видимости, это подавление имеет место в дендритных клетках, присутствующих среди спленоцитов, использованных нами в качестве стимуляторов, так как именно в дендритных клетках ген B7-1 экс-

прессируется конститутивно [30]. Такое исчезновение костимулирующей активности может быть обусловлено двумя механизмами. Во-первых, снижение экспрессии гена B7-1 на уровне мРНК может приводить к снижению экспрессии его на мембране. Во-вторых, отсутствие костимуляции может быть обусловлено ускоренной гибелью APC. Уже через сутки после теплового шока в популяции спленоцитов, содержащей APC, число жизнеспособных клеток снижается в три раза по сравнению с необработанными культурами. Это может быть связано с индукцией запрограммированной клеточной гибели, которая наблюдается в условиях воздействия на клетки гипертермии, а также ультрафиолета, окислительного стресса и ряда других воздействий [35]. По всей видимости, в использованной нами системе гибнуть могут и дендритные клетки, подвергнутые стрессу на клеточном уровне, так как недавно показано, что в присутствии Т-лимфоцитов и специфического антигена наблюдается ускоренная гибель дендритных клеток линии XS52 по механизму апоптоза, если их предварительно облучить ультрафиолетом [36].

Учитывая тот факт, что и ультрафиолетовое облучение и тепловой шок приводят к индукции экспрессии гена hsp70, различающейся лишь в динамике ее появления [37], а также то, что на поверхности дендритных клеток, выделенных из человеческой крови и подвергнутых действию ультрафиолета, наблюдается подавление экспрессии B7 [38], можно заключить, что исчезновение костимулирующей способности APC в обеих системах является следствием индукции клеточного стресса и может быть опосредовано единым регуляторным механизмом, приводящим к альтернативной экспрессии генов B7-1 и HSP70.1. По всей видимости, на более поздних этапах ответа APC в этих системах гибнут в результате контакта с рецепторами Т-лимфоцитов, что необратимо отменяет костимуляцию.

В отличие от данных, опубликованных другими авторами [25, 26, 39], нам не удалось обнаружить каких-либо признаков супрессии в культурах *in vitro*, содержащих прогретые аллогенные APC. Данные, полученные нами, указывают скорее на то, что наивные респондеры в таких культурах получают от прогретых APC лишь специфический сигнал, которого оказывается недостаточно для индукции пролиферативного ответа. Второй, антигеннеспецифический сигнал может быть предоставлен респондерам в результате внесения в культуру свежесыведенных облученных спленоцитов.

Большой интерес представляет природа этого сигнала, и пока неясно, обусловлен ли он прямым действием костимуляторов, присутствующих на облученных клетках конститутивно, или их экспрессия индуцируется под воздействием CD40L на отвечающих Т-клетках, преактивированных прогретыми аллогенными стимуляторами. Напротив,

Т-клеткам памяти для пролиферации достаточно сигнала, предоставляемого прогретыми или фиксированными аллогенными стимуляторами при том условии, что они несут на своей поверхности молекулу MHC, идентичную использованной для иммунизации. Следует отметить, что эти данные указывают лишь на относительную независимость активации Т-клеток памяти от костимуляции, поскольку их ответ угнетается при избытке прогретых стимуляторов, а также в условиях, не обеспечивающих контакт клеток между собой. По всей видимости, им необходим контакт друг с другом (либо с сингенными APC) для успешной активации. Если это действительно так, то различия в активационных требованиях наивных Т-клеток и Т-клеток памяти сводятся к различиям в уровне неспецифического костимулирующего сигнала, необходимого для индукции пролиферации.

В последние годы появился ряд свидетельств тому, что наивные Т-лимфоциты активируются тогда, когда специфический и костимулирующий сигналы поставляются одной и той же APC, а для успешной активации Т-клеток памяти эти сигналы могут быть разобщены [40, 41]. Однако наши данные не поддерживают этой точки зрения и указывают лишь на различия в порогах костимуляции, достаточной для индукции пролиферативного ответа. И если активация наивных Т-лимфоцитов критически зависит от индуцируемой экспрессии костимуляторов на APC, то клеткам памяти вполне достаточно костимуляторов, экспрессируемых конститутивно.

На наш взгляд, причины этого расхождения обусловлены различиями в использованных экспериментальных системах. В работе [40] в качестве носителей специфического и неспецифического сигналов были использованы трансфицированные клетки COS и линии фибробластов, и, по всей видимости, крупные размеры этих клеток могли значительно уменьшить вероятность одновременного контакта Т-лимфоцита с двумя трансфектантами одновременно. Вероятно, именно это обстоятельство послужило причиной противоречивых результатов, полученных с применением сходных методических приемов в последующих работах [41, 42].

Учитывая критически важную роль костимуляторов семейства B7 для индукции иммунного ответа в широком ряду экспериментальных систем, следует полагать, что обнаруженный феномен имеет фундаментальное значение для понимания процессов иммунорегуляции в условиях, сопровождающихся индукцией стресс-ответа APC. В частности, усиленная экспрессия гена HSP70 в нормальных тканях животных опухоленосителей, отмеченная ранее [43], может указывать на важную роль клеточного стресс-ответа в подавлении специфического противоопухолевого иммунитета. Эти наблюдения указывают также на механизм системного подавления специфического ци-

токсического ответа на опухоли облученных ультрафиолетом животных и индуцированные солнечным светом у человека [44, 45]. Они раскрывают причины более успешных трансплантаций аллогенных и ксеногенных опухолей у животных, которым предварительно ввели прогретые опухолевые клетки – явления, описанного еще в начале века. Они же дают возможность для более глубокого понимания причин продления жизни аллогенных и ксеногенных трансплантатов и даже их полного приживления, достигаемого трансфузиями клеток доноров (прогретых либо облученных ультрафиолетом) в сочетании с циклоспорином А [39, 46].

Таким образом, нами получена удобная, легко воспроизводимая и четкая система избирательного функционального тестирования долгоживущих клеток памяти CD8⁺. Мы показали, что индукция клеточного стресс-ответа в APC приводит к глубокому подавлению конститутивной экспрессии гена B7-1, что может дать объяснение отсутствию первичного иммунного ответа на антигены опухолей и развитию антигенспецифической толерантности в ответ на трансфузию метаболически неактивных APC.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лабораторные животные. В работе использованы мыши инбредных линий C57BL/6 (B6) (K^bD^b), C57BL/10 (B10) (K^bD^b), B10.D2(R101) (K^dD^b) и мутанты мышей C57BL/6 по молекулам MHC I класса – bm1 и bm3 и по молекуле MHC II класса – bm12, полученные из вивария Онкологического научного центра РАМН.

Приготовление клеточных суспензий. Стимулирующие (стимуляторы) и отвечающие лимфоциты (респондеры) выделяли из селезенок мышей в гомогенизаторе Поттера с коническим пестиком осторожным выдавливанием из стромы органа. Полученные клетки трижды отмывали центрифугированием (200g, 7 мин) в среде Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва) с добавлением 10% прогретой (56°C, 30 мин) сыворотки крупного рогатого скота (производства Киевского мясокомбината). Для разделения субпопуляций Т-лимфоцитов методом комплементзависимого цитолиза в качестве отмывочной среды использовали 0.2% раствор БСА (Sigma) в среде RPMI-1640 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва). Жизнеспособные клетки подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина.

Реакция MLR. Для постановки MLR 3×10^5 спленоцитов мышей B10.D2(R101) или C57BL/6 инкубировали в присутствии аллогенных и сингенных стимуляторов в полной среде: RPMI-1640, содержащей 5% сыворотки человека, 0.016% гентамицин сульфата (Производственное объединение "Мосхимфармпрепараты"), 4 мМ L-глутамин

(Serva), 20 мМ HEPES (Sigma) и 50 мкМ 2-меркаптоэтанол (Merck) при различных соотношениях респондеров и стимуляторов при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажностью. Культуру MLTC готовили сходным образом, используя метод [47] с незначительными вариациями. Интенсивность пролиферации (CPM) определяли по включению [³H]тимидина в течение 18 ч. Аллогенный ответ подсчитывали как разность между включением [³H]тимидина в культуры с аллогенными и сингенными стимуляторами. Индексы стимуляции (ИС) подсчитывали как отношение этих величин.

Антитела. В качестве источника моноклональных антител к антигенам CD4 и CD8 Т-лимфоцитов мыши использовали супернатанты гибридом GK1.5 (IgG2a) и 3.168 (IgG2a) соответственно, которые применяли для разделения клеток методом комплементзависимого лизиса с комплементом кролика, отобранном на высокую специфическую и низкую спонтанную активность. Для описания состава клеточных популяций методом FACScan использовали следующие антитела к поверхностным антигенам лимфоцитов мыши: меченные изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) анти-TCR α/β (Clone H57-597), анти-CD4 (Clone H129.19), анти-CD3 (Clone 29B) и меченные фикоэритрином (PE) анти-CD44 (Clone IM7.8.1) и анти-CD8α (Clone 53-6.7). Все антитела получены от фирмы Sigma.

Клеточные линии. Клетки тимомы EL4 (K^bD^b) и саркомы MC-11 (K^bD^b) получали в асцитной форме, пассируя их в сингенных мышах C57BL/6 и C57BL/10 соответственно. Клетки тимомы BW5147 (K^bD^k) от мышей AKR пассировали *in vitro* в среде RPMI-1640, содержащей 4 мМ L-глутамин и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Иммунизацию мышей R101 проводили внутрибрюшинной инъекцией каждому животному 2.5×10^7 опухолевых клеток тимомы EL4 или саркомы MC-11. Через 2 мес. после иммунизации спленоциты таких мышей использовали в экспериментах как источник клеток памяти, специфичных к молекуле K^b.

Обработка стимулирующих клеток. Прогревание стимулирующих клеток проводили в водяной бане, поддерживающей температуру с точностью 0.2°C. Умеренный тепловой шок индуцировали прогреванием клеток в полной среде при 42°C в течение 30 мин с последующей инкубацией при 37°C в течение 60 мин. Для дальнейшего использования в качестве стимулирующих клеток в MLR их подвергали γ-излучению от источника ¹³⁷Cs в дозе 25 Гр. Острый тепловой шок индуцировали инкубацией при 45°C в течение 60 мин. После такой обработки клетки не окрашивались трипановым синим в течение нескольких часов, затем наблюдался рост числа клеток с нарушенной проницаемостью мембран, ускоренный по

сравнению с необработанными клетками. Через сутки число жизнеспособных клеток в культурах, подвергнутых умеренному тепловому шоку и облучению, составляло около 1/3 числа жизнеспособных клеток в необработанных культурах, а клетки, подвергнутые прогреванию при 45°C, погибали практически полностью. Клетки аллогенных опухолей, использованные в работе, инактивировали прогреванием при 45°C. Последующие измерения катаболизма МТТ [48] и включения [³H]тимидина показали, что через сутки эти клетки являлись метаболически неактивными. Фиксацию стимулирующих клеток осуществляли в 0.1% растворе параформальдегида (Sigma) в растворе Хенкса в течение 30 мин, после чего клетки отмывали от параформальдегида не менее пяти раз.

RT-PCR. Для определения экспрессии генов HSP70.1 и V7-1 суммарную РНК экстрагировали из культивируемых клеток в количестве 6×10^5 общепринятым методом [49] с небольшими модификациями. Выделенную РНК растворяли в деионизованной воде. Для защиты от РНКаз в раствор РНК вносили RNazine (Promega) в количестве 80 ед. на 100 мкл. Для RT-PCR использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: AAGAACGCGCTCGAGTCTTAT (1) и CTGGTACAGCCCACTGATGAT (2) для определения экспрессии гена HSP70.1 [50], TGACAAAGTGGTGTCTGTCTGTC (3) и CGGAAGCAAAGCAGGTAATCCT (4) для гена V7-1 [51], а также CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG (5) и TCTTCATGGTGTAGGAGCCA (6) – для определения мРНК β -актина [52], использованной в качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК и синтеза кДНК. Праймеры 2, 4, 6 являются антисмысловыми; праймеры 1, 3, 5 – смысловыми. Продукты PCR имеют длины 300, 287 и 623 п. о. соответственно. Стандартная реакционная смесь для обратной транскрипции с конечным объемом 10 мкл включала 67 мМ Трис-НСl, рН 8.8 (при 25°C), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 1 мМ MnCl₂, dNTP (200 мкМ каждый), 20 пМ праймер антисмысловой или смысловой (контроль), 8–500 нг суммарной РНК, 4 ед. акт. ДНК-полимеразы *Tth*. Реакционную смесь инкубировали 10 мин при 70°C. После проведения обратной транскрипции в пробирку добавляли 40 мкл смеси для PCR, содержащей 67 мМ Трис-НСl, рН 8.8 (при 25°C), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 3.5 мМ MgCl₂, dNTP (200 мкМ каждый) и 20 пМ дополняющий праймер. После денатурации (5 мин при 95°C) проводили 35 циклов PCR для V7.1 и 32 цикла для *hsp70* и β -актина со следующими режимами: 94°C, 45 с, 55°C, 45 с, 72°C, 90 с. После завершения PCR 10 мкл реакционной смеси наносили на 2% гель агарозы, содержащий бромистый этидий и разделяли электрофорезом в Трис-боратном буфере в режиме 8 В/см в течение 45 мин. Гели фотографировали и анализировали, используя УФ-трансиллюминатор. Результаты представляли как отрицательный логарифм раз-

ведения образца мРНК, при котором можно было наблюдать образование видимой электрофоретической полосы амплифицированного продукта.

Статистическая обработка. Для каждой экспериментальной группы подсчитывали среднее арифметическое и среднюю ошибку выборки. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Средняя ошибка в каждой точке не превышала 15% от среднего арифметического.

Данная работа стала возможной благодаря грантам № 96-04-50796 и 96-04-50799, полученных из Российского фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Janeway Ch., Travers P. // Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. Garland Publishing Inc., Hamden, 1995.
2. Lalvani A. // J. Exp. Med. 1997. V. 186. P. 859–865.
3. Brondz B.D., Osipova T.V. // Biull. Eksp. Biol. Med. 1988. V. 105. P. 694–697.
4. Pihlgren M., Dubois P.M., Tomkowiak M., Sjogren T., Marvel J. // J. Exp. Med. 1997. V. 184. P. 2141–2152.
5. Sprent J. // Cell. 1994. V. 76. P. 315–322.
6. Miller R.A., Flurkey K., Molloy M., Luby T., Stadecker M.J. // J. Immunol. 1991. V. 147. P. 3080–3086.
7. Zimmermann C., Brdushcha-Riem K., Blaser C., Zinkernagel R., Pircher H. // J. Exp. Med. 1996. V. 183. P. 1367–1375.
8. Tough D.F., Sprent J. // J. Exp. Med. 1994. V. 179. P. 1127–1135.
9. Yamada H., Nomoto K., Takeya K. // Microbiol. Immunol. 1979. V. 23. P. 357–368.
10. Song C.W., Rhee J.G., Kim T., Kersey J.H., Levitt S.H. // Cancer. Clin. Trials. 1981. V. 4. P. 331–342.
11. Weinberger O., Herrmann S., Mescher M.F., Benacerraf B., Burakoff S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 1796–1799.
12. Vink A. A., Strickland F.M., Bucana C., Cox P.A., Raza D.B., Yarosh D.B., Kripke M.L. // J. Exp. Med. 1996. V. 183. P. 1491–1500.
13. Azuma M., Cayabyab M., Buck D., Phillips J.H., Lanier L.L. // J. Exp. Med. 1992. V. 175. P. 353–360.
14. Azuma M., Cayabyab M., Phillips J.H., Lanier L.L. // J. Immunol. 1993. V. 150. P. 2091–2101.
15. Croft M., Bradley L.M., Swain S.L. // J. Immunol. 1994. V. 152. P. 2675–2685.
16. MacDonald H.R., Sordat B., Cerottini J.C., Brunner K.T. // J. Exp. Med. 1975. V. 142. P. 622–636.
17. Hurme M., Bang B.E., Sihvola M. // J. Immunol. 1980. V. 125. P. 2484–2488.
18. Jensen P.J. // J. Immunol. 1983. V. 130. P. 2071–2074.
19. Wehrmaker A., Lehman V., Droge W. // Cell. Immunol. 1986. V. 101. P. 290–298.
20. Wagner H., Rollinghoff M. // Eur. J. Immunol. 1976. V. 6. P. 15–21.
21. Wagner H., Hess M., Feldmann M., Rollinghoff M. // Transplantation. 1976. V. 21. P. 282–288.
22. Alaba O., Law L.W. // J. Exp. Med. 1978. V. 148. P. 1435–1439.

23. Goeken N.E., Ballaz Z.K., Staggs T.S. // Hum. Immunol. 1986. V. 16. P. 234–246.
24. Boyer C.M., Kostyu D.D., Brissette C.S., Amos D.B. // Cell. Immunol. 1986. V. 101. P. 440–453.
25. Loertscher R., Abbud-Filho M., Leichtman A.B., Ythier A.A., Williams J.M., Carpenter C.B., Strom T.B. // Transplantation. 1987. V. 44. P. 673–680.
26. Holan V., Mitchison N.A. // Eur. J. Immunol. 1983. V. 13. P. 652–657.
27. Simpson E. // Nature. 1988. V. 336. P. 426.
28. Moller G. // Scand. J. Immunol. 1988. V. 27. P. 247–250.
29. Inaba K., Steinman R.M. // J. Exp. Med. 1984. V. 160. P. 1717–1735.
30. Roy M., Aruffo A., Ledbetter J., Linsley P., Kehry M., Noelle R. // Eur. J. Immunol. 1995. V. 25. P. 596–603.
31. Hauss P., Selz F., Cavazzana-Calvo M., Fischer A. // Eur. J. Immunol. 1995. V. 25. P. 2285–2294.
32. Boussiotis V.A., Freeman G.J., Gribben J.G., Daley J., Gray G., Nadler L.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 11059–11063.
33. Shinde S., Wu Y., Guo Y., Niu Q., Xu J., Grewal I.S., Flavell R., Liu Y. // J. Immunol. 1996. V. 157. P. 2764–2768.
34. Shahinian A., Pfeffer K., Lee K.P., Kundig T.M., Kishihara K., Wakeham A., Kawai K., Ohashi S., Thompson C.B., Mak T.W. // Science. 1993. V. 261. P. 609–612.
35. Gabai V.L., Meriin A.B., Mosser D.D., Caron A.W., Rits S., Shifrin V.I., Sherman M.Y. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 18033–18037.
36. Kitajima T., Ariizumi K., Bergstresser P.R., Takashima A. // J. Immunol. 1996. V. 157. P. 3312–3316.
37. Williams K.J., Landgraf B.E., Whiting N.L., Zurlo J. // Cancer Res. 1989. V. 49. P. 2735–2742.
38. Young J. W., Baggers J., Soergel S.A. // Blood. 1993. V. 81. P. 2987–2997.
39. Baird M. A. // Transplantation. 1994. V. 57. P. 763–767.
40. Liu Y., Janeway C.A. Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 3845–3849.
41. Van de Velde H., Lorre K., Bakkus M., Thielemans K., Ceuppens J.L., de Boer M. // Int. Immunol. 1993. V. 5. P. 1483–1487.
42. Ding L., Shevach E.M. // Eur. J. Immunol. 1994. V. 24. P. 859–866.
43. Likhtenshtein A.V., Shelepov V.P., Moiseev V.L., Chekulaev V.A., Zaboikin M.M. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1989. V. 304. P. 1256–1258.
44. Thorp R. M. // J. Immunol. 1978. V. 121. P. 1920–1926.
45. Nestle F.O., Burg G., Fah J., Wrone-Smith T., Nikoloff B.J. // Am. J. Pathol. 1997. V. 150. P. 641–651.
46. Hardy M.A., Lau H., Weber C., Reemtsma K. // Ann. Surg. 1984. V. 200. P. 441–450.
47. Kazanskii D., Agranovich I., Shtil A., Azhipa O., Chernyshova A., Apasov S., Bronz B. // Mol. Biol. 1995. V. 29(1). P. 98–105.
48. Kedar E., Chriqui-Zeira E., Mitelman S. // Cancer Immunol. Immunother. 1984. V. 18. P. 126–134.
49. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
50. Hunt C., Calderwood S. // Gene. 1990. V. 87. P. 199–204.
51. Selvakumar A., White P.C., Dupont B. // Immunogenetics. 1993. V. 38. P. 292–295.
52. Wasserman R., Li Y.S., Hardy R.R. // J. Immunol. 1995. V. 155. P. 644–651.

Heat Shock of Antigen-presenting Cells as a Method for Functional Testing of the T-Cells of Allospecific Memory

D. B. Kazanskii[#], V. N. Petrishchev, A. A. Shtil', A. D. Chernysheva, N. V. Sernova, I. F. Abronina[†], L. A. Pobezinskii, and E. L. Agafonova

*Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences,
Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia*

For many years, the search for the appropriate method of testing the functional activity of the memory T-cells was an urgent problem and determined progress in the study of immunological memory. We proposed simple methods of functional testing the memory of CD8⁺ T-cells specific to the H-2K^b alloantigen based on measuring their proliferation in response to heat-treated allogenic splenocytes and cells of allogenic tumors *in vitro*. Primary proliferative response to the alloantigen was shown not to develop when the allogenic antigen-presenting cells were subjected to an acute (45°C, 1 h) or moderate (42°C, 30 min) heat shock. The block of the primary allogenic response of naive T-lymphocytes to the heated splenocytes could not be abrogated by the addition of exogenous IL-2 and was not due to deletion or suppression of antigen-reactive clones. On the contrary, the long-lived memory CD8⁺ T-cells induced in the course of the primary *in vivo* response were capable of proliferation in response to heat-treated allogenic stimulators carrying the same immunizing antigen. The different response of the naive T-cells and memory T-cells to the allogenic stimulators subjected to a heat shock might be due to a strict dependence of the naive T-cells on the inducing co-stimulation provided by the B7 ligand, whose expression was suppressed in the cultures containing the heat-treated stimulator cells. These results probably suggest that a specific immunoregulatory mechanism exists that is based on a disorder in costimulatory functions due to the cellular stress-response induced in the antigen-presenting cells.

Key words: lymphocyte, memory cells, alloreactivity, heat shock

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: 324-5513, e-mail: kazansky@dataforce.net.