

НАКОПЛЕНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТКАМИ АЛЛОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

©2004 г. Л. А. Побезинский, Е. Л. Побезинская, Е. С. Звездова, В. Н. Петрищев, Т. С. Гриненко, И. А. Батурина, Т. В. Анфалова, Л. М. Хромых, Т. В. Васильева*, Д. Б. Казанский

*Государственное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, *Биологический Факультет МГУ им. М. В. Ломоносова*

ВВЕДЕНИЕ

Принято полагать, что участие нейтрофилов в иммунном ответе на трансплантат ограничено неспецифическими реакциями воспаления, развивающегося в ответ на хирургическое вмешательство и гибель клеток хозяина. Данные, посвященные роли этих воспалительных реакций, включающих активацию клеток сосудистого эндотелия, освобождение ими хемоаттрактантов нейтрофилов и роль последних в отторжении трансплантатов Т-клетками подробно изложены в обзоре [1]. В этой работе мы показываем, что первичный иммунный ответ на клетки аллогенных опухолей сопровождается накоплением зрелых активированных нейтрофилов $Gr-1^+CD11b^+F4/80^-CD31^-CD80^+$ в селезенке реципиентов. Интенсивность этой реакции зависит от антигенных различий опухоли и реципиента по продуктам МНС класса I, снижена у мышей с дефектами в развитии Т-клеток $CD8^+$ и не зависит от $CD4$ и $CD40$. Таким образом, нейтрофилы вовлечены в первичный иммунный ответ Т-клеток $CD8^+$ на молекулы МНС класса I клеток аллогенных опухолей и могут участвовать в дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы мыши C57BL/6 ($K^bI^D^b$), C57BL/10 ($K^bI^D^b$), B10.D2 и DBA/2 ($K^dI^D^d$), B10.D2 (R101) ($K^dI^D^b$), B6.C-H-2^{bm1}($K^{bm1}I^D^b$), C57BL/6J-

H2^{bm3}/ER (K^{bm3}I^bD^b), B6.C-H2^{bm12}/KhEg (K^bI-A^{bm12}D^b) разведения вивария ГУ РОНЦ РАМН. Нокауты по молекулам β_2 -микроглобулина (β_2m) - C57BL/6J-*B2m^{tm1Unc}* (H-2^b), транспортеров, ассоциированных с процессингом (TAP) - C57BL/6J-*Tap1^{tm1Arp}*, α -цепи TCR - C57BL/6J-*TCRa^{tm1Mom}* (H-2^b), CD4 - B6.129S2-*Cd4^{tm1Mak}*, CD8 - B6.129S2-*Cd8a^{tm1Mak}*, CD40 - B6.129P2-*Tnfrsf5^{tm1Kik}* были получены из Jackson Laboratory (Bar Harbor, Main, USA). Поддержание и генотипирование нокаутов проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными на web-сайте Jackson Laboratory.

Тимому EL4 (K^bD^b) пассировали в асцитной форме *in vivo*. Более 99% клеток тимомы были Thy1.2⁺. Мастоцитому P815 (K^dD^d) и ее вариант P815-GFP, стабильно трансфецированный модифицированным геном зеленого флуоресцентного белка вектора pEGFP-N1 [2], переклонированным в ретровирусный вектор pMSCV ψ uro [3], поддерживали культивированием *in vitro* в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в диапазоне клеточных концентраций 0,1 – 1 x 10⁶/мл. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно в дозе 2 x 10⁷. Вторичную иммунизацию проводили через 2 месяца. Аллогенные спленоциты вводили животным в дозах 1 x 10⁷ - 1 x 10⁸. Липополисахарид (ЛПС) – прямой индуктор реакций врожденного иммунитета - вводили животным в дозах 250 и 500 нг, конканавалин А (КонаА) – митоген Т-клеток - в дозах 10, 50, 100 и 250 мкг.

В работе использованы антитела фирмы Pharmingen (USA). В качестве источника антител к молекуле A^b использовали супернатант гибридомы Y3JР (любезно предоставлена А.В.Червонским, Jackson Laboratory, USA), к молекуле Ly6G (Gr-1) – супернатант гибридомы RB6-8C5 (любезно предоставлена С.А.Недоспасовым, NCI Frederick, USA). Антитела к иммуноглобулинам мыши, меченные FITC, и вторичные антитела к Fc- фрагменту иммуноглобулинов мыши, меченные FITC, приобретены у фирмы Sigma (USA). Антитела к маркеру макрофагов F4/80, меченные FITC, любезно предоставлены Т. Duffy (Jackson Laboratory, Main, USA). Результаты анализировали, используя программу WinMDI 2.8.

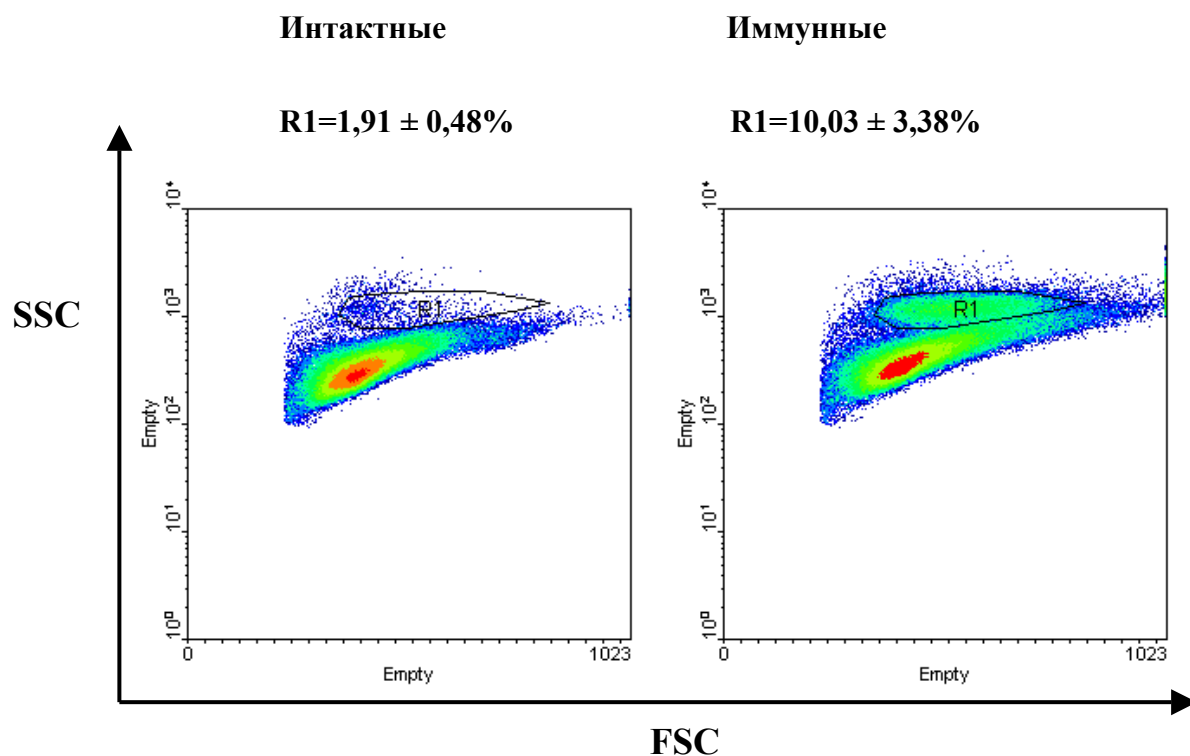


Рис. 1. Результаты анализа прямого и бокового рассеивания популяций спленоцитов интактных мышей C57BL/10 и мышей, иммунизированных 2×10^7 клеток мастоцитомы P815, методом проточной цитофлуориметрии (FACS). По оси абсцисс – интенсивность прямого рассеивания (FSC), по оси ординат – интенсивность бокового рассеивания (SSC) индивидуальными анализируемыми клетками. Результаты представлены как распределение по плотности анализируемых событий в каждой точке координат на графике (density plots). Хорошо видно появление дополнительного «ядра» клеток с повышенными показателями бокового рассеивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При цитофлуориметрическом анализе 100-200 тыс. спленоцитов мышей C57BL/10 ($K^{b1}D^b$), иммунизированных клетками мастоцитомы P815 (K^dD^d), обнаруживается популяция гранулярных клеток с повышенными показателями бокового рассеивания лазерного луча (Рис. 1). Пик такого ответа имеет место на 6 день и предшествует фазе экспансии CTL $CD8^+$, достигающей детектируемых значений на 9-й день после иммунизации. По данным пяти независимых экспериментов на 6-й день доля гранулярных клеток в селезенке возрастает в пять раз - с $1,91 \pm 0,48\%$ у неиммунизированных животных до $10,03 \pm 3,38\%$ ($M \pm SE$) у иммунизированных. Иммунизация вариантом P815-GFP показала, что в этот

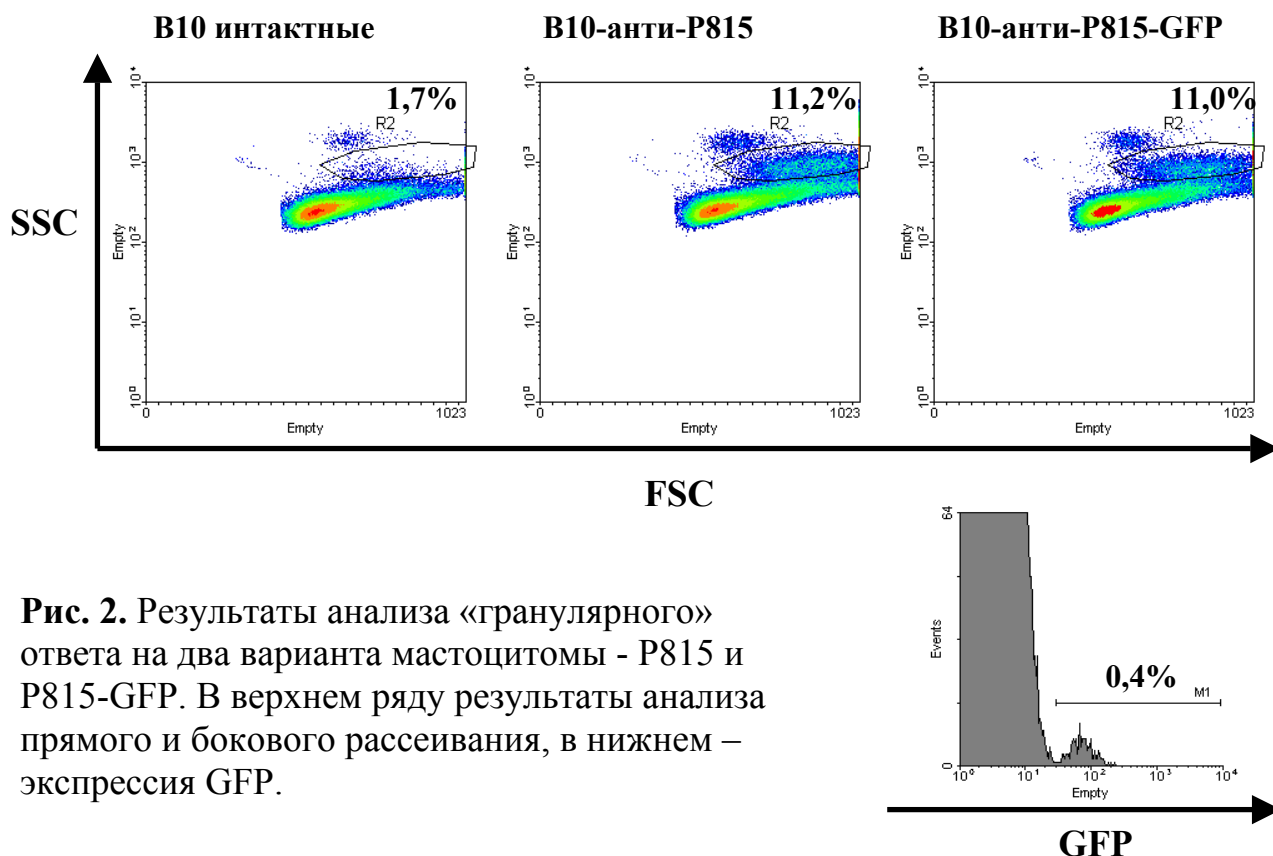


Рис. 2. Результаты анализа «гранулярного» ответа на два варианта мастоцитомы - P815 и P815-GFP. В верхнем ряду результаты анализа прямого и бокового рассеивания, в нижнем – экспрессия GFP.

момент доля клеток мастоцитомы составляет 0,3-0,4% спленоцитов и 3-4% популяции гранулярных клеток селезенки реципиента (Рис. 2).

Исследуемая популяция клеток экспрессирует миелоидный маркер Gr-1, CD11b (Mac-1) и костимулятор B7-1 (CD80). Большая часть этих клеток утратила маркер CD31, что характерно для активированных нейтрофилов. На них обнаруживается слабая экспрессия молекул МНС класса II (Рис. 3). Анализируемые клетки не экспрессируют В-клеточного маркера B220, Т-клеточных маркеров CD3, CD4 и CD8, маркера дендритных клеток CD11c, маркера естественных киллеров NK1.1 и маркера макрофагов F4/80 (данные не представлены). К нашему удивлению экспрессия CD80, индуцированная аллогенной иммунизацией, на 6-й день имеет место на популяции гранулярных клеток, а не дендритных (Рис. 4А). Исследование клеточного состава отпечатков селезенки интактных и иммунизированных животных показало, что исследуемая популяция представлена нейтрофилами (Рис. 4Б). Накопление нейтрофилов в селезенке в ответ на клетки тимомы EL4 (K^bD^b) минимально у мышей C57BL/10 и C57BL/6 (K^bD^b), экспрессирующих тот же гаплотип МНС (Табл. 1). У мышей

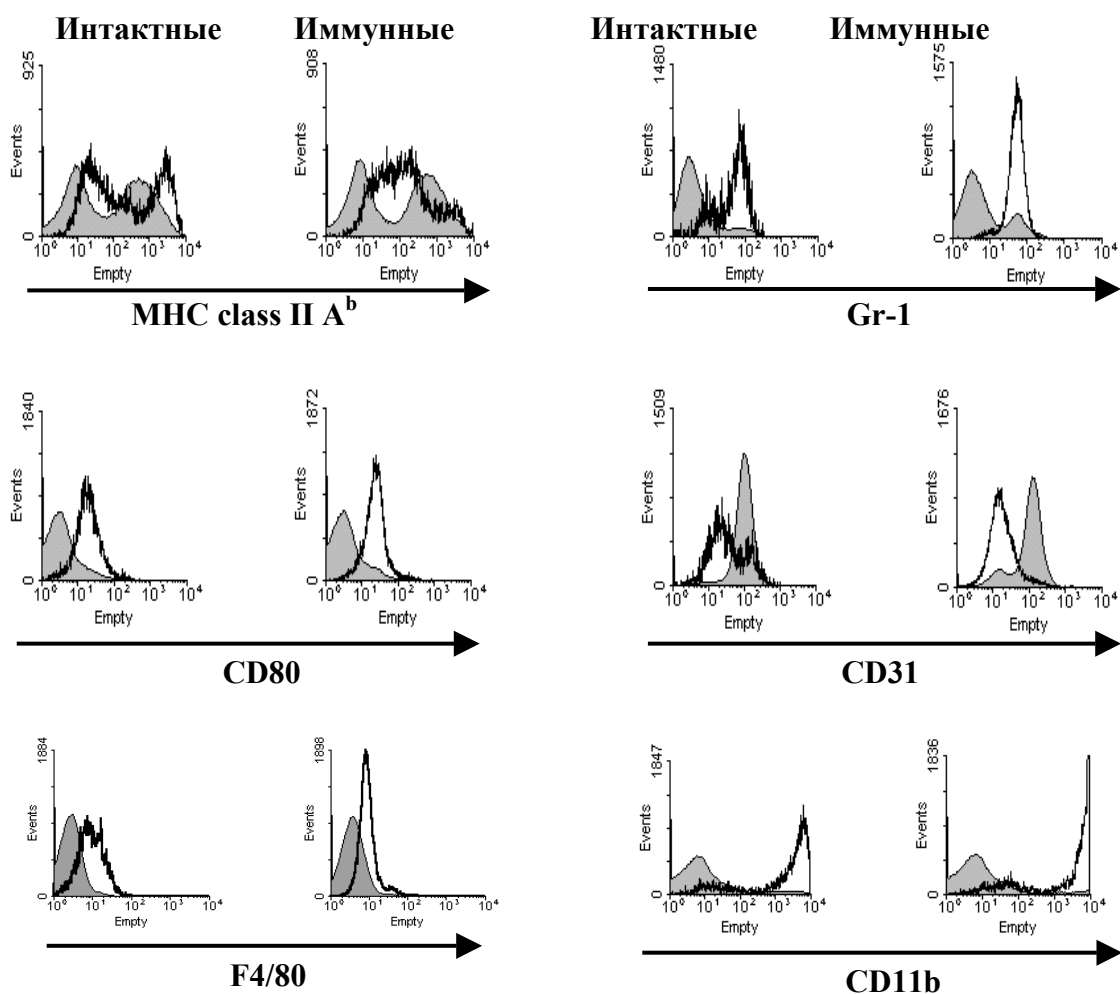


Рис. 3. Результаты анализа экспрессии различных поверхностных маркеров «гранулярными» клетками методом проточной цитофлуориметрии. Серым цветом заштрихованы диаграммы распределения общей популяции спленоцитов по яркости окрашивания антителами, без штриховки – диаграммы распределения «гранулярных» клеток. По оси абсцисс – интенсивность окрашивания клеток антителами к соответствующему маркеру. По оси ординат – число событий.

рекомбинантной линии B10.D2 ($K^dI^dD^d$), отличающейся от клеток тимомы экспрессией двух аллоантигенов K^d и D^d развивается интенсивный ответ. Заметно более низкий ответ развивается у мышей B10.D2(R101) ($K^dI^dD^b$), отличающихся от иммунизирующих клеток экспрессией одного аллельного продукта K^d . Ответ на клетки тимомы EL4 обнаруживается также у мышей серии *bm*-мутантов. Высокий ответ развивается у мутантов *bm3* и *bm1*, имеющих значительные антигенные отличия от молекулы МНС класса I H-2K^b. Он не наблюдается у

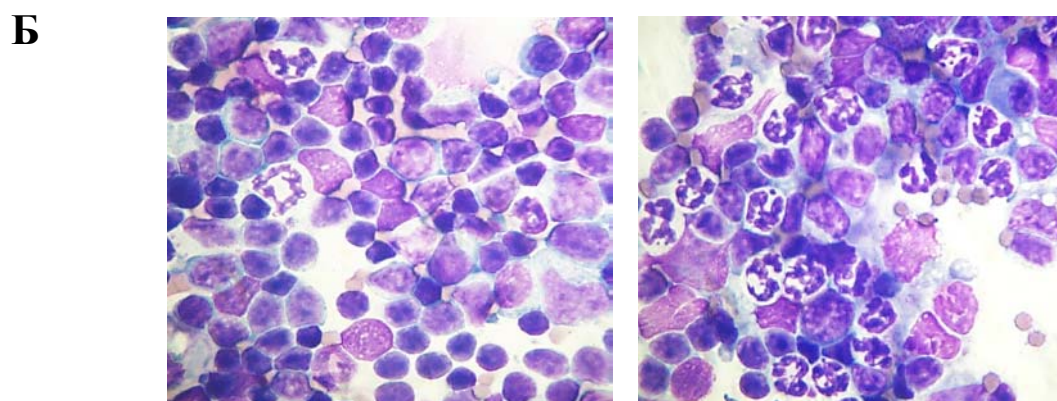
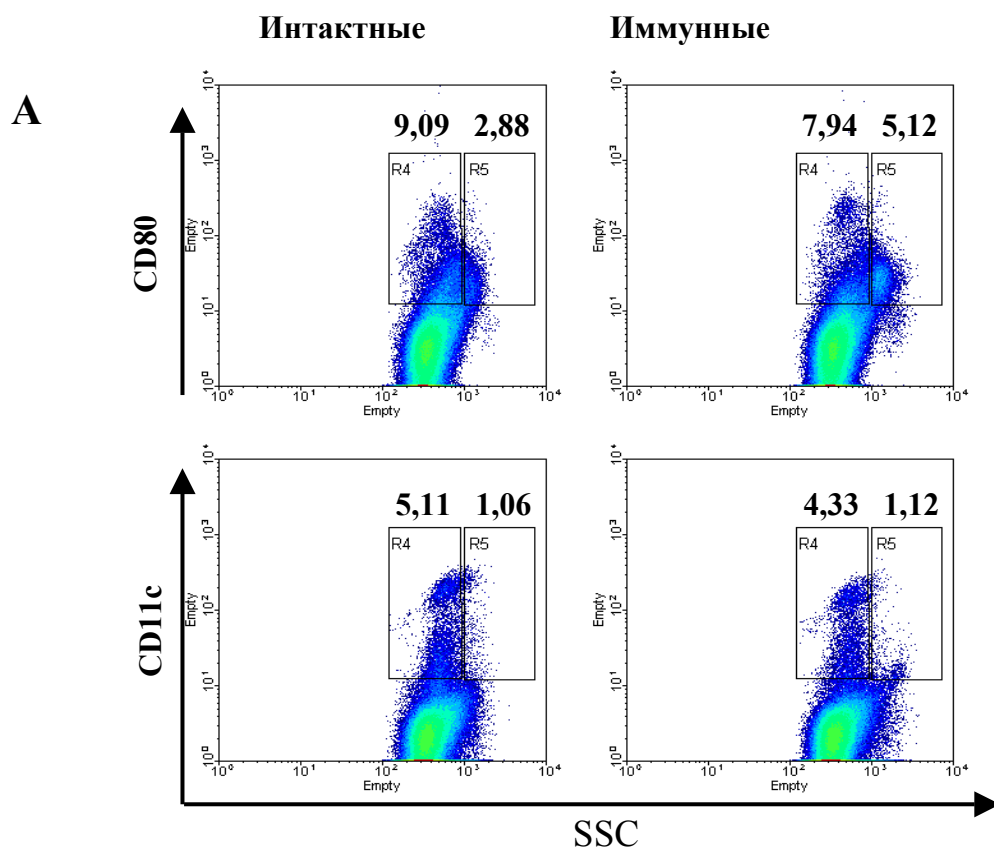


Рис. 4. А - Экспрессия CD80 и CD11c на популяциях спленоцитов, различающихся по показателям бокового рассеивания у интактных мышей C57BL/10 и иммунизированных клетками мастоцитомы P815. Хорошо видно, что аллогенная иммунизация не приводит к увеличению доли дендритных клеток, экспрессирующих CD11c, и имеющих низкие показатели бокового рассеивания. Экспрессия CD80, индуцированная иммунизацией клетками аллогенной опухоли ассоциирована с популяцией гранулярных клеток. По оси абсцисс – боковое рассеивание (SSC). По оси ординат – экспрессия CD80 (верхний ряд) и CD11c (нижний ряд). Б - Микрофотографии отпечатков селезенки интактных мышей C57BL/10 и мышей той же линии, иммунизированных 2×10^7 клеток мастоцитомы P815. Окраска по Романовскому-Гимза, увеличение 1×1200 . Хорошо видно появление сегментоядерных нейтрофилов в селезенке мыши, иммунизированной клетками мастоцитомы P815.

мутанта $bm6$, имеющего малые отличия от молекулы $H-2K^b$, а также у мышей $bm12$, экспрессирующих измененную молекулу МНС класса II. Ответ также развивается на аллоантигены нормальных аллогенных спленоцитов в дозе 1×10^8 . Стимуляция Т-клеточным митогеном КонА и ЛПС, являющимся прямым активатором клеток врожденного иммунитета, приводит к сходному эффекту. Он отсутствует при иммунизации аллогенными опухолевыми клетками, убитыми замораживанием-оттаиванием, а также ксеногенными эритроцитами (данные не представлены). Накопление нейтрофилов в селезенке отсутствует также во вторичном ответе на аллогенные опухолевые клетки (Табл. 1).

Отсутствие Т-клеток у нокаутов по α -цепи Т-клеточного рецептора приводит к исчезновению ответа на иммунизацию клетками Р815 (Табл. 2), что указывает на его строгую зависимость от Т-клеток. У нокаутов по генам ТАР, β_2 -микроглобулина и корецептора CD8, дефектных в развитии клеток $CD8^+$, интенсивность ответа снижена до уровня ответа сингенных мышей DBA/2. Напротив, у нокаутов по молекулам корецептора CD4 и костимуляторного рецептора CD40 снижения ответа не наблюдается. Иммунизация мышей дикого типа и нокаутов по молекуле CD4 приводит к снижению соотношения незрелых миелоидных предшественников $CD31^+$ и зрелых нейтрофилов $CD31^-$ среди гранулярных клеток селезенки, тогда как иммунизация нокаутов по молекуле CD8 - к увеличению (Рис. 5).

В основе успешной инициации и развития иммунного ответа лежит скоординированное взаимодействие клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Первичным стимулом такого взаимодействия в ответе на микробные и вирусные патогены является распознавание молекулярных паттернов макромолекул патогенных микроорганизмов рецепторами врожденной иммунной системы [4]. Это, в свою очередь, приводит к усилению экспрессии костимуляторных молекул на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК) и создает условия для развития адаптивного иммунного ответа. Поэтому не вызывает удивления тот факт, что введение ЛПС животным приводит к активации нейтрофилов и их накоплению в селезенке реципиентов. Менее очевидно то, что

Таблица 1. Интенсивность накопления нейтрофилов в селезенке мышей различных линий, иммунизированных клетками тимомы EL4

Линии мышей	%% гранулярных клеток в селезенке ¹
C57BL/10	1,13 ± 0,62 (7)
C57BL/6	1,68 ± 0,49 (4)
B10.D2(R101)	3,31 ± 0,08* (10)
B10.D2(R101) вторичный ответ	0,38 ± 0,09 (6)
B10.D2	14,24 ± 3,54* (8)
bm3	7,27 ± 2,17* (4)
bm1	6,03 ± 3,3* (3)
bm6	-0,26 ± 0,39 (4)
bm12	0,92 ± 0,42 (4)

В скобках – количество независимых экспериментов.

¹ - Разность между процентным содержанием гранулярных клеток в селезенке в опыте и интактном контроле

* - Достоверные отличия от контроля (C57BL/10 или C57BL/6, иммунизированные EL4, P<0,05)

Таблица 2. Интенсивность накопления нейтрофилов в селезенке мышей-нокаутов на генетической основе мышей C57BL/6, иммунизированных клетками мастоцитомы P815

Линии мышей	%% гранулярных клеток в селезенке ¹
DBA/2 (сингенная P815)	3,9 ± 0,6 (3)
B10.D2 (различия по минарам)	7,26 ± 1,04 (2)
C57BL/6 WT	9,79 ± 1,28* (6)
$\beta_2m^{0/0}$	2,18 ± 0,75** (4)
TAP ^{0/0}	4,76 ± 0,53** (3)
CD8 ^{0/0}	2,67 ± 0,49** (6)
CD4 ^{0/0}	13,91 ± 3,66 (2)
CD40 ^{0/0}	7,09 ± 1,66 (3)
TCR α ^{0/0}	-2,6 (1)

¹ - Разность между процентным содержанием гранулярных клеток в селезенке в опыте и интактном контроле. В скобках – количество независимых экспериментов.

*- Достоверные отличия от отрицательного контроля (DBA/2, иммунизированные P815, P<0,05)

** - Достоверные отличия от положительного контроля (C57BL/6 WT, иммунизированные P815, P<0,05)

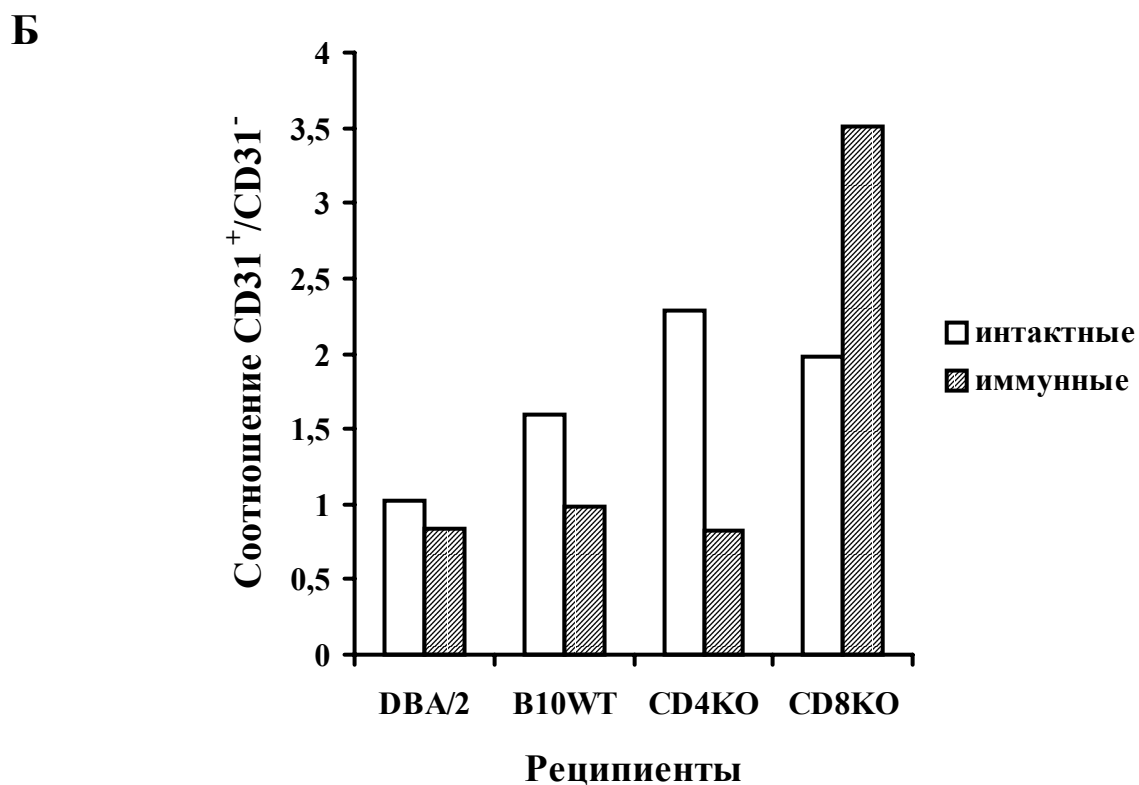
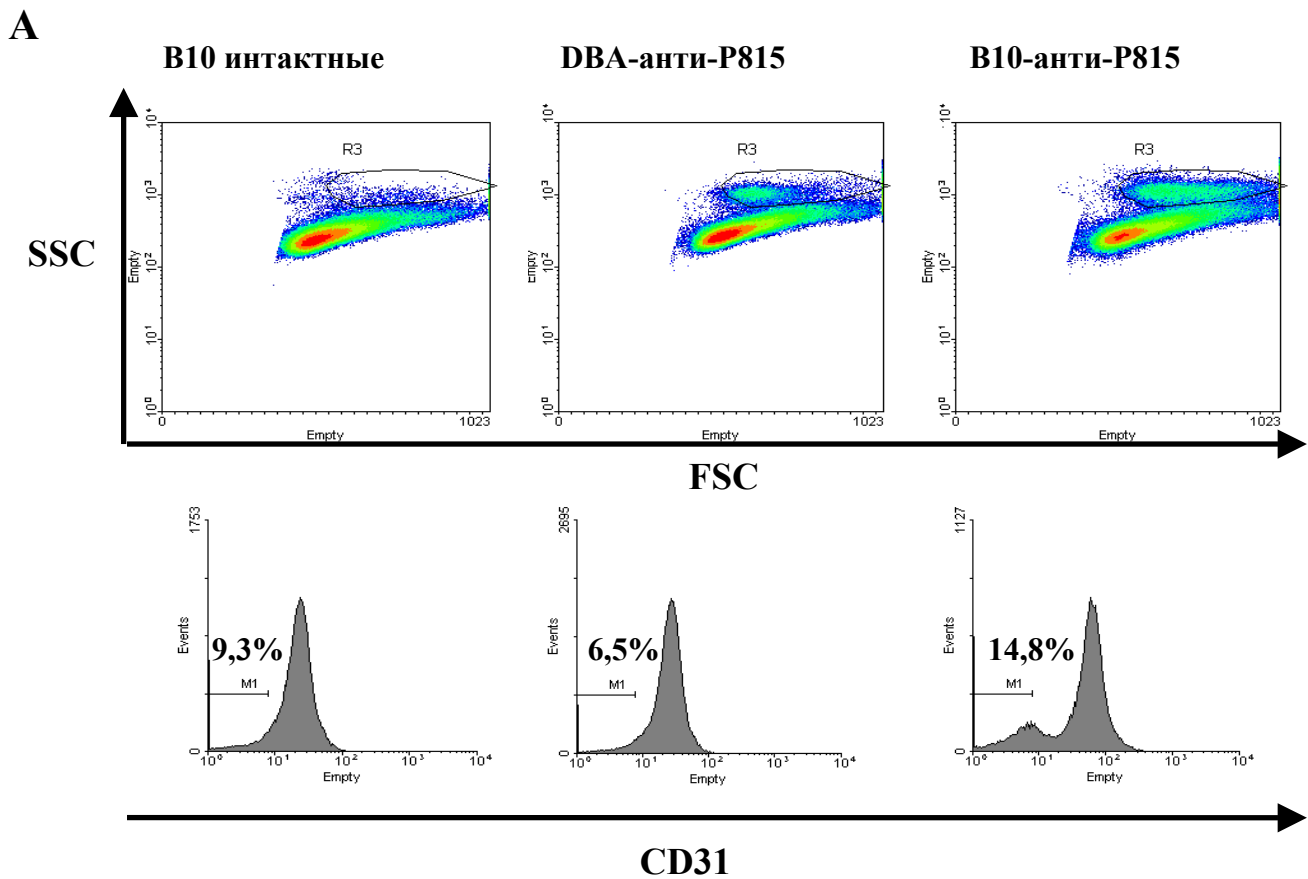


Рис. 5. А- Анализ спленоцитов мышей DBA/2 и C57BL/10, иммунизированных внутрибрюшинно 2×10^7 клеток мастоцитомы P815. В верхнем ряду результаты анализа прямого и бокового рассеивания, в нижнем – экспрессия CD31 спленоцитами реципиентов. Б - Влияние иммунизации мышей C57BL/10 клетками мастоцитомы P815 на соотношение клеток CD31⁺ и CD31⁻ в популяции гранулярных клеток мышей дикого типа и нокауты по генам CD4 и CD8.

сходный эффект имеет место в ответе на Т-клеточный митоген КонА и клетки аллогенных опухолей. Более того, интенсивность проявления эффекта явно коррелирует с различиями опухоли и реципиента по молекулам МНС класса I и их иммуногенностью для реципиентов. Прямым доказательством роли различий по МНС является то, что эффект воспроизводится при иммунизации мышей нормальными аллогенными спленоцитами линий, конгенных по МНС, хотя и в более высоких дозах. Ввиду отсутствия рецепторов для специфического распознавания антигенов нейтрофилы не способны распознать аллогенные молекулы МНС класса I. В организме эту функцию выполняют Т-лимфоциты CD8⁺, ключевая роль которых в реализации обнаруженного нами эффекта подтвердилась в экспериментах на нокаутированных животных. Таким образом, в ответе на клетки аллогенных опухолей первичным стимулом, запускающим каскад взаимодействий клеток врожденного и адаптивного иммунитета, является специфическое распознавание аллоантигенов Т-лимфоцитами CD8⁺, которые, в свою очередь, контролируют функции нейтрофилов. Ускоренная динамика увеличения доли нейтрофилов по сравнению с клетками CD8⁺ в селезенке указывает на то, что их функции важны в момент инициации и развития аллогенного ответа и не ограничены ролью «мусорщиков», уничтожающих обломки клеток, убитых CTL. Экспрессия CD80 указывает на их возможное участие в костимуляции ответов Т-лимфоцитов на аллоантигены опухолевых клеток. Необходимость такой костимуляции может быть вызвана тем, что опухолевые клетки не являются профессиональными АПК и не способны вызвать значимый ответ Т-клеток *in vitro*. Для специфического отторжения аллогенных клеток необходима активация предшественников CTL с рецепторами, специфичными к аллогенным молекулам МНС, экспрессированным на опухолевых клетках. Поэтому можно предположить, что источником костимуляции *in vivo* является третья популяция клеток, роль которой могут выполнять нейтрофилы, экспрессирующие CD80. Действительно, в ответах на клетки сингенных опухолей у крыс и внутриклеточные инфекции *Toxoplasma gondii*, *Chlamydomphila abortus*, *Legionella pneumophila* показано участие

нейтрофилов в продукции IL-12, индукции Т-хелперов типа I и CTL CD8⁺ [5, 6]. Вместе с тем, у носителей сингенных опухолей часто отмечается накопление в селезенке незрелых миелоидных клеток CD11b⁺Gr-1⁺CD31⁺, которые в зависимости от окружения цитокинов могут дифференцироваться в различные типы АПК и миелоидные супрессоры [7, 8]. Сами нейтрофилы вплоть до терминальных стадий дифференцировки также сохраняют способность к приобретению функций и маркеров дендритных клеток [9]. Различия в соотношении клеток CD31⁺ и CD31⁻, выявленные нами у иммунизированных нокауты по CD4 и CD8, указывают на существование сигнала клеток CD8⁺, приводящего к дифференцировке миелоидных предшественников в зрелые нейтрофилы с характеристиками профессиональных АПК. Вероятно, этим сигналом является продукция TNF Т-клетками CD8⁺ в ответ на стимуляцию аллоантигеном.

Вызывает интерес полное отсутствие эффекта при вторичном ответе на клетки аллогенной опухоли. По всей видимости, оно обусловлено снижением роли реакций врожденного иммунитета при вторичных ответах подобном тому, которое наблюдается в ответе на Salmonella. В первичном ответе на эту инфекцию главными продуцентами TNF α и IFN γ являются нейтрофилы и макрофаги селезенки, тогда как во вторичном ответе эта роль принадлежит клеткам адаптивного иммунитета [10]. Причины отличий наивных клеток и клеток памяти CD8⁺ в их способности вызывать накопление нейтрофилов в селезенке еще предстоит установить.

В ряде работ установлена зависимость ответов Т-клеток CD8⁺ на внутриклеточные патогены от контакта CD40L Т-хелперов CD4⁺ с CD40 дендритной клетки, приводящего к ее активации и экспрессии костимуляторного лиганда CD80 [11, 12]. Независимость выявленного нами эффекта от CD4 и CD40 указывает на то, что он имеет место без активации дендритных клеток реципиента Т-хелперами, что хорошо согласуется с результатами, представленными на Рис. 3. Дендритные клетки хозяина, очевидно, не вовлекаются в первичный ответ на клетки аллогенных опухолей. Этот факт наилучшим образом согласуется с

гипотезой, что Т-лимфоциты CD8⁺ реципиента распознают интактную структуру аллогенной молекулы МНС на опухолевой клетке, что запускает каскад реакций, приводящих к миграции в селезенку Т-лимфоцитов, получивших антигенспецифический сигнал, и нейтрофилов, являющихся источником костимуляторного сигнала. Эта гипотеза явно расходится с широко распространенным мнением о том, что Т-лимфоцит для успешной активации должен получить антигенспецифический и костимуляторный сигналы от одной и той же АПК [13]. Однако следует иметь в виду, что эта гипотеза была предложена для объяснения феноменологии ответов Т-хелперов CD4⁺ и не объясняет множества фактов, установленных в исследованиях предшественников CTL CD8⁺ [14].

Учитывая то, что нейтрофилы являются естественным депо IL-12 [6], их можно рассматривать также как возможный источник «третьего сигнала», необходимого для оптимальной индукции CTL и последующей секвестрации иммунного ответа [15]. Вполне очевидна дискуссионность того, в какой мере использованные нами модели отражают закономерности индукции специфического противоопухолевого и трансплантационного иммунитета. Мы намеренно сфокусировали эту работу на функциональных последствиях контролируемых различий клеток опухоли и реципиента по продуктам МНС. Накопление нейтрофилов со свойствами профессиональных АПК в селезенке реципиентов является существенной чертой, отличающей иммунные ответы на клетки сингенных и аллогенных опухолей, что может лежать в основе драматических различий в эффективности их отторжения.

Работа поддержана грантами РФФИ № 02-04-49042 и № 04-04-49187.

ЛИТЕРАТУРА

1. Buonocore S., Surquin M., Le Moine A, Abramowicz D., Flamand V., Goldman M. // Immunol. Lett. 2004. V. 94. P. 163-166.
2. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. // Gene. 1996. V. 173. P. 33-38.

3. Van Parijs L., Refaeli Y., Abbas A. K., and Baltimore D. // *Immunity*. 1999. V. 11. P. 763-770.
4. Barton G.M., Medzhitov R. // *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, V. 14, P. 380-383.
5. Tanaka E., Sendo F. // *Int. J. Cancer*. 1993. V. 54. P. 131-136.
6. Bliss S.K., Butcher B.A., Denkers E.Y. // *J. Immunol.* 2000. V. 165. P. 4515-4521.
7. Bronte V., Apolloni E., Cabrelle A., Ronca R., Serafini P., Zamboni P., Restifo N.P., Zanovello P. // *Blood*. 2000. V. 96. P. 3838-3846.
8. Kusmartsev S.A., Li Y., Chen S.H. // *J. Immunol.* 2000. V. 165. P. 779-785.
9. Oehler L., Majdic O., Pickl W.F., Stockl J., Riedl E., Drach J., Rappersberger K., Geissler K., Knapp W. // *J. Exp. Med.* 1998. V. 187. P. 1019-1028.
10. Kirby A.C., Yrlid U., Wick M.J. // *J. Immunol.* 2002. V. 169. P. 4450-4459.
11. Ossendorp F., Mengede E., Camps M., Filius R., Melief C.J. // *J. Exp. Med.* 1998. V. 187. P. 693-702.
12. Albert M.L., Jegathesan M., Darnell R.B. // *Nat. Immunol.* 2001. V. 2. P. 1010-1017.
13. Janeway C.A.Jr., Bottomly K. // *Cell*. 1994. V. 76. P. 275-285.
14. Ochsenbein A.F., Sierro S., Odermatt B., Pericin M., Karrer U., Hermans J., Hemmi S., Hengartner H., Zinkernagel R.M. // *Nature*. 2001. V. 411. P. 1058-1064.
15. Curtsinger J.M., Lins D.C., and Mescher M.F. // *J. Exp. Med.* 2003. V. 197. P. 1141-1151.

АННОТАЦИЯ

НАКОПЛЕНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТКАМИ АЛЛОГЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Л. А. Побезинский, Е. Л. Побезинская, Е. С. Звезда, В. Н. Петрищев, Т. С. Терещенко, И. А. Батурина, Т. В. Анфалова, Л. М. Хромых, Т. В. Васильева, Д. Б. Казанский

В этой работе мы показываем, что ранним проявлением иммунного ответа мышей на клетки аллогенных опухолей является накопление в селезенке нейтрофилов, обнаруживаемых методом проточной цитофлуориметрии как индивидуальная популяция клеток с повышенными показателями бокового рассеивания лазерного луча. Их появление обнаруживается уже на следующий день после иммунизации, достигает пика на 6-й день и предшествует экспансии клеток $CD8^+$. Нейтрофилы селезенки экспрессируют $CD11b$ (Mac-1), Gr-1 (Ly6G) и $CD80$ (B7-1). Отсутствие $CD31$ (PECAM-1) указывает на их активированное состояние. Накопление нейтрофилов в селезенке контролируется различиями аллелей МНС класса I, экспрессируемых клетками реципиента и аллогенной опухоли, и обнаруживается в первичном, но не во вторичном ответе на жизнеспособные аллогенные опухолевые клетки. Эта форма ответа не зависит от активации профессиональных антигенпрезентирующих клеток реципиента Т-хелперами. У мышей, дефектных в развитии клеток $CD8^+$, накопление нейтрофилов в селезенке подавлено и сопровождается увеличением соотношения гранулярных клеток $CD31^+$ и $CD31^-$. Таким образом, впервые показано, что накопление зрелых активированных нейтрофилов в селезенке мышей, иммунизированных клетками аллогенных опухолей, зависит от распознавания молекул МНС класса I наивными Т-лимфоцитами $CD8^+$. Этот феномен может лежать в основе секвестрации иммунного ответа на клетки аллогенных опухолей и их последующего отторжения.

SUMMARY

ACCUMULATION OF NEUTROPHILS IN THE SPLEEN OF MICE IMMUNIZED WITH ALLOGENEIC TUMOR CELLS

L. A. Pobezinsky, E. L. Pobezinskaya, V. N. Petrishchev, E. S. Zvezdova, T. S. Grinenko, T. V. Anfalova, L. M. Khromykh, T. V. Vasilieva and D. B. Kazansky

In this work we have shown that accumulation of neutrophils in the spleen of mice was one of the earliest events in course of immune response on allogenic tumor cells. This accumulation can be easily detected by flow cytometry as individual population of cells with increased capacity for side scattering. Their appearance can be detected on the next day after immunization with the peak on 6th day that precedes expansion phase of CD8⁺ T cells. Splenic neutrophils express CD11b (Mac-1), Gr-1 (Ly6G) and CD80 (B7-1). The absence of CD31 (PECAM-1) on their surface indicated on activated state. Accumulation of neutrophils in the spleen is under control of differences between MHC class I alleles expressed by recipient and tumor cells and can be detected in primary but not secondary response on viable allogeneic tumor cells. This response is not dependent of activation of recipient professional APC by CD4⁺ T cells. In mice deficient in CD8⁺ cells, accumulation of neutrophils in mouse spleen is significantly decreased and accompanied with increased ratio of granular CD31⁺/CD31⁻ cells. Thus, it is shown for the first time that accumulation of activated neutrophils in spleen of mice immunized with allogenic tumor cells is dependent on recognition of MHC class I molecules by naive CD8⁺ T lymphocytes. This phenomenon could be basis for sequestration of immune response on allogeneic tumor cells and their subsequent rejection.

Автор для переписки:

Казанский Дмитрий Борисович

Служебный адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН, Лаб. механизмов регуляции иммунитета (Тел. 324-55-13, e-mail kazansky@dataforce.net)